

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RAÇAS NATIVAS E COMERCIAIS DE OVINOS COM BASE EM SNPs NO GENE LEPTINA

GENETIC CHARACTERIZATION OF NATIVE AND COMMERCIAL SHEEP BREEDS BASED ON SNPs IN LEPTIN GENE

Lara M.A.C.^{1*}, Gutmanis G.¹, Soares W.V.B.¹, Rocha L.A.², Cunha E.A.¹, Cavalcante-Neto A.³, Silva R.C.B.⁴, Ribeiro M.N.⁴, Herling V.R.⁵

¹Instituto de Zootecnia. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA. Nova Odessa, SP, Brasil. *malara@iz.sp.gov.br

²Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UFRPE, Serra Talhada, PE, Brasil.

³Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Porto Velho, RO, Brasil

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁵Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP, Pirassununga, SP, Brasil.

Abstract

The leptin gene has been investigated in several animal species due to their relationship with quantitative characteristics of economic interest, such as: fat deposition in carcass, sexual precocity, percentage of fat in milk, milk production, among others. Due to its importance, polymorphisms in exons 2 and 3 of leptin gene were investigated in 415 sheep from native breeds (Barriga Negra, Cara Curta, Cariri, Morada Nova, Santa Inês), commercial breeds (Dorper, Ile France, Poll Dorset, Suffolk, Texel) and a crossbred (Dorper x Santa Inês). For the study of exons 2 and 3 were adopted, respectively, the techniques of PCR-RFLP and PCR-SSCP. Only the SNP305 of exon 2 was observed in populations of native breeds (except Barriga Negra), commercial (Dorper) and crossbred (Dorper x Santa Inês). The allele C was the most common, whose frequencies ranged from 0.9783 (Santa Inês) to 0.8649 (Dorper). The PCR-SSCP analysis of exon 3 (Lep3) revealed four genotypes. In all populations investigated, except Morada Nova, the genotype AA was the most frequent and the genotype AB, the least frequent. The genotype AC occurred in all native breeds, whose frequencies ranged from 0.4348 (Morada Nova) to 0.075 (Cariri). In commercial breeds, this genotype was detected only in Dorper (0.3784). The genotype CC occurred in Morada Nova and Dorper breeds and crossbred, whose frequencies were 0.4783, 0.0273 and 0.0182, respectively. Considering that leptin is involved in several metabolic processes, the genotypic differences in the composition should be investigated more extensively in an attempt to get a marker for sheep production.

Keywords:

PCR-RFLP
PCR-SSCP
Molecular marker
Polymorphism

Palavras chave:

PCR-RFLP
PCR-SSCP
Marcador molecular
Polimorfismo

Resumo

O gene leptina tem sido muito investigado em diversas espécies animais por estar relacionado com características quantitativas de interesse econômico, como: deposição de gordura na carcaça, precocidade sexual, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, entre outras. Devido a sua importância, os polimorfismos nos exons 2 e 3 foram investigados em 415 ovinos de raças nativas (Barriga Negra, Cara Curta, Cariri, Morada Nova, Santa Inês), comerciais (Dorper, Ile de France, Poll Dorset, Suffolk, Texel) e cruzados (Santa Inês x Dorper). Para o estudo dos exons 2 e 3 foram adotadas, respectivamente, as técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP. As análises de PCR-RFLP revelaram apenas o SNP305, nas populações nativas (exceto Barriga Negra), comerciais (Dorper e Ile de France) e cruzada. O alelo C foi o mais comum, cujas frequências variaram de 0,9783 (Santa Inês) a 0,8649 (Dorper). As análises de PCR-SSCP de Lep3 revelaram quatro genótipos. Em todas as populações, exceto Morada Nova, o genótipo AA foi o mais frequente e, o genótipo AB, o menos frequente. O genótipo AC ocorreu em todas as raças nativas, cujas frequências variaram de 0,4348 (Morada Nova) a 0,075 (Cariri). Nas raças comerciais, esse genótipo foi detectado apenas na Dorper (0,3784). O genótipo CC ocorreu nas populações Morada Nova, Dorper e cruzada, cujas frequências foram 0,4783, 0,0273, e 0,0182, respectivamente. Considerando que o gene leptina está envolvido em diversos processos metabólicos,

as diferenças observadas na composição genotípica entre raças nativas e comerciais devem ser investigadas num estudo mais amplo na tentativa de se buscar marcador para produção ovina.

