

Identificação de polimorfismos no gene da leptina bovina

Ana Karina Dias Salman¹
Poliana Fernanda Giachetto²

A busca por marcadores moleculares para uso em seleção assistida em programas de melhoramento genético baseia-se primariamente em análises de polimorfismos localizados em genes estruturais responsáveis por manifestações de características de herança poligênica.

O gene da leptina, também conhecido como gene da obesidade, é responsável pela síntese do hormônio leptina que está envolvido com os mecanismos que regulam a ingestão, o metabolismo energético, a fisiologia reprodutiva e o sistema imunológico de mamíferos (CHILLIARD et al., 2001). Por esse motivo, é considerado um gene candidato para associação com características quantitativas de interesse econômico, como por exemplo, deposição de gordura na carcaça, precocidade sexual, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, entre outras.

O objetivo desse trabalho foi identificar a existência de polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCP) e de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) em regiões do gene da leptina amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos.

Os animais foram distribuídos em número de cinco por baia, em galpão experimental construído numa área

pertencente ao Departamento de Melhoramento Genético e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP-Botucatu (SP).

Amostras de 5,0 mL de sangue foram retiradas de bezerros machos resultantes do cruzamento entre fêmeas Nelore e touros Angus (n=31), Simental (n=30) e Canchim (n=30) provenientes de propriedades particulares do interior do Estado de São Paulo. Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas para a separação da camada de leucócitos, a qual foi utilizada para extração do DNA (MIRETTI, 1998). A precipitação do DNA foi realizada em 2,0 mL de etanol absoluto, na presença de solução saturada de NaCl (6 M). Após a retirada do sal, por lavagem com 1 mL de etanol 70%, o DNA foi dissolvido em tampão Tris-EDTA (10:1) e estocado a 4 °C. As concentrações de DNA foram estimadas a partir da leitura em espectrofotômetro a 260 nm (Beckman – DU® 640 – Nucleic Acid and Protein Analyser) e a pureza verificada medindo-se também a absorvância a 280 nm.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados com base na seqüência do gene da leptina bovina depositada no *Genbank* (AC: U50365). As seqüências e as posições desses *primers*, com o nome e o tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases (pb), são apresentadas na Tabela 1.

¹ Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, aksalman@cpafro.embrapa.com.br

² Zootecnista, D.Sc., pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP, poliana@cnptia.embrapa.br

Tabela 1. Seqüências e posições dos pares de iniciadores (*primers*) com os respectivos nomes e tamanhos, em pares de bases (pb), dos fragmentos do gene da leptina bovina (U50365) amplificados por PCR.

Nome do fragmento	Seqüência dos iniciadores	Posição	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de associação dos <i>primers</i>
LEPT 1	5' -TTGCCTCCTGCCTTCTCACTC- 3' 5' -CCTGGTGGCTCAGACGGTAAA- 3'	1402 2046	644	67 °C
LEPT 2	5'-TCTTTACCGTCTGAGCCACCA- 3' 5'-GCCACCCACAGCAATCAATC- 3'	2023 2505	482	66 °C
LEPT 3	5'-GGAAGGGCAGAAAGATAGGAGC- 3' 5' -AGGAGGAGCGAGAGAGAAATGGC- 3'	2803 3492	689	68 °C

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 30 μ L, contendo 160 ng de DNA, 0,75 μ M de cada primer, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl), 250 μ M de dNTP, 0,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase, em termociclador. O programa de amplificação consistiu de um ciclo para desnaturação inicial a 96 °C por 120 segundos, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 96 °C por 30 segundos, associação dos *primers* a X °C por 80 segundos, e extensão a 72 °C por 60 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos, em que X variou de acordo com o par de *primers* utilizado (Tabela 1).

A análise de PCR-SSCP foi aplicada aos fragmentos LEPT 1 e LEPT3. Para tanto, alíquotas de 2 a 5 μ L do fragmento amplificado por PCR foram diluídas, para um volume final de 10 μ L, em tampão de corrida para SSCP. Em seguida, foram desnaturadas a 96 °C por 6 minutos, incubadas no gelo por igual intervalo de tempo, aplicadas em gel de poliacrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 49:1) 15% sob condições não desnaturantes e submetidas à eletroforese (100 V) por 13 (LEPT 1), 15 (LEPT 2) e 20 (LEPT 3) horas. O fragmento

LEPT 7 foi separado em gel de poliacrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 49:1) 10%, a 100V por 24 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata para visualização das bandas.

A análise PCR-RFLP para detecção do polimorfismo descrito por Pomp et al. (1997) foi aplicada ao fragmento LEPT 2 utilizando a enzima de restrição *Sau3*AI. Para tanto, utilizou-se 10 μ L de amostra do fragmento amplificado por PCR, 1/10 do volume de tampão de reação e 3 U de enzima, para volume final de reação de 20 μ L. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese (100 V por 2 horas) em géis de agarose 1,8%, 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 100 pares de bases.

Na Fig. 1 está esquematizado o gene da leptina baseado na seqüência depositada no *Genbank* e nas informações de Taniguchi et al. (2002), com as posições dos exons e íntrons, bem como dos fragmentos amplificados e do sítio de restrição da enzima *Sau3*AI.

