



## ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO T3469C DO GENE DA LEPTINA COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM SUÍNOS<sup>1</sup>

JANE DE OLIVEIRA PEIXOTO<sup>2</sup>, SIMONE ELIZA FACIONI GUIMARÃES<sup>3,4</sup>, PAULO SÁVIO LOPES<sup>3,4</sup>, MARIA AMÉLIA MENCK SOARES<sup>5</sup>, ALDRIN VIEIRA PIRES<sup>6</sup>, DANIELLE ASSIS DE FARIA<sup>2</sup>, PRISCILA VENRAMINI SILVA<sup>7</sup>, DAIANNY SILVEIRA BARBOSA<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Financiamento: CAPES, CNPq, FAPEMIG

<sup>2</sup> Estudante de mestrado, UFV, Viçosa, MG

<sup>3</sup> Professor do Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa, MG

<sup>4</sup> Professor bolsista do CNPq

<sup>5</sup> Professor da UNIOESTE, Cascavel, PR

<sup>6</sup> Professor da FAESA, Vitória, ES

<sup>7</sup> Estudante de graduação UFV, Viçosa, MG

**RESUMO** - O objetivo deste estudo foi associar o polimorfismo T3469C do gene da Leptina com características de desempenho avaliadas em suínos F2, obtidos por cruzamentos divergentes. Na análise estatística foi usado o PROC GLM do SAS, utilizando modelo contendo efeitos fixos de genótipo, sexo, lote, e efeito aleatório de pai. Associações significativas foram observadas com peso aos 21, 42, 63 e 77 dias de idade, com consumo de ração, ganho de peso médio diário e conversão alimentar. De acordo com os resultados obtidos, o gene da Leptina apresentou potencial para uso em programas de seleção assistida por marcadores.

**PALAVRAS-CHAVE:** gene candidato, cruzamento divergente, marcadores genéticos, PCR-RFLP

ASSOCIATION OF LEPTIN GENE POLYMORPHISM T3469C WITH PERFORMANCE TRAITS IN SWINE<sup>1</sup>

**ABSTRACT** - The objective of the present study was to evaluate the association of the Leptin polymorphism T3469C, with performance traits in a swine F2 generation formed by divergent lines. Association analyses were performed using PROC GLM of statistical package SAS, using a model that included genotype, sex, group as fixed effects and sire as random effect. The polymorphism was associated with weight at 21, 42, 63 and 77 days of age, feed intake, average daily gain and feed/gain ratio. According to the obtained results, Leptin gene presented potential to be used in marker assisted selection programs.

**KEYWORDS:** candidate gene, divergent crossing, genetic markers, PCR-RFLP

### INTRODUÇÃO

A Leptina é um hormônio protéico produzido e secretado quase que exclusivamente pelo tecido adiposo e que age como um sinal de saciedade sobre o hipotálamo, atuando sobre o peso corporal e o balanço energético. Segundo Barb et al. (2001), a Leptina, além de controlar a ingestão de alimentos, a termogênese e a ação da insulina, ainda atua na regulação da expressão e da secreção de múltiplos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios hipotalâmicos, incluindo o neuropeptídeo-Y, o hormônio de liberação de gonadotrofinas, o hormônio de liberação do hormônio do crescimento, e a somatostatina. Devido a sua atuação, este gene pode ser considerado como candidato em estudos relacionados com características de desempenho em suínos. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi associar o polimorfismo T3469C do gene da Leptina com a variação em características de desempenho medidas em população de suínos F2.

### MATERIAL E MÉTODOS

A população experimental foi formada por meio de um delineamento F2 obtido pelo cruzamento divergente de dois machos parentais da raça nativa brasileira Piau com 18 matrizes comerciais (Landrace x Large White x Pietran). Na geração F1, obtida por este cruzamento, foram selecionados 12 machos e 54 fêmeas que deram origem a geração F2, composta de aproximadamente 800 animais. As características de desempenho avaliadas foram peso ao nascimento (PNAS), peso aos 21 (P21), 42 (P42), 63 (P63), 77 (P77), e 105 (P105) dias de idade. Consumo de ração (CONSRAC), ganho de peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) foram avaliados individualmente dos 77 aos 105 dias de idade.