Introdução

Pelo seu tamanho territorial e diversidade climática e sazonal, a criação de ovinos no Brasil apresenta grande variedade de manejo, mas principalmente de raças entre as nativas, comerciais e seus respectivos cruzamentos. Essas raças apresentam características distintas de produção, idade ao abate, acabamento, composição e qualidade de carcaça, que potencializam a comercialização de genótipos altamente especializados para a produção de carne de qualidade (Oliveira et al., 2008). Dentro dessa realidade, a ovinocultura vem se espalhando como uma atividade promissora no Brasil (Madruga et al., 2005). A região Nordeste apresenta o segundo maior rebanho de ovinos, dos quais a grande maioria com o propósito voltado para a produção de carne para subsistência, alicerçada em raças nativas e animais mestiços. No entanto, essas raças nativas apresentam excelentes qualidades de adaptação e de reprodução, mas ainda não apresentam índices de produtividade compatíveis para concorrer no mercado de carne com as raças especializadas, como Dorper e Suffolk (Madruga et al., 2006). Estas raças vêm se expandindo nas regiões, principalmente no Sul e Sudeste, visando atender um crescente mercado consumidor. Assim sendo, a caracterização molecular de genes envolvidos com caracteres de interesse econômico, principalmente em raças nativas pode contribuir para melhorar a produção dessas raças ovinas. A leptina é um hormônio protéico produzido e secretado predominantemente pelos adipócitos e participa do controle do consumo de alimento e balanço energético (Schenkel et al., 2005). O gene leptina (LEP), 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, tem sido muito investigado em diversas espécies animais, sendo considerado gene candidato para associação com características quantitativas de interesse econômico, destacando deposição de gordura na carcaça, qualidade de carne, ganho de peso, precocidade sexual, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, entre outras. Em bovinos, os polimorfismos nos exon 2 (SNP252 e SNP305 – ANY138588) e exon3 (Lep3 – AJ512639) têm sido muito investigados (Lagonigro et al., 2003; Buchanan et al., 2002; Liefers et al., 2003). Isto porque, o SNP252 (alelos A/T) e SNP305 (alelos C/T), que resultam nas mudanças dos aminoácidos tirosina para fenilalanina e de arginina para cisteína, respectivamente, são associados à alteração no consumo de alimento e na deposição de gordura na carcaça (Lara et al., 2011). Na espécie ovina, polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCP) no exon 3 do gene da leptina detectados nas raças Romney, Merino, Corriedale, Poll Dorset e Suffolk por Zhou et al. (2009), e na raça Makoei, por Hashemi et al. (2011), vêm sendo muito investigados em outras raças ovinas, visando encontrar uma relação com características produtivas. Outras regiões do gene leptina já haviam sido estudadas por Boucher et al. (2006) por PCR-SSCP, nas raças Dorset e Suffolk, sendo caracterizados três SNPs (A103G, C154T e C617G). Posteriormente, Barzehkar et al. (2009), estudando raças iranianas detectaram outras mutações no exon3 (A113G e T165C), relacionadas significativamente com características de carcaça nas raças Shal e Zandi. A variabilidade no exon 3 do gene leptina também foi investigada na raça Baluchi por Tahmoorespur et al. (2010), sendo identificados três genótipos (L1, L2 e L3). Nestes estudos, a variante L1 pareceu favorável para várias características relacionadas à produção de carne, mas L3 mostrou-se o menos favorável. Assim, o conhecimento da variabilidade do gene LEP e sua relação com características de interesse comercial em raças ovinas criadas no Brasil são fundamentais para o estabelecimento de programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares. O presente estudo teve como objetivo investigar os polimorfismos nos exon 2 (SNP252 e SNP305) e exon3 (Lep3 – AJ512639) do gene leptina em raças nativas e comerciais, representativas da ovinocultura brasileira, visando conhecer as frequências alélicas e genotípicas para esses marcadores.

