

POLIMORFISMO DO GENE LEPTINA (SNP305) EM BOVINOS E SUA IMPLICAÇÃO NA MACIEZ DE CARNE

LEPTIN GENE POLYMORPHISM (SNP305) IN CATTLE AND ITS RELATIONSHIP IN THE TENDERNESS OF THE MEAT

Efeito do SNP305 do gene leptina na maciez de carne bovina

M. A. C. Lara^{1*}, E. Pinatti¹, M. H. Faria², F. D. Resende², A. J. Pivetta¹, G. Gutmanis¹, A. Cavalcante Neto^{1,3}

¹SAA, APTA - Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 60, 13.460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. *malara@iz.sp.gov.br.

²APTA /DDD - Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, Colina, SP.

³Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil, UA /CESAM /Portugal.

Palavras-chave:

PCR-RFLP
Marcador genético
Qualidade de la carne
Recursos genéticos

Keywords:

PCR-RFLP
Genetic marker
Meat quality
Animal genetic resources

Abstract: It has been reported significant effects of leptin gene on features of commercial interest, especially the deposition of fat in the meat, meat marbling, percentage of milk fat, milk production, sexual precocity, energy expenditure and some immune system functions. Due to its importance, the polymorphism in exon 2 of leptin gene (SNP305 - ANY138588) was investigated by PCR-RFLP using the enzyme *Kpn2I*, in 352 cattle belonging to the breeds Aberdeen Angus, Hereford, Nelore and Caracu. The shear force (FC) was analyzed including the fixed effects of genotypes (CC, CT, TT), genetic group and, as a covariate, the age at slaughter or batch. The results showed that TT genotype animals had lower FC values ($P < 0.05$). Heterozygotes had, on average, more meat tenderness in -0.2345 kg and TT homozygotes, -0.469 kg. The TT genotype was not detected in Nelore cattle, and Caracu, genotype frequencies of CC, CT and TT were 0.2340, 0.5957 and 0.1703, respectively. The results observed in cattle Caracu could indicate the great potential of these breed and other natives and Criollos to produce quality meat.

Resumen

Efeitos significativos do gene leptina foram observados em algumas características de interesse comercial, tais como: deposição de gordura na carcaça, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, precocidade sexual, balanço energético e algumas funções do sistema imunológico. Devido a sua importância, o polimorfismo no exon 2 do gene leptina (SNP305 - ANY138588) foi investigado pela técnica de PCR-RFLP empregando-se a endonuclease *Kpn2I*, num total de 352 bovinos das raças Aberdeen Angus, Hereford, Nelore e Caracu. A força de cisalhamento (FC) foi analisada incluindo os efeitos fixos de genótipos (CC, CT, TT), grupos genéticos (Aberdeen Angus, Hereford) e, como covariável, a idade ao abate ou lote. Os resultados obtidos demonstram que os animais de genótipo TT apresentaram valores menores de FC ($P < 0,05$) em relação aos demais genótipos. Os heterozigotos tiveram, em média, carnes mais macias em -0,2345 kg e os homozigotos TT, -0,469 Kg. O genótipo TT não foi detectado no gado Nelore e, no Caracu, as frequências genotípicas de CC, CT e TT foram 0,2340, 0,5957 e 0,1703, respectivamente. Os resultados observados no presente estudo sugerem que o gado Crioulo e outras raças nativas brasileiras devem apresentar um grande potencial para produção de carne com qualidade, por apresentarem similaridade com o gado Caracu.

Introdução

As informações de marcadores moleculares associados a genes envolvidos no controle genético de características de difícil avaliação, como é o caso da maciez de carne, têm sido de grande importância para a indústria de carne. Com o uso de marcadores moleculares, o sacrifício do animal para avaliação fenotípica é dispensável, além de permitir a previsão precoce do potencial genético do animal para produção de carne com qualidade.

A Leptina é um hormônio protéico produzido principalmente pelo tecido adiposo e, o aumento no número de adipócitos resulta no aumento da concentração de leptina periférica (Geary et al., 2003). Esse hormônio está envolvido com os mecanismos que regulam a ingestão, o metabolismo energético, a fisiologia reprodutiva e o sistema imunológico dos mamíferos (Campfield et al., 1995; 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, maciez de carne, precocidade sexual, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, entre outras.

A leptina é codificada pelo gene *obese* (*ob*), localizado no cromossomo bovino 4, que consiste de três exons, estando as regiões codificadoras nos exons 2 e 3 (Lagonigro et al., 2003). Essa região corresponde a 18,9 kb do genoma, sendo a sua organização exon-ínton muito conservada entre camundongos, humanos e bovinos (Taniguchi et al., 2002).

