

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA DA LEPTINA EM
BOVINOS SUPERPRECOSES

ANA KARINA DIAS SALMAN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia – Área de concentração: Nutrição e
Produção Animal, como parte das exigências para
obtenção do Título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Julho-2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA DA LEPTINA EM
BOVINOS SUPERPRECOSES

ANA KARINA DIAS SALMAN
Zootecnista

Orientador: Professor Dr. Antonio Carlos Silveira
Co-orientador: Professor Dr. Luis Roberto Furlan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia – Área de concentração: Nutrição e
Produção Animal, como parte das exigências para
obtenção do Título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Julho-2003

*Às mulheres que me inspiram pelo caráter, inteligência e determinação:
minha mãe **Francisca** e minha amiga **Poliana**...*

... com muito amor, carinho e admiração,

DEDICO

*Ao meu pai **Farid***

*Aos irmãos **Karin** e **Wagner**, **Alfredo** e **Josi**, **Cássio**, **Farid** e **Giselle***

*Aos sobrinhos **Yasmin** e **David***

pelos momento felizes que dão sentido a minha vida ...

... com muito amor e carinho,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Profs. Drs. Antonio Carlos Silveira (Nenê ou Bagunça) e Luiz Roberto Furlan (Cedral) pela oportunidade oferecida e por todos os conhecimentos transmitidos.

A Carminha, Poliana, Kapado e Flávio, por terem aceitado o convite para fazerem parte da banca examinadora, o que contribuiu sobremaneira para melhorar a qualidade desse trabalho.

A FAPESP pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Nutrição e Produção Animal, da FMVZ (UNESP-Botucatu, SP), pelo convívio e troca de conhecimentos e experiências.

À equipe do projeto temático “Crescimento de Bovinos de Corte no Modelo Biológico Superprecoce”: Kapado, Mário, Henrique, Cyntia, Rafael, Paulo, Mariana, Liliane, Guilherme e Daniela, pela condução do experimento com os animais e pelo auxílio na coleta de dados e de amostras.

Ao frigorífico FRIGOL, localizado no município de Lençóis Paulista (SP), por ter permitido o abate dos animais nas suas dependências.

Ao colega de pós-graduação Rogério Curi por ter cedido amostras de DNA.

Aos Profs. Drs. Maria Inês e Jesus Aparecido Ferro por terem disponibilizado o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da FCAV (UNESP-Jaboticabal, SP) para realização das análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira pelas análises estatísticas.

Aos amigos do LBM, em especial a Carminha, Tyta, Neli, Karina (Habiba), Agda, Flavia, Vanessa, Gustavo (Godinho), Marisa, Izildinha, Roseli, Julinho e Júlio, por toda a troca de conhecimentos, mas principalmente pelos momentos de alegria e tristeza que nos deixaram cada dia mais próximos...

Ao Roberto (Zeferino) Noda, amigo e irmão (*torto*), pela sua aptidão para executar serviços gerais que o torna indispensável na vida de qualquer mulher... risos

Aos imprescindíveis amigos Poliana Fernanda Giachetto e André Luiz Julien Ferraz pelo apoio, incentivo e ajuda não só nas análises laboratoriais, mas principalmente naqueles momentos em que só seus ombros amigos puderam me consolar...

Aos meus amigos “calangos” Paulo e Sirlei por terem me acolhido em Botucatu, sempre com muito carinho, amizade e alegria...

As minhas amigas “veias loucas”: Angela, Cíntia, Mariana, Claudinha, Preta, Andrea Gaúcha e Luciana, e seus respectivos animais de estimação: Mafalda, Florinha, Shiva, Paçoca, Feijão, Lobo, Lindinha, Belinha, Anita, Capitu e Tobias, pelo convívio e amizade que está resistindo a distância (Graças à Deus!).

Aos Bronzoni de Faria: Rô, Dô, Marianinha, Sarinha e Tetê, pela amizade duradoura.