Material e métodos

Um total de 415 amostras de sangue ou bulbo capilar, coletadas em 11 populações ovinas, representando cinco raças nativas (Barriga Negra (N=45), Cara Curta (N=47), Cariri (N=40), Morada Nova (N=46), Santa Inês (N=46)), cinco raças comerciais (Dorper (N=37), Ile de France (N=44), Poll Dorset (N=11), Suffolk (N=29), Texel (N=15)) e uma cruzada (Santa Inês x Dorper (N=55)) foi investigado. O DNA genômico foi extraído pela técnica de fenol-cloroformio (Sambrook et al., 1989). As análises do exon 2 do gene leptina foi realizadas pela técnica de PCR-RFLP, com base em protocolos padronizados para os SNP252 e SNP305 em bovinos (Acesso ANY138588). A amplificação dos fragmentos foram realizadas segundo Lagonigro et al. (2003) e Buchanan et al. (2002) para um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl), 0,15 µM de cada primer (Tabela I), 200 µM de dNTP e 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase (comercializada pela Ultra Chem). Cerca de 10µL dos fragmentos amplificados de 467 pb

foram digeridos com 4 unidades da enzima *ClaI* e, dos fragmentos de 94 pb, com 2 unidades de *Kpn2I* para a identificação dos SNP225 e SNP305, respectivamente. Os RFLP foram separados por eletroforese (100 V por 2 horas) em géis de poliácridamida 10%, corados com prata para a identificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes, comparando-se com padrão de peso molecular de 100 pares de bases. As análises do exon 3 (*Lep-3*) foram realizadas pela técnica de PCR-SSCP, padronizada para a espécie ovina por Gutmanis et al. (2012), em que a amplificação do fragmento de 471 pb por PCR é realizada em duas fases, empregando-se dois conjuntos de primers distintos (Tabela I). O fragmento de 640 pb resultante da PCR com primers mais externos (5'-GGGAAGGGCAGAAAGATAGG-3' e 5'-TGCCCACATAGGCTCTCTTC) foi amplificado numa segunda PCR utilizando-se o par de primers descrito por Zhou et al. (2009) e, obtendo-se o fragmento de 471 pb. A visualização da qualidade do produto amplificado foi realizada com o emprego de corante fluorescente (*Blue green loading dye I*, comercializado por LAC Biotecnologia) em gel de agarose 1%. Para a identificação do polimorfismo de conformação de cadeia simples – SSCP, alíquotas do fragmento amplificado (471 pb) foram diluídas na proporção de 1:10 em tampão de corrida para SSCP (10 mM NaOH, 95% formamida, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol). Em seguida, foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e mantidas em gelo até serem aplicadas em gel 10% em poliácridamida (49:1). A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 450 V, empregando-se um circulador de água (GE) para manter a temperatura de 5°C, durante 18 horas. Para a visualização dos padrões de SSCP, o gel foi submetido à técnica de coloração com nitrato de prata.

Tabela I. Sequências dos pares de iniciadores (*primers*), com os respectivos nomes, tamanhos dos fragmentos do gene leptina, em pares de bases (pb), amplificados por PCR [*Pair of primers sequences and respective names, and sizes of the leptin gene fragments, in base pairs (bp) amplified by PCR*]

Nome do fragmento	Sequência dos iniciadores (5´-3´)	pb	Referência
SNP225	GATTCCGCCGCACCTCTC CCTGTGCAAGGCTGCACAGCC	467	Lagonigro et al., 2003
SNP305	ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC TGGTGTCATCCTGGACCTTCC	94	Buchanan et al., 2002
Lep3	(1) GGGAAGGGCAGAAAGATAGG TGCCCACATAGGCTCTCTTC	640	Gutmanis et al., 2012
	(2) AGGAAGCACCTCTACGCTC CTTCAAGGCTTCAGCACC	471	Zhou et al., 2009