Em bovinos, diversos estudos moleculares do gene que codifica para Leptina revelaram a presença de polimorfismos de base única (SNP *Single Nucleotide Polymorphism*) (Pomp et al., 1997; Konfortov et al., 1999; Haegeman et al., 2000), alguns dos quais foram associados à deposição de gordura na carcaça de bovinos de corte (Buchanan et al., 2002) e com características de balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade em gado leiteiro (Liefers et al., 2002). Devido à sua importância, o SNP305 no exon 2 do gene leptina foi investigado visando verificar a sua variabilidade em algumas raças representativas da Pecuária Brasileira bem como conhecer a sua relação com maciez de carne em raças bovinas Europeias especializadas para corte.

Material e métodos

O polimorfismo de base única (SNP305) no exon 2 do gene leptina (Acesso AY138588) foi investigado num total de 352 bovinos, pertencentes ao grupo de raças europeias especializadas (Aberdeen Angus (N=100) e Hereford (N=110)), nativa brasileira (Caracu N=82) e zebuína (Nelore N=60).

Nas raças europeias, originárias do Estado do Rio Grande do Sul (Aberdeen Angus e Hereford), amostras de 2,5 cm do músculo *Longissimus dorsi* entre a 12^a e 13^a costelas foram coletadas, após 24 horas de resfriamento das carcaças em câmaras frias do abatedouro Mercosul, Bagé - RS. Essas amostras foram embaladas a vácuo e mantidas a -4°C, até o momento de suas avaliações. As análises físicas da maciez da carne foram realizadas com base na força de cisalhamento (FC) com a utilização do aparelho do tipo Warner-Bratzler Shear.

As análises do SNP305 foram realizadas pela técnica de PCR-RFLP, segundo Buchanan et al., (2002). As reações de PCR foram realizadas num volume de 25µL, contendo 50 ng de DNA, 0,20 mM de cada dNTP, 0,15 µM de cada *primer* (5'-ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC-3' e 5'- TGGTGTTCATCCTGGACCTTCC-3'), 1,5 mM de MgCl₂, 1 x tampão de PCR (20 mM de Tris-HCL, 50 mM em KCl, pH 8,4) e 1 unidade de *Taq DNA polimerase*. Para a amplificação utilizou-se uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 55 segundos, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 3 minutos. Para as análises de RFLP, alíquotas de 8 µL do produto amplificado foram digeridas com 2 unidades da endonuclease *Kpn2I* (T[^]CCGGA) a 55 °C durante 3 horas. A identificação dos fragmentos de restrição foi realizada por eletroforese em gel 10% em poliacrilamida (49:1), submetido à técnica de coloração com nitrato de prata. As frequências alélica e genotípica foram estimadas empregando-se o programa Genepop (Raymond y Rousset, 1995).

Para avaliar as implicações do SNP305 na maciez de carne, os dados referentes à FC foram analisados, utilizando-se um modelo que incluiu os efeitos fixos de genótipo SNP305 (CC, CT, TT), grupo genético (Aberdeen Angus, Hereford) e, como covariável, a idade ao abate. Para a avaliação do efeito de substituição do alelo favorável, os genótipos foram codificados como -1, 0 e 1, o que correspondia ao animal ter 0, 1 e 2 cópias do alelo C, sendo esse efeito testado pela razão de verossimilhança do modelo contendo o efeito alélico em relação ao modelo reduzido, sem o efeito alélico. Os valores de p (p-value) foram obtidos de uma distribuição de qui-quadrado com dois graus de liberdade para os valores de -2 vezes a razão do *log* da verossimilhança.

Resultado e discussões

A técnica de PCR/RFLP permitiu investigar a substituição de citosina por timina no nucleotídeo 305, que resulta na modificação de arginina por cisteína no hormônio protéico Leptina (Buchanan et al., 2002). O produto de amplificação de 94pb, quando submetido à digestão enzimática com *Kpn2I*, revelou duas formas alélicas. O alelo C foi caracterizado pela presença de um sítio de restrição, resultando em dois fragmentos (75pb e 19pb). O alelo T, por não apresentar sítio de restrição para *Kpn2I*, foi caracterizado por um único fragmento (94pb). Os

homozigotos CC apresentaram os fragmentos com 75pb e 19pb, os homozigotos TT, apenas o fragmento de 94pb e, os heterozigotos CT, os três fragmentos correspondentes aos referidos alelos (94, 75 e 19 pb).

Como pode ser visto na tabela I, o alelo favorável T foi mais frequente nas raças européias (Aberdeen Angus e Hereford), que produzem carnes com maior marmorização em relação as raças zebuínas (Gir, Guzerá, Nelore), variando de 0,0682 (Nelore) a 0,6136 (Herford). Na raça nativa Caracu, o alelo T ocorreu em frequências intermediárias. As estimativas de frequências alélicas estimadas para as raças européias foram muito similares às relatadas por Buchanan et al. (2002). Esses autores, estudando raças européias verificaram que o alelo T estava associado com carcaças mais gordas e com maior expressão de leptina em raças britânicas (Angus e Hereford) e, o alelo C, associado com carcaças magras e baixa expressão de leptina em raças continentais (Charolês e Simental).