À MA-RA-VI-LHO-SA professora de inglês, Edilene Furlan, e aos amigos que encontrei durante suas aulas: Selma, Siri, Guerreiro, Ana Paula, Gustavo e Izabelle, Adnei, André (Cascão), Denise e Marlis, por terem tornado o aprendizado muito mais prazeroso e alegre.

À 33^a. Turma de Zootecnia, em especial à turminha do fubá: Pascú, Renatinho e Ana, Renatão e Silvia, Bira, Felipe e Mônica, Santolin, Lau e Marianinha, Hermó, Zuca, Cin e Tom, Poli e San, Jô e Tipinho, Lu, Cesinha e Érica, e Soraia, por sempre estarem presentes em um churrasco ou outro...

Ao Leandro Vieira, pelos bons momentos que passamos juntos e pelas longas conversas que, definitivamente, transformaram minha vida...

À amiga Roberta Canesin, por me ensinar a viver intensamente e sem pensar no dia seguinte (principalmente na ressaca...). ISSO!

Aos amigos Márcio, Fábio, Bassôra, Tuti, Gustavo e Thiago, por terem me ajudado a esquecer um pouco a tese que não queria nascer, principalmente nos últimos minutos do segundo tempo... (risos)

À minha família, que nunca deixou a distância nos separar, em especial aos meus padrinhos Maricota e Calazans, aos meus tios Nazir e Júlia, e ao meu primo Ryzzan, por todo o apoio, incentivo e amor que sempre me ajudaram a sentir mais força e vontade de sonhar.

A Deus pelo milagre da vida...

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.
O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado.
A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar porque um belo dia se morre.

Clarice Lispector

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2	14
POLIMORFISMOS NO GENE DA OBESIDADE (LEPTINA) DE BOVINOS DE CORTE TERMINADOS NO SISTEMA SUPERPRECOCE	15
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	17
Material e Métodos	18
Resultados e Discussão	22
Conclusões	32
Referência Bibliográfica	32
CAPÍTULO 3	34
PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE DA OBESIDADE (LEPTINA) NO TECIDO ADIPOSEO DE BOVINOS SUPERPRECOCES	35
Resumo	35
Abstract	36
Introdução	37
Material e Métodos	38
Resultados e Discussão	41
Conclusões	45
Referências Bibliográficas	46
CAPÍTULO 4	48
IMPLICAÇÕES	49

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Teoria Lipostática

A teoria lipostática, descrita por KENNEDY (1953), postulou que a regulação do balanço energético é intermediada por um produto do metabolismo energético presente na circulação sanguínea e que interage com receptores associados com o sistema nervoso central. Neste modelo, quando as reservas energéticas (tecido adiposo) estão elevadas, os centros da saciedade no hipotálamo são ativados, provocando a redução na ingestão de alimentos. Por outro lado, durante a restrição alimentar ou no jejum prolongado, as reservas de tecido adiposo são mobilizadas para produção de energia, ocorrendo um aumento concomitante do apetite.

Experimentos de parabiose com ratos obesos e normais evidenciaram a existência de um fator circulante sinalizador (HERVEY, 1958, COLEMAN, 1973). Mas, somente em 1994, com os recursos da biotecnologia, foi possível caracterizar este fator e seu gene foi clonado em ratos e em humanos (ZHANG et al., 1994). Mais tarde, o gene da obesidade, também conhecido como gene da leptina, foi clonado de outras espécies como suínos (RAMSAY et al., 1998), frangos (TAOUIIS et al., 1998) e bovinos (JI et al., 1998).

2. Leptina e seus receptores

O gene da obesidade se expressa nos adipócitos, principalmente no tecido adiposo branco, e codifica a leptina, um hormônio que apresenta uma cadeia polipeptídica inicial com 167 aminoácidos, dos quais 21 aminoácidos iniciais representam uma seqüência sinal que é descartada antes da proteína madura ser secretada no sangue. A leptina madura é uma proteína monomérica de 16 kDa com duas cisteínas formando uma ligação disulfídica intramolecular (ZHANG et al., 1994).