Resultados e discussão

A metodologia adotada permitiu conhecer a variabilidade genética de onze populações ovinas em relação aos exons 2 e 3 do gene leptina. Estudos de associação de marcadores moleculares com características de produção animal são de grande importância para os programas de melhoramento genético, uma vez que permite a identificação precoce de genótipos superiores. Nas populações ovinas investigadas no presente estudo, não foi observado o SNP252, caracterizado pela substituição de A por T, que foi descrito em bovinos por Lagonigro et al. (2003). Contudo, o SNP305, caracterizado pela transição de C para T, que modifica arginina por cisteína, relacionado ao conteúdo de gordura na carcaça de bovinos (Buchanan et al., 2002), foi detectado em todas as populações de raças nativas (exceto na Barriga Negra), comerciais (Dorper e Ile de France) e cruzada (Tabela II). Como pode ser visto na Tabela II, o alelo C foi o mais comum, cuja frequência variou de 0,9887 (Ile de France) a 0,8649 (Dorper). Em bovinos, o alelo T (SNP305) é mais frequente em raças européias especializadas para corte, que apresentam, em geral, carcaças com adequada deposição de gordura entremeada nos tecidos (marmorização) e, o alelo C, mais frequente em raças zebuínas, sendo esse polimorfismo de grande aplicação na seleção de genótipos superiores para qualidade de carne (Lara et al., 2011). Sabe-se que a carne de ovinos é bastante apreciada por conter pouca gordura intramuscular, que é uma vantagem na carne bovina. Considerando que a leptina controla a deposição de gordura subcutânea e intramuscular e, na maioria das raças comerciais investigadas, o alelo C apresentou-se fixado, aventa-se a hipótese de que o alelo C possa ser marcador para seleção precoce de carcaças magras em raças nativas, com valor econômico agregado. Contudo, esse marcador (SNP305) deverá ser validado para a espécie ovina. Adicionalmente, as análises de PCR-SSCP do exon 3 (*Lep3*) revelaram quatro genótipos (AA, AB, AC e CC). Em todas as populações investigadas, exceto Morada Nova, o genótipo AA foi o mais frequente. O genótipo AC ocorreu em todas as raças nativas, cuja frequência

variou de 0,4348 (Morada Nova) a 0,075 (Cariri) e, na cruzada foi estimada em 0,2727. Nas raças comerciais, esse genótipo foi detectado apenas na Dorper (0,3784). O genótipo CC foi observado nos animais das raças Morada Nova, Dorper e cruzados (Santa Inês x Dorper), cujas frequências foram 0,4783, 0,0273, e 0,0182, respectivamente. Já, o genótipo AB foi o menos frequente, sendo detectado em duas raças nativas (Cara Curta e Santa Inês). Soares et al. (2012) estudando esse mesmo polimorfismo, encontraram efeito significativo ($P < 0,05$) destes genótipos no ganho de peso de cordeiros cruzados (Santa Inês x Dorper), cujas médias e desvio padrão estimados para os animais AA, AC e CC foram $4,57 \pm 2,77$, $5,41 \pm 2,20$ e $5,00 \pm 0,41$, respectivamente. Nesse estudo, a presença do alelo C (Lep-3) em heterozigose provavelmente favoreceu o ganho de peso, já que os animais AC apresentaram um ganho médio superior ao genótipo AA ($P < 0,05$) e ao genótipo CC. Apesar das diferenças observadas na composição genotípica entre as raças nativas e comerciais, as amostras genotipadas para Lep 3 deverão ser sequenciadas visando estabelecer uma relação entre os genótipos observados no presente estudo com os SNPs já caracterizados para a espécie ovina por Boucher et al. (2006), Barzehkar et al. (2009) e Zhou et al. (2009).

Tabela II. Frequências genotípicas para exon 2 (SNP305) e exon 3 (Lep3) do gene Leptina estimadas em 11 populações ovinas [*Genotypic frequencies of exon 2 (SNP305) and exon 3 (Lep3) of leptin gene estimated in eleven sheep populations*]

Raça	N	Frequência Genotípica SNP305			Frequência Genotípica Lep3			
		CC	CT	TT	AA	AB	AC	CC
BN	45	1	0	0	0,8667	0	0,1333	0
CC	47	0,9150	0,0850	0	0,7022	0,0638	0,2340	0
C	40	0,8750	0,1000	0,0250	0,9250	0	0,0750	0
MN	46	0,7606	0,1087	0,1304	0,0869	0	0,4348	0,4783
SI	46	0,9565	0,0435	0	0,7174	0,0435	0,2391	0
D	37	0,7297	0,2703	0	0,5943	0	0,3784	0,0273
IF	44	1	0	0	1	0	0	0
PD	11	1	0	0	1	0	0	0
S	29	1	0	0	1	0	0	0
T	15	1	0	0	1	0	0	0
SIxD	55	0,9333	0,0667	0	0,7091	0	0,2727	0,0182

BN: Barriga Negra; CC: Cara Curta; C: Cariri; MN: Morada Nova; SI: Santa Inês; D: Dorper; IF: Ile de France; PD: Poll Dorset; S: Suffolk; T: Texel; SIxD: Santa Inês x Dorper.

