



VII Simposio Brasileiro de Melhoramento Animal
São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

Estudo do polimorfismo no gene da leptina em três linhas de seleção de bovinos Nelore¹

Larissa Fernanda Simielli Fonseca², Lúcia Galvão de Albuquerque³, Alexander George Razook⁴, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante⁵, Fabio Ricardo Pablos de Souza⁶, Humberto Tonhati⁷, Denise Rocha Ayres⁸, Livia Maria Soares Ferreira⁹, Inaê Cristina Regatieri¹⁰, Maria Eliana Vechetini¹¹

¹Projeto financiado pela FAPESP

²Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: la_simielli@yahoo.com.br, bolsista FAPESP

³Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: lgalb@fcav.unesp.br, bolsista do CNPq

⁴Pesquisador da EEZS, IZ/APTA/SAA, e-mail: razook@iz.sp.gov.br, bolsista do CNPq

⁵Pesquisador da EEZS, IZ/APTA/SAA, e-mail: mercadante@iz.sp.gov.br

⁶Pós-doutorando FCAV-UNESP, e-mail: fabiopablos@yahoo.com.br

⁷Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: tonhati@fcav.unesp.br

⁸Mestranda FCAV-UNESP, e-mail: d.ayres@ig.com.br, bolsista CAPES

⁹Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: livinha_msf@yahoo.com.br, bolsista CNPq

¹⁰Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: shibinga@hotmail.com, bolsista CNPq

¹¹Mestre em melhoramento genético Animal, e-mail: mariavechetini@yahoo.com.br

Resumo - Peso ao sobreano é uma importante característica de produção em bovinos de corte. Existem evidências de que polimorfismos no gene da leptina estão envolvidos com o consumo de alimento e ganho de peso em modelos experimentais murinos e em humanos. Este trabalho tem por objetivo verificar a existência de um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) descrito em bovinos entre o íntron 2 e éxon 3 no gene da leptina em 348 novilhas de três linhas de seleção da raça Nelore pertencentes à Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho. Para isso foi amplificado um fragmento de 522 pares de base e realizado ensaio RFLP com a enzima de restrição Bsa AI. Foram observados 3 padrões de digestão, o primeiro contendo o fragmento de 522 pb não digerido que corresponde ao homocigoto A/A, o segundo padrão contendo fragmento não digerido de 522pb e dois outros fragmentos, produtos da digestão (441 e 81 pb), correspondente ao heterocigoto A/G, e um terceiro padrão, correspondente ao homocigoto G/G exibindo dois fragmentos de 441 e 81 pb. As frequências gênicas e genotípicas observadas do polimorfismo foram similares entre as três linhas de seleção e o teste X^2 demonstrou que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Palavras-chave: Leptina, marcadores moleculares.

The study of leptin gene polymorphism in three lines of the Nelore cattle

Abstract – The weight is one of the most important quantitative trait that influences production of beef cattle. There are evidences that polymorphisms in the Leptin gene are involved with higher weights in mice and human. The objective of this study was to search for Leptin gene polymorphism by PCR-RFLP in 348 Nelore females from three selection lines kept by the Experimental Station of Sertãozinho-SP. The amplified region was the second intron and the third exon of the Leptin gene. The fragments obtained have 522 pb. After this, the RFLP technique was executed with the Bsa AI restriction enzyme and three patterns of migration were observed. The first one, with the 522 pb fragments not cut, corresponding to the A/A genotype. The second showed three fragments with 522 pb, 441 pb and 81 pb corresponding to the genotype A/G. The third pattern showed two fragments, one with 441 pb and the other with 81 pb corresponding to the genotype G/G. The allelic and genotypic frequencies observed was similar between the three selection lines and the chi-square test showed that the sample is in equilibrium of Hardy-Weinberg.