O polimorfismo T3469C foi detectado em um macho parental desta população por Soares (2001), por meio de sequenciamento automático. O par de *primers* (Direto: AACAGAGGGTCACCGGTTTG; Reverso: TTTGGAAGAGCAGCTTAGCG) usado para amplificar a sequência contendo o polimorfismo foi desenhado a partir da referência publicada por Bidwell et al. (1997) (GenBank acesso número U66254) e amplifica um fragmento de 491 pb. As reações de PCR foram construídas para um volume final de 20 $\mu$ l, utilizando 25 ng de DNA genômico. Para o diagnóstico da mutação T3469C utilizou-se a enzima de restrição *Hinf* I, cuja clivagem identifica os três genótipos: homocigotos normais (TT) com tamanhos de fragmentos de 400 e 91pb; homocigotos para a mutação (CC), com fragmentos de 347, 91 e 53 pb; e animais heterocigotos (TC) com os seguintes tamanhos de fragmentos: 400, 347, 91 e 53 pb. As análises de PCR-RFLP foram processadas em um volume final de 15,0  $\mu$ l contendo 8,0  $\mu$ l do material amplificado, 2,5  $\mu$ l da enzima *Hinf* I, 1,5  $\mu$ l de tampão da enzima, 0,15  $\mu$ l de BSA e 2,85  $\mu$ l de água. As reações ocorreram a temperatura de 37 °C durante duas horas. O material digerido foi submetido a eletroforese em gel de poli-acrilamida a 8% e as bandas foram visualizadas a partir da aplicação do protocolo de revelação com o nitrato de prata.

Nas análises estatísticas para associação do polimorfismo T3469C com as características de desempenho avaliadas foi usado o PROC GLM do SAS, seguindo-se um modelo que continha os efeitos fixos de genótipo, de sexo, e de lote e o efeito aleatório de pai. Foram usadas covariáveis que variaram de acordo com os grupos de características. Tamanho de leitegada ao nascimento foi covariável para PNAS, tamanho de leitegada ao desmame para os demais pesos (42, 63, 77 e 105) e P77 foi covariável para CONSRAC, GPD e CA. As comparações entre as médias dos genótipos foram feitas utilizando o teste F.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polimorfismo T3469C ocorre no terceiro *exon* do gene da leptina, onde há a substituição de T por C, e foi identificado primeiramente em um dos machos parentais da raça Piau. Foram genotipados por meio da técnica PCR-RFLP 506 animais na população F2 segregante. Verificou-se que 437 (86%) dos animais analisados possuíam genótipo TT, 69 (13,60%) eram heterocigotos (TC), e apenas, dois animais (0,4%) possuíam o genótipo CC. Devido a sua baixa frequência o genótipo CC não foi considerado nas análises estatísticas. O nível de significância da associação pelo teste F, assim como, o número de observações, a média e o desvio padrão associado a cada característica dentro de cada genótipo estão apresentados na Tabela 1. Das características de desempenho analisadas apenas o peso ao nascimento (PNAS) e o peso aos 105 dias (P105) não apresentaram diferenças significativas relacionadas ao polimorfismo T3469C. Este fato sugere que a Leptina apresenta função fisiológica importante na manifestação das características de desempenho. Foi observado que as associações entre o polimorfismo e as características relacionadas ao consumo de ração e ao ganho de peso foram mais significativas ( $p < 0,01$ ) que as associações com as características de crescimento ( $p < 0,05$ ). É provável que este fato reflita a atuação direta da Leptina sobre o hipotálamo, agindo como um sinal de saciedade e influenciando diretamente o consumo de ração, o ganho médio diário e a conversão alimentar.