A leptina produzida e secretada pelas células do tecido adiposo é transportada, via corrente sanguínea, para tecidos-alvo, onde interage com receptores celulares específicos. O receptor celular da leptina (ob-R) pertence à classe I da família de receptores *cytokine*, à qual também pertencem os receptores do hormônio do crescimento, da prolactina e da interleucina-6, entre outros. O gene *ob-R* tem sido

identificado, através de técnicas como o *Northern blot*, hibridização *in situ* e PCR, em vários tecidos do organismo, inclusive no cérebro, fígado, musculatura esquelética e no próprio tecido adiposo (CEDDIA *et al.*, 1998).

O receptor da leptina é uma proteína integral de membrana e o exame de vários tecidos tem demonstrado que o mesmo existe em múltiplas formas, apresentando uma seqüência extracelular comum e uma porção citoplasmática com comprimento variável. As isoformas do receptor da leptina são resultantes do processamento alternativo do RNA mensageiro produzido por um único gene. De maneira geral, os receptores da leptina podem ser classificados em isoformas que apresentam cauda citoplasmática curta (isoformas a, c, d, f) e uma única isoforma que apresenta cauda citoplasmática longa (ob-R_b). A isoforma ob-R_e é composta apenas pelo domínio extracelular, representando uma provável forma solúvel do receptor que estaria envolvida no transporte da leptina para as regiões periféricas (CEDDIA *et al.*, 1998).

3. Ação da leptina

Os estudos sobre os mecanismos de ação da leptina ainda encontram-se na fase inicial. Entretanto, os estudos realizados com seres humanos e com linhagens de ratos obesos (*ob/ob*) ou diabéticos (*db/db*), têm demonstrado o envolvimento da leptina no controle do apetite e na modulação da secreção da insulina pelo pâncreas. Numa ação autócrina, a leptina exerce um efeito inibitório sobre a captação de glicose estimulada pela insulina, reduz a lipogênese e estimula a lipólise no tecido adiposo. De maneira endócrina, a leptina estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio pelas células do tecido muscular, além de acelerar a taxa de oxidação de ácidos graxos neste tecido (Figura 1) (CEDDIA *et al.*, 1998).

Além dos mecanismos periféricos, acredita-se que a ação da leptina sobre a ingestão e o metabolismo energético seja mediada via sistema nervoso central, através da inibição da síntese e da secreção do neuropeptídeo-Y (NPY). Como o NPY estimula a ingestão e diminui a termogênese de gordura marrom, além de estar relacionado com o aumento dos níveis plasmáticos de insulina e de corticosteróides, acredita-se que o mesmo sirva como mediador em algumas ações da leptina no hipotálamo (HOSSNER, 1998). O aumento dos níveis de leptina, devido à grande quantidade de gordura

depositada, diminui a expressão do NPY. Dessa forma, o sistema nervoso simpático é ativado e a produção de calor no tecido adiposo marrom é estimulada resultando em aumento no gasto de energia corporal e perda de peso (XIE et al., 1999).

