

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

### PCR - RFLP para o gene da Leptina em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup>

Lívia Maria Soares Ferreira<sup>2</sup>, Lucia Galvão de Albuquerque<sup>3</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>4</sup>, Humberto Tonhati<sup>5</sup>, Fabio Ricardo Pablos de Souza<sup>6</sup>, Denise Rocha Ayres<sup>7</sup>, Larissa Fernanda Simielli Fonseca<sup>8</sup>, Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Projeto financiado pela FAPESP

<sup>2</sup>Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: livinha\_msf@yahoo.com.br, bolsista CNPq

<sup>3</sup>Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: lgalb@fcav.unesp.br

<sup>4</sup>Pesquisador da EEZS, IZ/APTA/SAA, e-mail: mercadante@iz.sp.gov.br

<sup>5</sup>Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: tonhati@fcav.unesp.br

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

<sup>7</sup>Mestranda FCAV-UNESP, e-mail: d.ayres@ig.com.br, bolsista CAPES

<sup>8</sup>Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: la\_simielli@yahoo.com.br, bolsista FAPESP

<sup>9</sup>Graduando em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: gregoriocamargo@hotmail.com, bolsista FAPESP

**Resumo** – Para as constantes mudanças do sistema produtivo de bovinos de corte, o enfoque sobre a qualidade da carne é cada vez maior. O gene do hormônio Leptina é importante nas características relacionadas ao acabamento de carcaça, onde sua ação está relacionada à deposição de gordura. Assim o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de polimorfismos do gene da Leptina em 169 novilhas da raça Nelore utilizando a técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism). Para tanto, foram amplificados 290 pb correspondentes ao exon 2 da região codificadora do gene. Após esta etapa, os produtos obtidos com a PCR foram digeridos com a endonuclease de restrição *Kpn2I*. Os resultados obtidos com a digestão apresentaram 3 padrões de migração diferentes, denominados AA, AG e GG. As frequências dos diferentes padrões de migração foram calculadas e comparadas pelo teste do  $X^2$  para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que, no grupo de animais avaliados, a utilização da técnica de PCR-RFLP com a enzima *Kpn2I* foi eficiente na detecção de polimorfismos no exon 2 da região codificadora do gene da leptina em novilhas Nelore

**Palavras-chave:** espessura de gordura subcutânea, Leptina, marcadores moleculares.

### PCR-RFLP to the Leptin gene in Nelore breed cattle

**Abstract** – To the frequent changes of the beef cattle breed system, the targeted under meat's quality is each time bigger. The Leptin gene is important in the characteristics about the carcass finishing with polymorphism seems to be associate to the fat deposition.

So this project was study oh polymorphism in Leptin relationship specifically, the exon 2, in Nelore breed females. For this the exon 2 part where the fragments having 290pb

blenght. The essay PCR-RFLP was done and 3 migration patterns denomitade: AA AG and GG The frequences of the polymorphism alleles were calculated compared by  $X^2$  test to Hardy- Weinberg equilibrium. Still could be observed that there is polymorphism in the exon 2 the Leptin gene in Nelores cattle.

**Keywords:** subcutaneous fat thickness, Leptin, molecular markers.

### Introdução

No âmbito das constantes mudanças do sistema produtivo de bovinos de corte, o enfoque sobre a qualidade da carne é cada vez maior. Devido à sua importância econômica e cultural, estudos das relações genéticas para elevar a produtividade e a qualidade dos produtos têm se constituído o maior desafio para os pesquisadores.

A espessura da gordura de cobertura é uma das principais características quantitativas que afetam a qualidade da carcaça em gado de corte. O processo de “cold-shortening”, o qual caracteriza o escurecimento, perda de água, e endurecimento da carne, normalmente ocorre em carcaças que apresentam menos de 3 mm de gordura de cobertura, pois não há uma quantidade mínima para protegê-la do rápido resfriamento que é sofrido na câmara fria, resultando em prejuízos ao frigorífico e ao criador. Dessa forma, Li et al. 2004 afirmam que a seleção para uma medida ótima de gordura é um dos maiores desafios para um melhor aproveitamento na indústria da carne.

Um dos genes relacionados à deposição de gordura e qualidade de carcaça parece ser o gene da Leptina, cujo polimorfismo vem sendo associado à deposição de gordura. Este hormônio é sintetizado e secretado principalmente pelo tecido adiposo branco e em menor quantidade pelo estômago, tecido adiposo marrom (BADO et al., 1998) e células estelares do fígado (OVIES et al. 1999), e é altamente correlacionado com o peso corporal e a adiposidade (CHEHAB et al., 1996).

O objetivo do presente trabalho, foi verificar a ocorrência de polimorfismos do gene da Leptina (*Genbank*: Y11369) em novilhas Nelore pertencente ao programa de seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho-SP Brasil.

### Material e Métodos

Os animais são nascidos e criados extensivamente na Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho. Desde 1980 os animais da raça Nelore foram separados em três linhas de seleção, sendo duas delas selecionadas para peso ao sobreano (Nelore Seleção-NeS e Nelore Tradicional- NeT), e uma linha controle (Nelore Controle-NeC), em que os animais são selecionados para a média desse peso.

As reações de amplificação por PCR foram realizadas para volume final de 25  $\mu$ L, contendo 150 ng de DNA, 0,75  $\mu$ M de cada primer (5'TGTAACGACGGCCAGTCCATGGCAGACAGCAAATCTCGTT3' e 5'CAGGAAACAGCTATGACCTGGTGCATCCTGGACCTTCC3'), tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM  $MgCl_2$  e 50 mM KCl), 100  $\mu$ M de dNTP, 0,5U de enzima Taq DNA polimerase. O programa de amplificação do termociclador consistirá de um ciclo para desnaturação inicial a 95°C/ 300 segundos, seguidos de 35 ciclos para desnaturação a 72°C / 60 segundos, anelamento dos primers a 54°C / 45 segundos.

