



VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

Constituição genética de marcadores moleculares presentes na região promotora do gene da leptina em bovinos da raça Nelore

Priscila Silva Oliveira¹, Roulber Carvalho Gomes da Silva², José Bento Sterman Ferraz³, Flávio Vieira Meirelles³, Júlio Cesar Balieiro³, Joanir Pereira Eler³, Fernanda Marcondes de Rezende¹, Diego de Córdova Cucco², Elisângela Chicaroni de Mattos Oliveira³, Mínos Esperândio de Carvalho¹

¹Mestranda em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP, e-mail: pri_med_vet@hotmail.com

²Pós-graduando da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP

³Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Fac. de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP

Resumo – O objetivo deste trabalho foi caracterizar quatro marcadores SNPs localizados na região promotora do gene da leptina quanto as suas frequências genotípicas, gênicas, teste de equilíbrio *Hardy-Weinberg*, heterozigoses e diversidades alélicas. Foram utilizados 2.138 bovinos machos não castrados da raça Nelore, provenientes de duas propriedades diferentes. A caracterização e determinação dos genótipos foram obtidas por PCR em Tempo Real. A probabilidade de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) e pelo Teste Exato de Permutação. O nível de heterozigose foi calculado pela proporção de heterozigotos dentro da população e a diversidade alélica foi calculada pela proporção de heterozigotos na população quando se mantém as proporções de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. O marcador A1457G teve suas frequências, genotípica e gênica, melhores distribuídas do que os demais marcadores avaliados. O teste para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* demonstrou que as frequências genotípicas dos marcadores C963T e UASMS1 não se encontravam distribuídas em equilíbrio quando avaliados pelo teste χ^2 . O mesmo não ocorreu quando a probabilidade foi calculada pelo Teste Exato de Permutações onde todos os marcadores se apresentam distribuídos de acordo com as proporções do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Para heterozigose e diversidade alélica apenas o marcador A1457G apresentou estimativas relativamente altas.

Palavras-chave: bovinos de corte, heterozigose, SNP, variabilidade genética

Genetic constitution of molecular markers presents in the promoter leptin gene in bovines of the Nelore cattle

Abstract –The objective of this work was to describe 4 SNP markers located in the promoter leptin gene as related to their genotypic and genic frequencies, testing Hardy-Weinberg equilibrium, heterozygosity and allelic diversities. 2,138 male, non castrated, Nelore beef cattle from 2 different farms had been used. The characterization and determination of the genotypes were obtained by PCR in Real Time. Probability of

Hardy-Weinberg Equilibrium, associated with the observed genotypic frequencies had been tested by the test χ^2 (Qui-Square) and for the Exact Test of Permutation. The level of heterozygosity was calculated by the ratio of heterozygotes inside of the population and the allelic diversity was calculated by the ratio of heterozygotes in the population when the ratios for Hardy-Weinberg equilibrium remained. Marker A1457G had better genotypic and genic frequencies than others. The test for the Equilibrium of Hardy-Weinberg demonstrated that the genotypic frequencies of markers C963T and UASMS1 did not meet distributed in balance when evaluated by the test χ^2 . The same did not occur when the probability was calculated by the Exact Test of Permutations where all the markers were present in accordance Equilibrium. For heterozygosity and allelic diversity only marker A1457G presented estimates relatively high.

Keywords: beef cattle, genetic variability, heterozygosity, SNP

Introdução

Embora a idéia de seleção genética seja aumentar a proporção de genes favoráveis na população, esses genes não são de fato observados nos métodos clássicos de avaliação genética (Van der Werf, 2006). No entanto o uso dos marcadores moleculares vem de encontro com essa problemática evitando os empecilhos da avaliação de características de composição de carcaça e qualidade da carne, fornecendo informações suficientemente corretas para analisar as características de interesse nos animais. A leptina é um hormônio protéico produzida principalmente pelos adipócitos e que segundo Yamada, Kawakami e Nakanishi (2003) os níveis plasmáticos de leptina estão correlacionados significativamente com deposição de gordura (marmoreio e porcentagem de gordura).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quatro marcadores SNPs localizados na região promotora do gene da leptina quanto as suas frequências genotípicas, gênicas e quanto à variabilidade genética em uma população de bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de sangue venoso para extração de DNA de 2.138 bovinos machos não castrados da raça Nelore, provenientes de dois rebanhos, um de gado comercial e outro de gado PO. A determinação dos genótipos para os marcadores SNP foi realizada, nos Estados Unidos da América, por laboratórios licenciados pela IGENITY™. As análises de frequências gênicas e genotípicas, teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, heterozigose e diversidade alélica dos marcadores avaliados foram realizadas através do procedimento PROC ALLELE do módulo SAS/Genetics 9.1.3. A probabilidade de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* associado às frequências genotípicas observadas foram testadas pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) e pelo Teste Exato de Permutação descrito por Guo e Thompson (1992). O nível de significância adotado foi de 5%.

O nível de heterose (Het), também chamada de heterozigosidade observada, é a simples proporção de heterozigotos dentro de uma população, sendo calculada pela equação 1:

$$Het = 1 - \sum_{u=1}^k F_{uu} \quad (1)$$

em que, F_{uu} é a frequência genotípica dos homozigotos.

A diversidade alélica (Div), também chamada de heterozigose esperada, é a proporção de heterozigotos na população quando se mantém as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo calculada pela equação 2:

$$Div = 1 - \sum_{u=1}^k f_u^2 \quad (2)$$

em que, f_{iu} é frequência gênica de cada alelo.