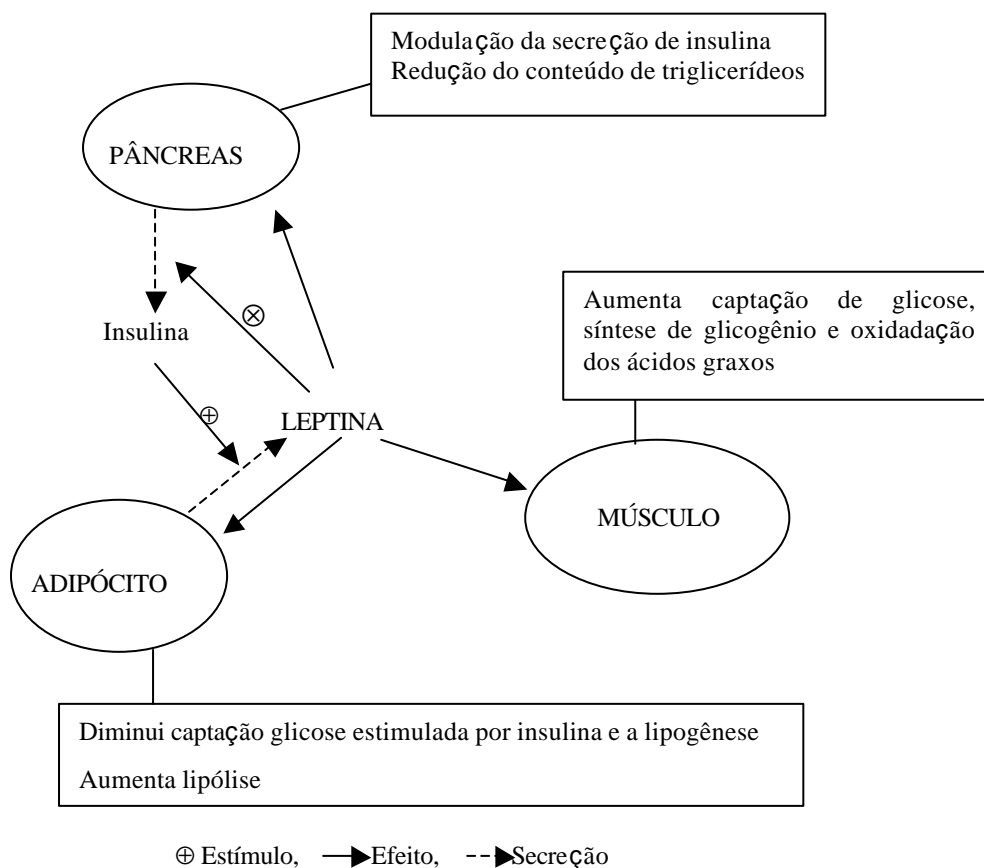


Figura 1. Efeito da leptina nos adipócitos, no pâncreas e no músculo esquelético.
(CEDDIA et al., 1998)

Os níveis plasmáticos de leptina podem ser regulados através de efeitos sobre os mecanismos de transcrição do seu gene e, ou de síntese da proteína. As proteínas de ligação intensificadoras/CAAT estão relacionadas com a regulação da transcrição do gene. Outros fatores como os glicocorticóides, a insulina, a AMPc e os receptores β -adrenérgicos também estão associados com a regulação da expressão da leptina. Acredita-se que a insulina tem efeito tanto sobre a expressão quanto sobre a secreção da leptina. Parece que a insulina e a leptina fazem parte de uma alça de retroalimentação, enquanto a insulina estimula a secreção da leptina a leptina circulante inibe a produção de insulina (XIE et al., 1999).

Analisando os resultados dos estudos de expressão gênica *in vivo* e *in vitro*

combinados com os efeitos observados na restrição alimentar e na realimentação, CHILLIARD et al. (2001) sugeriram que a leptina além de evitar a deposição excessiva de gordura corporal, parece ter um papel importante durante a adaptação dos animais à restrição alimentar. O rápido decréscimo nos níveis plasmáticos da leptina em animais sob restrição alimentar pode ser um sinal para estimular a ingestão na situação de realimentação e aumentar a secreção de glicocorticóides, diminuir a atividade da tireóide, o gasto energético e a síntese protéica, além de bloquear a reprodução (Figura 2).

Para o melhor entendimento da regulação da leptina em ruminantes, CHILLIARD et al. (2001) resumiram como a secreção da leptina é alterada através de fatores fisiológicos, nutricionais e endócrinos. Basicamente, a síntese da leptina em ruminantes é incrementada em longo prazo com o aumento da camada de gordura no corpo (tamanho e, ou número de adipócitos). O fotoperíodo (no caso de ovinos) e o nível nutricional afetam a expressão da leptina em médio prazo. Em curto prazo (após a refeição), a regulação da síntese e secreção da leptina é mais complexa e envolve interações entre os metabólitos no sangue (glicose, ácidos graxos não esterificados, corpos cetônicos, etc.) e os hormônios (insulina, GH, catecolaminas, glicocorticóides ou sistema nervoso simpático).