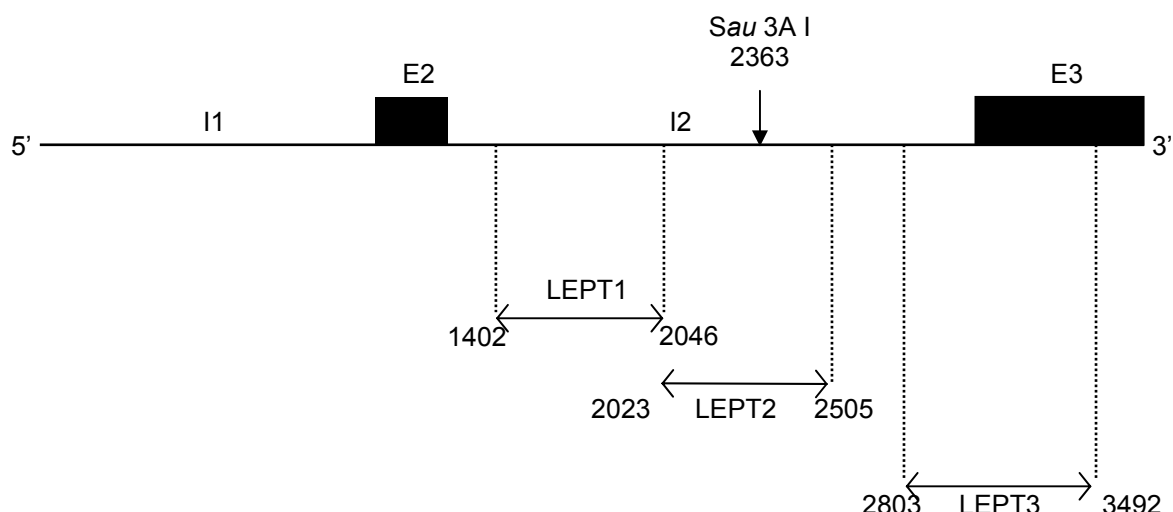


Fig 1. Mapa do gene da leptina bovina baseado na seqüência depositada no *Genbank* (AC: U50365) e nas informações de Taniguchi et al. (2002), com as posições dos *primers*, os nomes dos fragmentos amplificados e o sítio da enzima de restrição *Sau3*AI (E=exon, I=íntron).

As freqüências genótípicas foram estimadas conforme o procedimento descrito por Weir (1990). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para o RFLP-*Sau3AI* pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

Pela análise de PCR-RFLP verificou-se fragmentos de 340 e 142 pb que caracterizaram o alelo A. Um sítio adicional para a enzima *Sau3AI* na posição 2335 foi responsável pela digestão do fragmento de 340 pb em dois fragmentos de 312 pb e 28 pb (não visível no gel), os quais caracterizaram o alelo B. Na Tabela 2 são apresentadas as freqüências genótípica e alélica do RFLP no fragmento LEPT2 do gene da leptina dentro das populações estudadas, bem como os seus respectivos valores de χ^2 . Pode-se observar que as freqüências do alelo A e do genótipo homocigoto AA foram as maiores nas três populações estudadas. O grupo Simental x Nelore apresentou maior freqüência do genótipo heterocigoto (AB) e no grupo Canchim x Nelore não foi observado o genótipo homocigoto BB.

Tabela 2. Freqüências genótípica e alélica observadas em cada um dos grupos genéticos estudados com seus respectivos valores de Qui-quadrado calculados.

Grupo genético	n	Freqüência genótípica (%)			Freqüência alélica (%)		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
Angus x Nelore	31	84	13	3	90	10	0,15
Canchim x Nelore	30	87	13	0	93	7	2,12
Simental x Nelore	25	68	24	8	80	20	1,56

n = número de animais do grupo genético.

Como não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os valores do χ^2 calculados para cada um dos grupos experimentais e o valor do χ^2 tabelado, concluiu-se que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O resultado da análise SSCP realizada com o fragmento LEPT1 demonstrou ausência de variação entre os animais dos três grupos genéticos. A Fig. 2 traz o resultado da análise de SSCP realizada no fragmento LEPT3, em que foi verificada a existência de três alelos (A, B e C) e cinco genótipos (AA, AB, CC e CB) nessa região do gene. Na Tabela 3 são apresentadas as freqüências genótípicas desses genótipos. Os genótipos AA e AB foram os mais freqüentes em todos os grupos experimentais. O genótipo CB não foi observado entre os animais Angus x Nelore e nem entre os Simental x Nelore, assim como o genótipo BB não foi observado no grupo Canchim x Nelore.

