

ANÁLISE DE UM POLIMORFISMO GENÉTICO NO GENE DA LEPTINA EM BOVINOS DA RAÇA CHAROLÊS

FABRÍCIO HOFFELDER BORTOLANZA¹, SABRINA ESTEVES MATOS ALMEIDA², GUSTAVO TERRA³, JAIRO PEREIRA NEVES^{3,4}, DANIEL THOMPSEN PASSOS⁵, TANIA AZEVEDO WEIMER^{2,6}

RESUMO

Este trabalho investigou o SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo) C → T, no exon 2 do gene da leptina em bovinos da raça Charolês, avaliando o papel do mesmo sobre o ganho médio de peso diário. Observou-se, em uma amostra de 83 animais, as frequências de 0,6 e 0,4 para os alelos C e T, respectivamente. Não se verificaram diferenças estatisticamente significantes entre os genótipos, sugerindo que este marcador não tem efeito sobre a conversão alimentar desses animais. Assim, este polimorfismo não é apropriado para a seleção assistida por marcadores, nesta população.

Palavras-chave: bovinos, ganho de peso, marcador molecular, SNP

¹Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - Bolsista PROICT/ULBRA

²Departamento de Genética/UFRGS

³Departamento de Clínica de Grandes Animais/UFSM

⁴União Educacional do Planalto Central

⁵Professor do Curso de Medicina Veterinária /ULBRA

⁶Professora - orientadora do Curso de Biologia/ ULBRA

ABSTRACT

This investigation analyzed the SNP (single nucleotide polymorphism) C → T, at exon 2 of the leptin gene, in a bovine Charolais herd, evaluating its relationship with the average dairy gain weight. In a sample of 83 animals, the frequencies of C and T alleles were 0.6 and 0.4, respectively. No statistic differences were verified between genotype classes and average gain weight, suggesting that this marker does not have effect on alimentary conversion, in these animals. Therefore this polymorphism is not a good marker for marked assisted selection, in this population.

Key words: cattle, dairy weight gain, molecular marker, SNP

INTRODUÇÃO

Seleção assistida por marcadores (MAS) é uma técnica baseada no emprego de polimorfismos moleculares para auxiliar a seleção fenotípica clássica, através da identificação de indivíduos potencialmente mais produtivos. Isto possibilita a seleção precoce, antes do desenvolvimento das características de interesse. A aplicação da MAS, no entanto, passa primeiro pela fase de identificação, onde são localizados, no rebanho alvo, polimorfismos que sirvam como marcadores para característica produtiva desejada (DAVIS & DENISE, 1998). A eficiência da MAS depende, no entanto, da proximidade cromossômica entre o polimorfismo e a característica a ser investigada, da magnitude e natureza dos efeitos quantitativos e da ocorrência de desequilíbrio de ligação entre o loco marcador e o QTL.

Em vertebrados, especialmente entre mamíferos, a habilidade em armazenar grandes quantidades de energia na forma de tecido adiposo permite a sobrevivência durante períodos prolongados de falta de alimento. Para manter seu estoque de energia sem sofrer contínuas alterações em sua morfologia, um animal precisa ter um balanço entre o acúmulo e o gasto energético (FRIEDMAN,

1997). A Leptina, o produto do gene *obese*, é uma proteína de 167 amino-ácidos que é produzida pelos adipócitos e detectada por receptores especiais no cérebro, que, em resposta, levam o hipotálamo a suprir o apetite e aumentar o metabolismo para queimar mais gordura, atuando como hormônio no controle da saciedade no metabolismo energético (AUWERX & STAELS, 1998; BARSH et al., 2000). A seqüência genômica da leptina bovina é composta de 4067 pares de bases, distribuídos em 3 exons e 2 introns (Genbank, nº de acesso U50365).

Segundo BUCHANAN et al. (2002), estudos "in vitro", sugerem que a leptina pode modular diretamente o metabolismo de energia em tecidos periféricos e deve antagonizar atividades da insulina no tecido adiposo e muscular. Tais propriedades fisiológicas apóiam o gene da leptina como forte candidato para o estudo do desempenho produtivo, já que pode afetar o conteúdo de gordura na carcaça de bovinos.

No exon 2 do gene da leptina foi descrito devido um SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo) caracterizado por uma transição C → T, na 1ª base do 25º códon. Esta mutação pontual leva uma mudança de aminoácido, Arg → Cys (BUCHANAN et al., 2002).

Este trabalho se propõe investigar este polimorfismo em bovinos da raça Charolês, avaliando o papel do mesmo sobre o ganho médio de peso diário, visando posterior utilização para MAS.

MATERIAL E MÉTODOS

A raça Charolês é formada por bovinos de origem europeia (*Bos taurus*), criados comercialmente para a produção de carne. A amostra é constituída por 83 vacas, oriundas de uma propriedade da região central do estado do Rio Grande do Sul. Esses animais foram submetidos a um experimento a campo realizado pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As vacas foram divididas em dois lotes, mantidos em dois campos nativos com diferentes ofertas forrageiras: o primeiro com 960 kg de matéria seca por hectare (MS/ha), com uma lotação de 0,96 equivalente vaca por hectare (EV/ha; EV=400 k), e o segundo, com oferta forrageira de 600 kg MS/ha e lotação de 1,44 EV/ha. Nos dois grupos, houve animais ganhando e perdendo peso, o que sugere que fatores independentes da oferta de alimento poderiam estar atuando, possivelmente de origem genética.