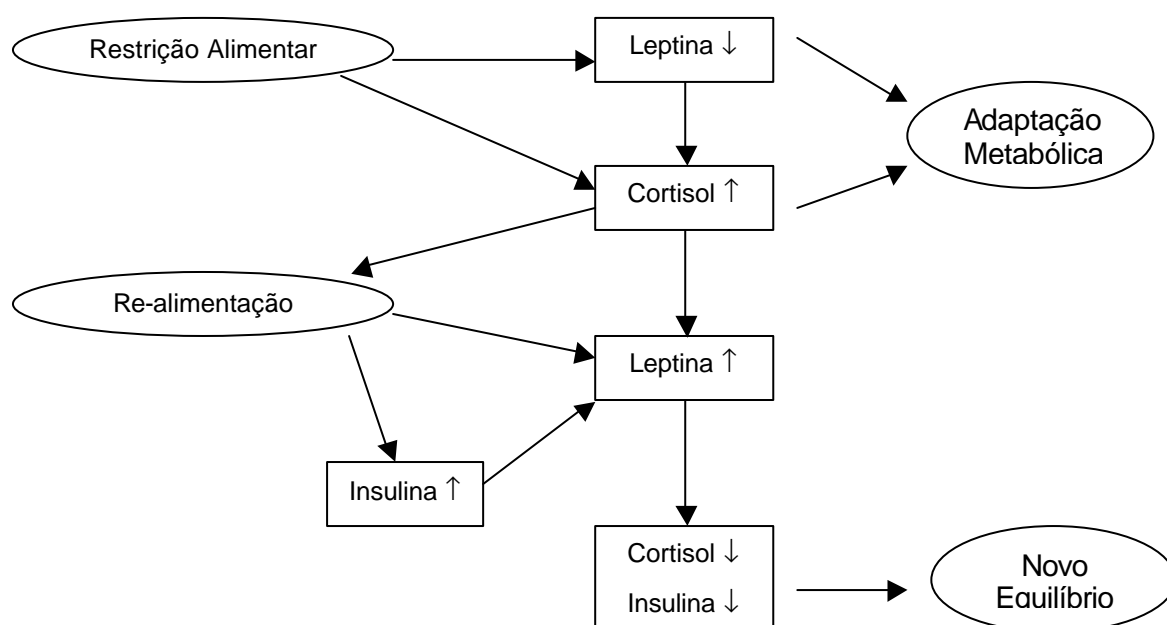


Figura 2. Relação entre a leptina plasmática, o cortisol e a insulina durante a restrição alimentar e a realimentação em ruminantes (CHILLIARD et al.,2001).

4. Expressão da leptina

COLLINS et al. (1996) sugeriram que o tamanho dos adipócitos pode ser o principal determinante da expressão do RNAm da leptina. Além do tamanho dos adipócitos brancos, que reflete a quantidade de gordura armazenada, a insulina também deve ter importância sobre a quantidade de leptina secretada (XIE et al., 1999). Outros fatores como sexo, idade, dieta e jejum parecem estar relacionados com expressão do gene da obesidade. Em bovinos, TSUCHIYA et al. (1998) observaram que os níveis de RNAm da leptina no tecido adiposo diminuíram significativamente após dois dias de restrição alimentar e voltaram parcialmente ao normal após três horas de realimentação.