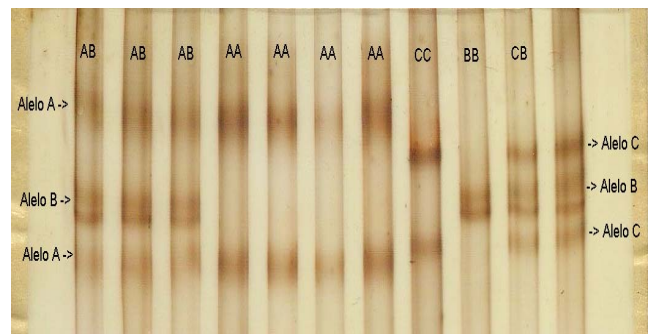


Fig. 2. Gel representativo do SSCP mostrando o padrão de migração das fitas simples de DNA do fragmento LEPT3 de animais heterocigotos para os alelos A e B (AB), homocigotos para o alelo A (AA), homocigotos para o alelo C (CC), homocigotos para o alelo B (BB) e heterocigotos para os alelos B e C (CB).

Tabela 3. Freqüências dos genótipos SSCPs no fragmento LEPT3 do gene da leptina de novilhos pertencentes aos três grupos genéticos.

Genótipos	Grupo genético					
	Angus x Nelore		Canchim x Nelore		Simental x Nelore	
	N	%	n	%	N	%
AB	6	20,7	5	17,9	11	40,7
AA	17	58,6	19	67,9	12	44,4
CC	5	17,2	2	7,1	2	7,4
BB	1	3,4	0	0,0	2	7,4
CB	0	0,0	2	7,1	0	0,0
Total	29	100	28	100	27	100

Para cada uma das populações estudadas, observou-se que os polimorfismos observados segregam independentemente ($p < 0,05$) e, na ausência de desequilíbrio de ligação não foi possível estabelecer haplótipos predominantes nas populações.

O RFLP-*Sau3AI* já foi associado com características produtivas em rebanho leiteiro por Liefers et al. (2002), que avaliando uma população de 613 vacas leiteiras Holstein-Friesian, observaram aumento na produção de leite ($P < 0,05$) e tendência de aumento na ingestão de matéria seca ($P = 0,087$) e de peso vivo ($P = 0,077$) das vacas heterocigotas AB quando comparadas às vacas do genótipo AA. Estudando esse mesmo polimorfismo em 145 machos da raça Holandesa, Oprzadek et al. (2003) encontraram relação significativa entre o genótipo AA e o consumo, o peso de carcaça e a deposição de gordura na carcaça.

Apesar das transições de citosina por timina na posição 1560 e de guanina por adenina na posição 1620 (considerando a seqüência U50365) terem sido descritas por Lien et al. (1997) e detectadas por Tessane et al. (1999) numa população de 137 bovinos da raça Angus, neste estudo não foram detectados SSCPs no fragmento LEPT1 que corresponde a essa mesma região dentro do íntron 2,

o que indica a baixa variabilidade genética nessa região do gene da leptina entre os animais genotipados no presente estudo.

Considerações finais

O gene da leptina bovina apresenta polimorfismos do tipo RFLP e SSCP nas regiões do íntron 2 e do exon 3, respectivamente, em populações de bovinos resultantes do cruzamento entre fêmeas Nelore e touros Angus, Canchim e Simental. Tais polimorfismos podem ser avaliados em populações de bovinos de corte maiores visando à associação com características produtivas e reprodutivas.

Referências

- CHILLIARD Y, BONNET M, DELAUAUD C, FAULCONNIER Y, LEROUX C, DJIANÉ J, BOCQUIER F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Anim Endocrinol.*, v.21, n. 4, p.271-295, nov. 2001
- LIEFERS, S. C. ; TE PAS, M F. W. ; VEERKAMP, R. F. ; VAN DER LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. *Journal of dairy science*, v. 85, n.6, p. 1633-1638, 2002.
- 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. 238-246, 1997.
- MIRETTI, M.M. **Variabilidade genética no locus BoLA-DRB3.2 de bovinos nativos e exóticos.** Ribeirão Preto, 98p. Dissertação, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 1998.
- OPRZĄDEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L.; DYMNIKI, E. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STA-T5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. *Animal Science Papers and Reports*, v. 21, n. 3, p.135-145, 2003.
- POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A. C.; BARENDSE, W. Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *J. Anim. Sci.*, v. 75, p. 1427, 1997.
- TANIGUCHI, Y. ; ITOH, T. ; YAMADA, T. ; SASAKI, Y. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. *IUBMB Life*, v. 53, n. 2, p. 131-135, 2002.
- TESSANNE, K. ; HINES, H. C.; DAVIS, M. E. Relationships of polymorphisms in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. Columbus: The Ohio State University, 1999. (Research and Reviews: Beef and Sheep. Special Circular, 170). Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170_6.html>. Acesso em: 10 Maio 2007.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data.** Massachusetts: Sinauer Associates, 1990, 377 p.

Comunicado Técnico, 336

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Rondônia
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406,
CEP 78900-970, Porto velho, RO.
Fone: (69)3901-2510, 3225-9387
Telefax: (69)3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2008): 100 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Cléberson de Freitas Fernandes
Secretária: Marly de Souza Medeiros
Membros: Abadio Hermes Vieira
André Rostand Ramalho
Luciana Gatto Brito
Michelliny de Matos Bentes-Gama
Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Expediente

Normalização: Daniela Maciel
Revisão de texto: Wilma Inês de França Araújo
Edição eletrônica: Marly de Souza Medeiros