O sangue dos animais foi coletado por punção da veia jugular, com anticoagulante e o DNA foi extraído segundo a técnica de PLANTE et al. (1992). O polimorfismo foi investigado por amplificação dos DNAs através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se primers e condições de reação conforme descrito por BUCHANAN et al. (2002). Os produtos de amplificação, de 94 pb, foram clivados com enzima de restrição, usando-se, no entanto, ao invés da endonuclease empregada por

aquele autor (Acil) o isoesquisômero *Kpn2I*. Os resultados da clivagem foram analisados em gel de agarose 3,0 % (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Os indivíduos portadores do alelo C tiveram seu DNA clivado por esta enzima, gerando produtos de 75 e 19 pb.

Os testes de associação entre os genótipos dos animais e o ganho médio de peso diário foi realizada por análise da variância (ANOVA), com um critério de classificação (one-way), através do programa SPSS® para windows™.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As distribuições de frequências genotípicas e alélicas dos indivíduos desta amostra constam da Tabela 1, podendo-se observar que o alelo C apresenta, aproximadamente, o dobro da frequência do alelo T. Em quatro outras raças bovinas mundiais investigadas para este marcador, a ocorrência do alelo C variou de 0,42 em Angus a 0,68 em Simmental, sendo o valor observado para o Charolês (0,66) muito similar ao aqui encontrado (BUCHANAN et al., 2002).

A análise descritiva das médias e erros padrões dos indivíduos, de acordo com os genótipos e o resultado da ANOVA são apresentados na Tabela 2.

Através desta análise pode-se verificar que os heterozigotos apresentam ganho médio de peso diário mais elevado e os homozigotos TT mais baixo, embora essas diferenças não são estatisticamente significantes .

De acordo com BUCHANAN et al. (2002) o alelo C estaria associado a carcaças mais magras enquanto o alelo T, a carcaças mais gordas. As diferenças entre as duas investigações são provavelmente devidas ao fato de que os dois parâmetros estimados não são totalmente equi-

valentes. Nesta investigação, avaliou-se o ganho médio de peso diário e aqueles autores avaliaram a quantidade de gordura na carcaça, nos animais prontos para o abate, independente do tempo que os mesmos levaram para alcançar a terminação.

Tabela 1 - Frequências genotípicas e alélicas.

| Genótipos | Nº | Frequência |
|-----------|------------|------------|
| C/C | 33 | 0,40 |
| C/T | 38 | 0,46 |
| T/T | 12 | 0,14 |
| Total | 83 | |
| Alelos | Frequência | |
| C | 0,63 | |
| T | 0,37 | |

Tabela 2 - Médias e erros padrão do ganho médio de peso diário e resultado da análise de variâncias.

| Genótipo | Nº | Média | Erro padrão | P |
|----------|----|-------|-------------|-----|
| CC | 33 | 207,1 | 36,0 | 0,4 |
| CT | 38 | 268,3 | 39,7 | |
| TT | 12 | 194,6 | 66,2 | |
| Total | 83 | 233,3 | 25,0 | |

Teste a priori para homogeneidade das variâncias, $p = 0,7$.

CONCLUSÕES

O SNP caracterizado por mudança C → T, no exon 2 do gene da leptina, parece não estar envolvido com a conversão alimentar, nesta população, avaliada pelo ganho médio de peso diário, em diferentes condições nutricionais.

O fato de não se observar associação entre um determinado polimorfismo e uma caracte-

rística de interesse não constitui um desestímulo a este tipo de investigação, e, muito pelo contrário, funciona como um desafio à procura de outros marcadores. Como as características produtivas são multifatoriais, dependendo simultaneamente de vários fatores genéticos e ambientais, o importante é que as pesquisas sejam direcionadas na localização de polimorfismos que permitam identificar, apropriadamente, os genes candidatos.

A não ocorrência de associação, não exclui o gene da leptina com um bom candidato, devido ao seu importante papel no mecanismo de sensação da saciedade e conversão alimentar. Torna-se assim importante a investigação de outros polimorfismos (SNPs ou microssatélites) dentro do gene da leptina ou a ele ligados e que possam auxiliar na identificação de animais com maior potencial para ganho de peso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUWERX, J. ; STAELS, B. Leptin. **The Lancet**, v.351, p. 737-742, 1998.

BARSH, G.S.; FAROOQI, S. ; O'RAHILLY, S. Genetics of body-weight regulation. **Nature**, v.404, p.644-651, 2000.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A. G. Association of a minisense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p.105-116, 2002.

DAVIS, G.P. ; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 2331-2339, 1998.

FRIEDMAN. O Papel da Leptina e de seus Receptores no Metabolismo da Gordura. In: SOARES, M. A. M.; GUIMARÃES, S. E. F. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997.

PLANTE, Y.; SCHMUTZ, S. M. ; LANG, K. D. M. Restriction fragment length polymorphism in the mitochondrial DNA of cloned cattle. **Theriogenology**, v. 38, p. 897-904, 1992.

SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.