Os estudos de expressão do gene da leptina em ruminantes só se iniciaram a partir de 1997 após a caracterização do RNAm (TELLAM, 1995) e do gene (TELLAM, 1996) da leptina bovina. Devido ao seu baixo nível de expressão, os estudos sobre a variação na quantidade de RNAm da leptina no tecido adiposo de ruminantes não são fáceis de serem conduzidos pelo método de Northern-blot com o RNA total. Os primeiros resultados foram obtidos em bovinos através do Northern-blot com o RNAm obtido em coluna de Poli A+ ou em ensaios de proteção a ribonuclease (JI et al., 1998; TSUCHIYA et al., 1998).

Quanto ao local de expressão, sabe-se que o tecido adiposo é o principal local de síntese e secreção da leptina em bovinos, porém o gene da leptina também se expressa em outros tecidos como nos placentários e fetais, na glândula mamária, no estômago, músculos, tecido adiposo marrom, entre outros (CHILLIARD et al., 2001). Considerando-se apenas o tecido adiposo de bovinos, JI et al. (1998) não observaram diferenças nos padrões de expressão do gene da leptina entre os tecidos adiposos omental, perirenal ou subcutâneo. Porém, em outro estudo, observou-se que este gene expressou-se intensamente no tecido adiposo perirenal, moderadamente nos tecidos adiposos abdominal e subcutâneo; e em menor quantidade na gordura intramuscular (KIM et al., 2000).

A análise da expressão do gene da leptina no tecido adiposo de bovinos pelo método de proteção a ribonuclease foi estudada por TSUCHIYA et al. (1998), os quais observaram que bovinos em jejum por 48 horas apresentaram níveis de RNAm da leptina no tecido adiposo subcutâneo significativamente menores (47%) em relação

àqueles que estavam sendo bem alimentados. Com realimentação de apenas três horas, estes níveis aumentaram em 67%. Estes resultados mostraram que a alimentação afeta os níveis de expressão do gene da leptina em ruminantes.

Além da alimentação, existem os fatores hormonais que interferem na expressão do RNAm do gene *ob*. Estudos recentes vêm demonstrando que o tratamento com injeções intravenosas de GH e NPY pode aumentar a síntese de leptina, a qual produz um mecanismo de retroalimentação sobre seu receptor no cérebro, diminuindo a secreção desses hormônios na circulação periférica (CHILLIARD et al., 2001).

Como injeções intravenosas de NPY aumentaram os níveis de RNAm da leptina e do receptor do NPY – Y1 no tecido adiposo subcutâneo de ovinos (DYER et al., 1997), acredita-se que existe uma alça de retroalimentação negativa (efeito inibitório da leptina sobre a secreção de NPY) no cérebro de ovinos (HENRY et al., 1999).

O tratamento de bovinos em crescimento com hormônio do crescimento (GH) aumentou os níveis de RNAm da leptina e do IGF-1 no tecido adiposo, com simultâneo aumento da insulina plasmática (HOUSEKNECHT et al., 2000). Embora tenha sido observado *in vitro* que a leptina diminui a expressão do GHRH (e, conseqüentemente, a secreção de GH) em células da pituitária de ovinos (ROH et al., 1998), acredita-se que *in vivo* o efeito do GH sobre a secreção da leptina seja parte de um mecanismo de retroalimentação. NAGATANI et al. (2000) demonstraram, em ovinos sob restrição alimentar, que a leptina aumenta os níveis plasmáticos de GH.

Com relação aos glicocorticóides e a insulina, HOUSEKNECHT et al. (1998) verificaram que estes aumentam a expressão da leptina no tecido adiposo de ratos. Em bovinos, a expressão *in vitro* do RNAm da leptina do tecido adiposo aumentou com a adição da insulina e/ou da dexametasona (glicocorticóide sintético) e estes efeitos foram atenuados com a adição simultânea do GH (HOUSEKNECHT et al., 2000). Isto sugere que estes hormônios agem por mecanismos diferentes (CHILLIARD et al., 2001).