Conclusão

O exon 2 da leptina apresentou pouca variabilidade pela técnica de PCR-RFLP, sendo detectado apenas o SNP C305T em quatro populações nativas (Cara Curta, Cariri, Morada Nova, e Santa Inês), na raça Dorper e cruzados (Santa Inês x Dorper). Considerando que a leptina está envolvida em diversos processos metabólicos, as diferenças na composição genotípica em relação aos exons 2 e 3 do gene leptina devem ser investigadas mais amplamente na tentativa de se buscar marcador para produção ovina.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo N 2010/06542-1, Projeto: IZ-NRP-3386 e APTA-NRP18250).

Bibliografia

- Barzehkar R., Salehi A. & Mahjoubi F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Biotechnology* 7, 241-246.
- Boucher D., Palin M.F., Castonguay F., Gariépy C. & Pothier F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 31-35.
- Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel A.G., Thue T.D., Winkelman-Sim D.C. & Schmutz S.M. 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.

- Chilliard Y., Bonnet M., Delavaud C., Faulconnier Y., Lerouz C., Djiane J. & 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.
- Gutmanis G., Lara M.A.C., Soares W.V.B. & Herling V.R. 2012. Methodology for the detection of polymorphism in exon 3 of ovine leptin. In: *58º Congresso Brasileiro de Genética*, GA82. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
- Hashemi A., Mardani K., Farhadian M., Ashrafi I. & Ranjbari M. 2011. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *African Journal of Biotechnology* 10, 17903-17906.
- Lagonigro R., Wiener P., Pill F., Woolliams J.A. & 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., Pinatti E., Faria M.H., Resende F.D., Piveta A.J., Gutmanis G. & Cavalcante-Neto A. 2011. Polimorfismo do gene leptina (SNP305) em bovinos e sua implicação na maciez de carne. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 1, 195-8.
- Liefers S. C., Pas M. F., Veerkamp R. F., Chilliard Y., Delavaud, C., Gerritsen R. & Lende T. V. D. 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mamm. Genome* 14, 657-63.
- Madrugá M.S., Araujo W.O., Sousa W.H., Cezar M.F., Galvão M.S. & Cunha M.D.G. 2006. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35, 1838-44.
- Madrugá M.S., Sousa W.H., Rosales M.D., Cunha M.D.G. & Ramos J.L.F. 2005. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados em diferentes dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 309-15.
- Oliveira N.M., Vaz C.M.S.L., Osório J.C.S. & Osório M.T.M. 2008. Sistema de criação de ovinos nos ambientes ecológicos do Sul do Rio Grande do Sul: Mercado e comercialização. *Sistemas de Produção*. EMBRAPA. URL <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ovinos/CriacaoOvinosAmbientesEcologicosSulRioGrandeSul/>.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 253p.
- Schenkel F. S., Miller S. P., Ye X., Moore S. S., Nkrumah J. D., Li C., Yu J., Mandell I. B., Wilton. J. W. & Williams J. L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science* 83, 2009-20.
- Soares W.V.B., Gutmanis G., Herling V.R., Pacheco J., Pinatti E., Queiroz M.A.A. & Lara M.A.C. 2012. Relación del genotipo de leptina con ganancia de peso en ovejas. In: *XXXVII Congreso Nacional y XIII Internacional de la SEOC*. 262-5p. Espanha.
- Tahmoorespur M., Taheri A., Saghi M.V.V.D.A. & Ansary M. 2010. Assessment relationship between leptin and ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding values (EBVs) of growth traits in Baluchi sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advance* 9, 2460-2465.
- Zhou H., Hickford J.G. & Gong H. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular Biotechnology* 41, 22-25.