Key words: Growth, weight, Leptin, molecular markers

Introdução

O peso ao sobreano é uma das principais características quantitativas que afetam a produção. Um dos genes relacionados a peso em murinos e humanos é o gene da leptina, cujo polimorfismo vem sendo associado à deposição de gordura em bovinos. Este hormônio é sintetizado e secretado principalmente pelo tecido adiposo branco e em menor quantidade pelo estômago, tecido adiposo marrom e células estelares do fígado, e é altamente correlacionado com o peso corporal e a adiposidade (BADO et al. 1998; CINTI et al.,1997; CHEHAB et al.,1996). Também foi demonstrado que esse hormônio pode ser secretado e sintetizado na placenta e no líquido amniótico e que existe leptina no leite materno (ALMARAZ, 2000).

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo estudar polimorfismos SNPs do gene da leptina (*Genbank*: Y11369) pela técnica de PCR-RFLP em três linhas de seleção da raça Nelore pertencentes ao programa de seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho.

Material e Métodos

Os bovinos Nelore, nascidos e criados extensivamente na Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, fazem parte do Programa de Seleção das Raças Zebuínas e Caracu, iniciado em 1978. Os animais foram separados em três linhas de seleção, sendo duas delas selecionadas para maior peso ao sobreano (NeS e NeT), e uma linha controle (NeC), em que os animais são selecionados para a média desse peso.

Foram colhidos 5mL de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos vacutainer contendo 7,5 mg de EDTA. A amplificação por PCR da região correspondente ao íntron 2 e éxon 3 do gene da leptina foi realizada utilizando-se os *primers*, *forward*: 5'- GTC TGG AGG CAA AGG GCA GAG T- 3', e *reverse*: 5' – CCA CCA CCT CTG TGG AGT AG - 3', descrito por Lien e colaboradores, (1997).

As soluções para o PCR foram preparadas em um volume final de 25 µL, constituídas por cerca de 100 ng de DNA, 1,5 pmol de cada *primer* descrito anteriormente, tampão de PCR (10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl) na concentração de 1X, 100 µM de dNTPs, e 0,5 U de Taq DNA polimerase. Para a reação de PCR foi

utilizado um termociclador da marca T Biômetra com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94° C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 40 segundos, pareamento a 66° C por 45 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi a 72° C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e fotografados em transluminador ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foram estimados pelo software *Image Analysis* da Kodak utilizando-se o marcador de 100 pares de base como parâmetro. Os RFLPs possuem somente dois alelos, alelo “A” e alelo “G”, com frequência gênica p e q, respectivamente. Foram calculadas as frequências alélicas, genotípicas e teste do χ^2 para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A diferenciação gênica entre os rebanhos foi avaliada por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 0,05, utilizando o *software* GENETPOP (ROUSSET, 2008).

Resultados e Discussão

Nas análises de PCR-RFLP, foram observados 3 padrões de digestão. O primeiro, contendo o fragmento de 522 pb não digerido, correspondente ao homocigoto A/A. O segundo, contendo o fragmento não digerido de 522pb e dois outros fragmentos, produtos da digestão com a enzima *Bsa* AI (441 e 81 pb), correspondente ao heterocigoto A/G, e um terceiro padrão exibindo dois fragmentos com comprimentos de 441 e 81 pb, correspondente ao homocigoto G/G, como pode ser observado na Figura 1.