A relação da leptina com a puberdade de novilhas mestiças de raças leiteiras foi verificada por GARCIA et al. (2002) em um experimento onde tanto a leptina circulante quanto a expressão do gene da leptina aumentaram significativamente com a aproximação da puberdade, embora os valores observados para estas duas variáveis não

terem sido correlacionados. Ainda nesse estudo, aumentos no peso vivo corporal e na concentração de IGF-I no soro dessas fêmeas foram associados aos níveis de leptina no soro e com a expressão gênica.

Pela técnica de radioimunensaio utilizando *kit multi-species*, vários estudos foram realizados para monitorar a leptina plasmática em ruminantes, sendo que esta foi positivamente associada com a espessura de gordura no músculo *longissimus*, com o grau de marmorização em bovinos de corte (MINTON et al., 1998; TOKUDA et al., 1999) e com a gordura corporal da carcaça de novilhos na fase de crescimento (EHRHARDT et al., 2000). Em bovinos da raça Japanese Black no período de 10 a 27 meses de idade, KAWAKITA et al. (2001) verificaram que a leptina plasmática aumenta significativamente com a idade; e que a espessura de gordura na carcaça na ocasião do abate foi positivamente associada com a taxa de aumento da leptina no plasma, principalmente entre 11 e 14 meses de idade. No entanto, o coeficiente de correlação entre estes parâmetros foi relativamente baixo, indicando que os níveis plasmáticos de leptina não devem ser utilizados para prever o acúmulo de gordura na carcaça de bovinos Japanese Black. Em estudo mais recente, DELAVALD et al. (2002) observaram, em vacas holandesas, que os níveis da leptina plasmática e o tamanho dos adipócitos apresentaram uma relação curvilínea e que 4 horas após a alimentação a concentração da leptina no plasma apresenta correlação positiva com o nível nutricional.

5. Gene da obesidade ou da leptina

O gene da leptina bovina é composto de três exons e dois íntrons correspondendo em torno de 18,9 kb do genoma. O primeiro e o segundo íntron têm cerca de 14 e 1,7 kb, respectivamente. A organização exon-íntron desse gene é muito conservada entre camundongos, humanos e bovinos. A região 5' não traduzida de aproximadamente 3 kb apresenta sítios para as proteínas intensificadoras/CCAAT (C/EBP), Sp1 e TATA, mas ainda não foi completamente sequenciada (TANIGUCHI et al., 2002).

Avaliando a expressão da leptina no tecido adiposo e a natureza da expressão tecido-dependente em bovinos, JI et al. (1998) observaram que o gene da

obesidade e a leptina de bovinos apresentaram, respectivamente, 87 e 100% de similaridade com os genes e a leptina de humanos e ratos. Além disso, também notaram que o gene da obesidade em bovinos é expresso em um RNAm com 3090 nucleotídeos, o qual foi detectado em tecido adiposo, mas não foi encontrado no cérebro ou em outros tecidos.

Mutações nos genes que codificam a leptina ou seus receptores são responsáveis por obesidade, infertilidade e resistência à insulina em roedores e humanos (HOUSEKNECHT e PORTOCARRERO, 1998). Uma mutação na região codificadora do gene da obesidade foi detectada em ratos *ob/ob*, a qual é responsável pela produção de uma molécula inativa que leva a obesidade seguida de diabetes tipo II (ZHANG et al., 1994). Ratos diabéticos mutantes *db/db* apresentam obesidade semelhante à de ratos *ob/ob*, porém o nível de leptina observada na circulação de ratos *db/db* foi bem elevado em comparação com ratos magros normais. Como injeções intraperitoniais diárias de leptina recombinante reduziram em 30% o peso corporal de ratos *ob/ob*, após duas semanas de tratamento, mas não tiveram efeito em ratos *db/db*, HALAAS et al. (1995) concluíram que ratos *db/db* são resistentes a leptina. Segundo HOUSEKNECHT et al. (1998), a resistência a leptina pode estar relacionada a falhas na expressão do receptor ou na seqüência de eventos de sinalização no cérebro.