Os fragmentos dos genes amplificados foram analisados co o uso da técnica de PCR-RFLP, com a enzima de restrição *Kpn2I*. Para tanto, foi utilizado 5  $\mu$ L de amostra do fragmento amplificado por PCR, 1/10 do volume de tampão de reação e 3U de enzima, para

volume final de reação de 20  $\mu$ L. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese (100 V por 2 horas) em géis de agarose 3,0%, corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para identificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes, comparando-se com padrão de peso molecular de 1Kb pares de bases (Invitrogen®). Após esta etapa, foram realizados os cálculos das frequências gênicas e genóticas dos padrões de migração observados no gene da Leptina.

### Resultados e Discussão

A análise de PCR determinou um fragmento de 290 pb para a região do gene analisado. As análises de PCR-RFLP, realizadas com a endonuclease de restrição *Kpn2I* apresentaram como resultado 3 padrões de digestão. O primeiro, contendo o fragmento não digerido de 290 pb, correspondente ao homozigoto A/A. O segundo, apresentando o fragmento não digerido e um fragmento de aproximadamente 250 pb, correspondente ao heterozigoto A/G e um terceiro padrão exibindo apenas o fragmento de aproximadamente 250 pb correspondente ao homozigoto G/G, como pode ser observado na figura 1.

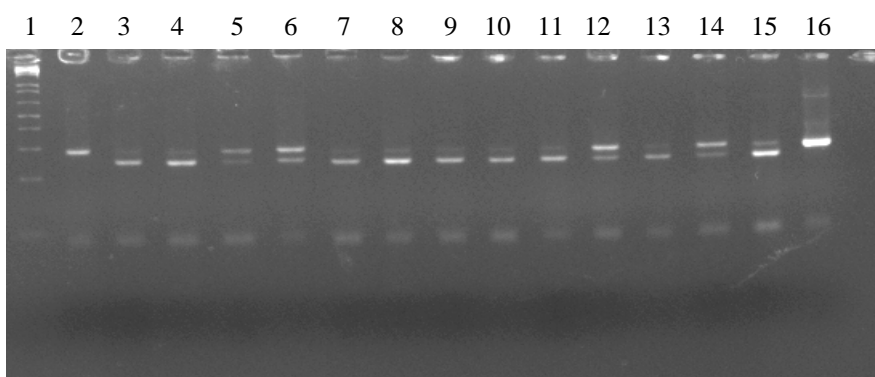


Figura 1- Gel de agarose contendo os produtos de digestão pela *Kpn2I* para o gene *LEP* bovino em 14 bovinos da raça Nelore. 1: Marcador de DNA 100 pb; 2 animal homozigoto A/A; 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13 e 15 animais homozigotos G/G e 5, 6, 12e 14 animais heterozigotos A/G. A coluna 16 corresponde à PCR realizada.

Os marcadores moleculares RFLP são codominantes, portanto as frequências alélicas e genóticas foram estimadas por contagem simples dos alelos a partir dos resultados observados no gel de eletroforese. Na linha de seleção NeC, o genótipo mais observado foi o G/G apresentando valor de 0,63. Já nas linhas seleção, NeT e NeS, o genótipo mais freqüente foi o heterozigoto A/G apresentando valor de 0,69 e 0,66 respectivamente seguido pelo homozigoto G/G(Tabela 1).

Tabela 1- Número observado ( $N_o$ ) e frequências genóticas observadas ( $F_o$ ) do gene *LEP* bovino entre os 3 grupos estudados.

Genótipos	Grupos de seleção					
	Nec		NeT		NeS	
	$N_o$	$F_o$	$N_o$	$F_o$	$N_o$	$F_o$
A/A	0	0,00	2	0,03	2	0,02
A/G	7	0,37	48	0,69	58	0,66
G/G	12	0,63	20	0,29	28	0,32
Total	19		70		88	

Em estudos com animais Angus, Hereford e Charolês através da técnica de sequenciamento, BUCHANAN et al(2001) observou a existência de um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no éxon 2 devido troca de nucleotídeo citosina por timina. Salman (2003) estudando uma população cruzada (Angus x Nelore) encontrou polimorfismo no éxon 2 gene da Leptina, utilizando a técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples). Foram observados 4 padrões de migração no fragmento LEPT2, apresentando frequências de 0,84, 0,13 e 0,03, respectivamente, para os genótipos AA, AB e BB. Um desses padrões de migração foi associado com teor de gordura na carcaça.

O polimorfismo detectado no presente trabalho sugere a necessidade da continuidade do estudo, a fim de se determinar possíveis associações do mesmo com características de deposição de gordura em *Bos indicus*.

### Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que, no grupo de animais avaliados, a utilização da técnica de PCR-RFLP com a enzima *Kpn2I* foi eficiente na detecção de polimorfismos no exon 2 da região codificadora do gene da leptina em novilhas Nelore

### Literatura Citada

- 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, p.790-793, 1998.
- BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WINKELMAN-SIM, D.C.; SCHMUTZ, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA. **Genetic Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
- 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.
- LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W.M.; BENKEL, B.B.; KNEELAND, J.; MIRETTI, M.M. **Variabilidade Genética no locus Bola-DRB3.2 de bovinos nativos e exóticos**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- OVIÉS, G. et al. Leptina y Reproducción. **Rev. Cubana Endocrinol.**, v.10, n.3, p.191-197, 1999.
- SALMAN, A.K.D. **Polimorfismo e expressão gênica da leptina em bovinos superprecoces**. Botucatu, 49p., Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.