Tabela I. Frequências alélicas e genótípicas para SNP305 do gene Leptina estimadas para seis raças bovinas (*Allelic and genotypic frequencies of SNP305 of leptin gene estimated for six cattle breeds*)

Raças bovinas	N	Frequência alélica			Frequência genotípica		
		C	T	CC	CT	TT	
Aberdeen Angus	122	0,4390	0,5610	0,1220	0,6341	0,2439	
Hereford	110	0,3864	0,6136	0,1455	0,4818	0,3727	
Caracu	60	0,5319	0,4681	0,2340	0,5957	0,1703	
Gir*	49	0,8674	0,1326	0,7551	0,2245	0,0204	
Guzerá*	46	0,9022	0,0978	0,8261	0,1522	0,0217	
Nelore	67	0,9318	0,0682	0,8636	0,1364	0	

*Lara et al., 2008.

Segundo Konfortov et al. (1999), o alelo T está presente em raças taurinas, em frequência próximas a 0,41, não ocorrendo em raças indianas, onde o alelo C parece estar fixado. Em estudos anteriores, Lara et al. (2008), verificaram a ocorrência do alelo T no gado Gir e Guzerá em frequências muito baixas (tabela I). Esse resultado poderia indicar que o alelo T possa ser considerado um bom marcador de raças européias já que sua ocorrência é muito pequena no gado zebu. Assim sendo, as frequências genótípicas estimadas no presente estudo estão de acordo com a literatura, uma vez que não foram detectados homozigotos TT no gado Nelore. No gado Caracu, ao nosso conhecimento, o SNP305 não havia sido investigado, cujos resultados observados poderiam incentivar a criação de algumas raças nativas em perigo de extinção, agregando valores comerciais a esses recursos genéticos e outros Crioulos da América do Sul, por apresentarem grande similaridade genética com o gado Caracu.

A análise de variância revelou diferenças significativas de genótipos ($P < 0,0148$) na força de cisalhamento em relação às amostras de carne provenientes dos animais de origem européia (Aberdeen Angus e Hereford), cujos valores médios de FC estimados para cada genótipo (CC, CT, TT) foram: $3,26 \pm 0,16$, $3,37 \pm 0,09$ e $2,84 \pm 0,11$, respectivamente. Esses resultados permitiram investigar o efeito médio de substituição, observando-se uma estimativa para a presença de um alelo "T" de $-0,2345$ kg na força de cisalhamento ($P = 0,0114$). Neste caso, os indivíduos heterozigotos apresentaram, em média, carnes mais macias em $-0,2345$ kg e, os homozigotos TT, em $-0,469$ Kg, quando comparados aos indivíduos de genótipo CC.

A leptina controla a deposição de gordura subcutânea e intramuscular, afeta a terminação do animal para peso de abate e a palatabilidade da carne, aumentando a maciez e a suculência da carne (Geary et al., 2003). Portanto, os resultados obtidos sugerem que o SNP305 pode auxiliar a identificação de animais com potencial para produção de carcaças com bom acabamento, afetando indiretamente a qualidade da carne bovina.

Agradecimentos y financiación

À FAPESP, pelo apoio financeiro, e ao Frigorífico MERCOSUL, pelas amostras de carne investigadas no presente estudo.

Projeto IZ-NRP: 2737, desenvolvido com apoio financeiro FAPESP 05/54460-6.

Bibliografía

- Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel A.G. et al. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic Selection Evolution* 34: 105-116.
- Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R. and Burn P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549.
- Chilliard Y., Bonnet M., Delavaud C., Faulconier Y., Leroux C., Djiane J. and Bocquier F. (2001) Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology* 21: 271-295.
- Geary T.W., McFadin E.L., MacNeil M.D. et al. (2003). Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *Journal of Animal Science* 81:1-8.
- Haegeman, A., Van Zeveren, A. and Peelman, L.J. (2000) New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics* 31:70.
- Konfortov, B.A., Licence, V.E. and Miller, J.R. (1999) Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mammalian Genome* 10: 1142-1143.
- Lagonigro R., Wiener P., Pila F., Woolliams J. A. and Williams J. L. (2003) A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics* 34: 371-374.
- Lara, M.A.C., Fiorini, L.C., Resende, F.D., Siqueira, G.R., Faria, M.H., Signoretti, R.D. and Machado, J.P.M. (2008) Polimorfismo no exon 2 do gene leptina pela técnica de PCR/RFLP em bovinos. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, Salvador.
- Liefers, S.C., Te Pas, M.F.W., Veerkamp, R.F. and Van Der Lende, T. (2002) Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 85: 1633-1638.
- Pomp, D., Zou, T., Clutter, A. C. and Barendse, W. (1997) Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal Animal Science* 75: 1427.
- Taniguchi, Y., Itoh, T., Yamada, T. and Sasaki, Y. (2002) Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. *IUBMB Life* 53: 131-135.
- Raymond, M and Rousset, F. (1995) GENEPOP: a population genetics software for exact test and ecumeinism. *Journal of Heredity* 86:248-249.