Assim, a influência da Leptina sobre as características de crescimento seria uma consequência da variação causada no consumo de ração. Na tentativa de explicar esta associação do polimorfismo T3469C são apresentadas duas hipóteses. Na primeira, o polimorfismo seria diretamente responsável pela variação observada nas características. Sendo assim, tal mutação poderia estar envolvida na formação de uma proteína mais ou menos eficiente. É provável que esta hipótese seja verdadeira, pois este polimorfismo está localizado numa região de *exon*, podendo apresentar efeitos biológicos sobre a expressão da proteína Leptina. A segunda hipótese seria que o polimorfismo estaria em desequilíbrio de ligação com outra alteração nucleotídica que seria o verdadeiro sítio causal da variação observada nas características analisadas.

Observou-se que os animais não portadores da mutação T3469C (genótipo TT) apresentaram as melhores médias para todas as características, onde ocorreu efeito significativo de genótipo, portanto, a substituição de base T  $\rightarrow$  C teve efeito negativo sobre as características de desempenho nesta população. Jiang & Gibson (1999), estudando este polimorfismo em diferentes raças encontraram associação apenas com espessura de toucinho na raça Large White ( $p = 0,0017$ ). Kennes et al. (2001), estudando este mesmo polimorfismo na raça Landrace, encontraram associação ( $p = 0,0078$ ) com consumo alimentar e também observaram que a variante C estava negativamente associada a esta característica.

### CONCLUSÕES

O polimorfismo T3469C no gene da Leptina apresentou efeito significativo sobre quase todas as características de desempenho analisadas, estando a variante C associada às piores médias fenotípicas. É provável que este polimorfismo, por se encontrar num *exon*, seja a mutação causal da variação observada nas características analisadas. Contudo, a associação foi detectada numa população experimental, sendo necessária a comprovação destes efeitos em populações comerciais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARB, C. R.; HAUSMAN, G. J.; HOUSECKNECHT, K. L. Biology of Leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21: 297 – 317, 2001.
- BIDWELL, C.A.; CORNELIUS, S.G.; WILLIS, G.M.; SPURLOCK, M. Cloning and expression of the porcine *obese* gene. **Animal Biotechnology**, v 8, n 2, p.191 – 206, 1997.
- JIANG, Z.H.; GIBSON, J.P. Genetic polymorphism in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, v. 10, p.191 – 193, 1999.
- KENNES, Y.M.; MURPHY, B.D.; POTHIER, F.; PALIN, M.F. Characterization of swine Leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. **Animal Genetics** v.32, p. 215 – 218, 2001.
- SAS Institut Inc. User's Guide. Statistical Analysis System. Cary, NC, USA, 1998.
- SOARES, M. A. M. Estudo do gene da obesidade e de seu receptor em suínos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 108 pgs. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

TABELA 1. Número de observações, média e desvio-padrão das características de desempenho para o polimorfismo T3469C

Característica	Genótipo TT			Genótipo TC		
	N <sup>1</sup>	Média	DP <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	Média	DP <sup>2</sup>
P21 (kg)*	317	5,04	1,17	54	4,68	0,88
P42 (kg)*	329	8,48	1,90	60	7,89	1,65
P63 (kg)*	333	16,60	3,49	59	15,27	2,66
P77 (kg)*	343	21,54	4,11	60	20,37	3,42
CONSRAC (kg)**	374	40,79	8,12	69	39,78	7,72
GPD (kg)**	369	0,56	0,14	68	0,52	0,11
CA (kg:kg)**	365	2,81	0,69	69	2,75	0,58

<sup>1</sup> – Número de observações em cada característica, de cada genótipo.

<sup>2</sup> – DP – desvio- padrão

\* Diferenças significativas (P<0,05), entre genótipos, pelo teste F.

\*\* Diferenças significativas (P<0,01), entre genótipos, pelo teste F.

P21 - peso aos 21 dias; P42 - peso aos 42 dias; P63 - peso aos 63 dias; P77 - peso aos 77 dias; CONSRAC - consumo de ração dos 77 aos 105 dias; GPD - ganho de peso diário e CA - conversão alimentar.