Resultados e Discussão

As estimativas das frequências genotípicas, gênicas e as probabilidades dos Testes de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Frequências genotípicas, gênicas e probabilidades de HWE.

SNP	Frequência Genotípica	Frequência Gênica	Teste para HWE	
			χ^2	Probabilidade Exata
C963T (n=2.095)	F(CC) = 0,960 F(CT) = 0,038 F(TT) = 0,002	f(C) = 0,979 f(T) = 0,021	0,02*	0,06
A1457G (n=2.138)	F(AA) = 0,602 F(AG) = 0,340 F(GG) = 0,058	f(A) = 0,772 f(G) = 0,228	0,11	0,12
UASMS1 (n=2.116)	F(CC) = 0,001 F(CT) = 0,041 F(TT) = 0,958	f(C) = 0,022 f(T) = 0,978	0,04*	0,07
UASMS2 (n=2.108)	F(CC) = 0,995 F(CT) = 0,005	f(C) = 0,997 f(T) = 0,003	0,90	1,00

*P<0,05

A maioria dos marcadores apresentou frequência genotípica baixa para um dos alelos e em alguns casos, o alelo mais frequente se apresentou praticamente fixado na população estudada, demonstrando baixa variabilidade. O marcador A1457G teve suas frequências genotípica e gênica mais bem distribuídas entre seus genótipos e alelos que os demais marcadores avaliados, conforme demonstrado na tabela 2.

O teste da probabilidade das proporções para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* demonstrou que os marcadores C963T e UASMS1 não se encontravam em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* quando avaliados pelo teste χ^2 , mas, pelo Teste Exato de Permutações, descrito por Guo e Thompson (1992), todos os marcadores se apresentam de acordo com as proporções do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Para avaliação da variabilidade genética da população foram calculadas as estimativas de heterozigose e diversidade alélica. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Estimativas de heterozigose (Het) e diversidade alélica (Div).

Marcador	Het	Div
A1457G	0,3400	0,3521
C963T	0,0382	0,0402
UASMS1	0,0425	0,0406
UASMS2	0,0052	0,0052

É interessante observar através desses resultados que a população encontra-se com uma baixa frequência de indivíduos heterozigotos para a maioria dos marcadores avaliados nesse estudo. A diversidade alélica demonstra que a frequência de heterozigotos não apresentaria grandes alterações.

Liefers et al. (2005), analisando vacas Holandesas, relataram frequência gênica para o alelo A de 0,54 e para o alelo G de 0,46 do marcador A1457G. Para o marcador

C963T, apresentou frequência gênica para o alelo T de 0,33 e para o alelo C de 0,87. O mesmo ocorreu neste estudo onde a frequência gênica do alelo C de 0,979 superou a frequência do alelo T de 0,021 para o marcador C963T. No estudo de Schenkel et al. (2005) foram estudados os marcadores UASMS1 e UASMS2 em animais das raças Angus, Limousin, Charolês, Simental e seus cruzamentos. Para o marcador UASMS1, a frequência gênica foi de 0,61 para o alelo T e para o alelo C foi de 0,39. Para o marcador UASMS2, o alelo T apresentou frequência gênica de 0,74 e para o alelo C de 0,26.

No presente trabalho o alelo T do marcador UASMS1 foi mais freqüente que o alelo C. Este fato demonstra menor variabilidade para o marcador UASMS1 em animais da raça Nelore do que em animais de raça européia. Para o marcador UASMS2, a frequência gênica do alelo T encontrada em animais da raça Nelore foi de 0,003, ou seja, bem menor quando comparada às dos estudos em animais da raças européias.

Para o Teste para Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, os trabalhos citados acima que o realizaram utilizaram a metodologia do teste χ^2 , não encontrando desvios das proporções ($P > 0,05$). Porém, neste estudo na raça Nelore, quando utilizada essa metodologia, os marcadores C963T ($P = 0,02$) e UASMS1 ($P = 0,04$) não se apresentaram em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. O mesmo não ocorreu quando se utilizou o Teste Exato de permutação, indicado em casos em que a frequência de alguns dos alelos é muito baixa.

Analisando a heterozigose e a diversidade alélica dos diferentes marcadores neste estudo, pode-se observar que a variabilidade para a maioria dos marcadores é baixa, excluindo-se os marcadores A1457G e T945M que apresentaram valores relativamente razoáveis.

Conclusões

De acordo com os resultados descritos em bovinos de raças européias, a superioridade do alelo mais freqüente se manteve nessa população de Nelore. No entanto, a amplitude da diferença entre a frequência dos alelos foi maior na população de Nelore, demonstrando menor variabilidade nessa raça com relação aos marcadores estudados.

Literatura Citada

- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- LIEFERS, S.C. et al. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. **Animal Genetics**, v.36, p.111-118, 2005.
- SAS. **User's guide: basic and statistic**. Cary: SAS, 1995. 1.686p.
- SCHENKEL, F.S. et al. Association of single nucleotide polymorphism in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2009-2020, 2005.
- Van der WERF, J. Seleção assistida por marcador. In: KINGHORN, B.; Van der WERF, J.; RYAN, M. **Melhoramento animal: uso de novas tecnologias**. Piracicaba: FEALQ, 2006. p.151-163.
- YAMADA, T.; KAWAKAMI, S.; NAKANISHI, N. The relationship between plasma leptin concentrations and distribution of body fat in crossbred steers. **Animal Science Journal**, v.74, p.95-100, 2003.