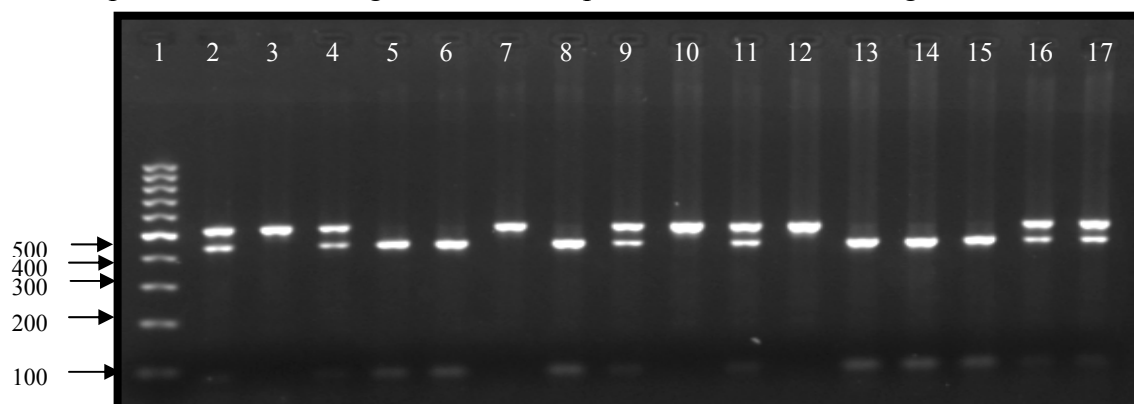


Figura 1- Gel de agarose contendo os produtos de digestão pela *Bsa* AI para o gene *LEP* bovino em 16 bovinos da raça Nelore. 1: Marcador de DNA 100 pb; 2, 4, 9, 11, 16 e 17: heterocigotos A/G; 3, 7, 10, e 12: homocigotos A/A; 5, 6, 8, 13, 14, 15: homocigotos G/G.

Os marcadores moleculares RFLP são codominantes, portanto as frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem simples dos alelos a partir dos resultados observados no gel de eletroforese.

Considerando as linhas de seleção, na linha NeC, a frequência genotípica dos genótipos A/G e G/G foi superior, com valor de 0,41 e 0,33, respectivamente. Nas linhas NeT e NeS, o genótipo mais frequente foi o heterocigoto A/G com frequência de 0,54 e 0,49, respectivamente. O número observado, frequência genotípica observada, número esperado, e frequência genotípica esperada dos genótipos em cada linha de seleção pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1- Número observado (N_o), esperado (N_e), e freqüências genótípicas observadas (F_o), e esperadas (F_e) do gene *LEP* bovino nas três linhas de seleção.

Genótipos	Grupos de seleção											
	NeC				NeT				NeS			
	N_o	F_o	N_e	F_e	N_o	F_o	N_e	F_e	N_o	F_o	N_e	F_e
A/A	14	0,26	14,28	0,21	28	0,23	31,99	0,25	50	0,29	45,74	0,28
A/G	22	0,41	26,69	0,50	65	0,54	59,80	0,50	85	0,49	85,51	0,50
G/G	18	0,33	13,03	0,29	28	0,23	29,21	0,25	38	0,22	41,76	0,22
Total	54				121				173			

Em relação à freqüência gênica, não foi observada diferença significativa entre as três linhas. Na linha NeC, com seleção para média de peso, a freqüência alélica do alelo G foi levemente superior (0,54). Na linha NeT, os alelos A e G, tiveram a mesma freqüência (0,5) e na NeS, o mais freqüente foi o alelo A (0,53).

A heterozigidade observada foi superior na linha NeT com o valor de 0,53. A linha NeS apresentou heterozigidade observada 0,49 enquanto a linha NeC, 0,40.

Os valores do X^2 de 2,72, 0,99, e 0,73 para as linhas de seleção NeC, NeT e NeS, respectivamente, revelaram que o loco *LEP* avaliado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas três amostras selecionadas.

Conclusões

Foi encontrado polimorfismo na região correspondente ao íntron 2 e éxon 3 do gene da leptina. O genótipo de maior freqüência nos três grupos foi o A/G. O polimorfismo estudado parece não estar associado ao sobrepeso dos animais.

Literatura Citada

- ALMARAZ, R.L. et al. Leptina: Conocimientos actuales e implicaciones clínicas. **BSCP Can. Pediátrico**, v.24, n.3, p.159-164, 2000.
- BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLUZZI, M.N. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v.394, n.6695, p.790-793, 1998.
- CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; RONGHUA, L. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. **Natural Genetics**, v.12, p.318-320, 1996.
- CINTI, S.; FREDERICH, R.C.; ZINGARETTI, M.C.; DE MATTEIS, R.; FLIER, J.S.; LOWELL, B.B. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. **Endocrinology**, v.138, p.797-804, 1997.
- LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D.I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v.28, n.3, p.245, 1997.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8, n.1, p.103-106, 2008.