A associação de polimorfismos e, ou do padrão de expressão do gene da obesidade com características de produção é de grande importância para os programas de melhoramento genético. Em suínos, foi detectado polimorfismo no gene do receptor da leptina (VICENT, 1997) e ROBERT et al. (1998) observaram que os polimorfismos no gene da obesidade estavam associados com animais magros e que níveis elevados de RNAm da leptina foram correlacionados com maior espessura de gordura subcutânea. HARDGE et al. (1998) observaram correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo detectado por RFLP (Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição) com a enzima de restrição *HinfI* no gene da leptina com a relação carne:gordura e, também, com a espessura de gordura em uma população de 560 suínos.

Em bovinos, foram detectados polimorfismos no gene da obesidade (POMP et al., 1997; WILKINS e DAVEY, 1997; FITZSIMMONS et al., 1998; KONFORTOV et al., 1999; HAEGEMAN et al., 2000), os quais foram associados à deposição de gordura na carcaça de bovinos de corte (FITZSIMMONS et al., 1998 e BUCHANAN et

al., 2002) e com características de balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade em gado leiteiro (LIEFERS et al., 2002). TESSANNE et al. (1999) investigaram a relação entre os genótipos para dois microsátélites polimórficos (WILKINS e DAVEY, 1997 e STONE et al., 1996) e dois RFLPs (LIEN et al., 1997) com características de carcaça e só encontraram efeito significativo entre o microsátélite polimórfico descoberto por WILKINS e DAVEY (1997) e a área de olho-de-lombo em um grupo de 137 bovinos da raça Angus.

No estudo de BUCHANAN et al. (2002) uma transição de citosina por timina no exon 2 do gene da leptina bovina, responsável pela mudança de arginina por cisteína na seqüência de aminoácidos foi observada e a frequência do alelo T foi associada com carcaças mais gordas, com maior expressão gênica da leptina e com as raças britânicas (Angus e Hereford). Por outro lado, a frequência do alelo C foi associada com carcaças mais magras, com menor nível de expressão do gene e com raças continentais (Charolês e Simental).

O capítulo 2, intitulado **Polimorfismos no Gene da Obesidade (Leptina) de Bovinos de Corte Terminados no Sistema Superprecoce**, teve como objetivos identificar a existência de polimorfismos pelas técnicas de SSCP e RFLP no gene da obesidade e associá-los às características de área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos e submetidos ao sistema superprecoce.

O capítulo 3, intitulado **Padrão de Expressão do Gene da Obesidade (Leptina) no Tecido Adiposo de Bovinos Superprecoces**, teve o objetivo de avaliar a expressão do gene da obesidade no tecido adiposo subcutâneo e relacioná-la com características de área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos e submetidos ao sistema superprecoce.

Ambos trabalhos foram apresentados de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia.

Referências Bibliográficas

- BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
- CEDDIA, R.P.; WILLIAMS JR., W.N.; LIMA, F.B. et al. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.715-22, 1998.
- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.271-295, 2001.
- COLEMAN, D.L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, v.9, p.294-8, 1973.
- COLLINS, S.; KUHN, C.M.; PETRO, A.E. et al. Role of leptin in fat regulation. **Nature**, v.380, p.677, 1996.
- DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y. et al. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 1317-1328, 2002.
- DYER, C.J.; SIMMONS, J.M.; MATTERI, R.L. et al. Effects of an intravenous injection of NPY on the leptin and NPY-Y1 receptors mRNA expression in ovine adipose tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, v.14, p.325-333, 1997.
- EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J. et al. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 166, p.519-528, 2000.
- FITZSIMMONS, C.J.; SCHMUTZ, S.M.; BERGEN, R.D. et al. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.432-434, 1998.
- GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W. et al. Serum leptin gene and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2158-2167, 2002.
- HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.31, p.70, 2000.
- HALAAS, J.L.; GAZIWALA, K.S.; MAFFEI, M. et al. Weight-reducing effects of plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v.269, p. 543-9, 1995.
- HARDGE, T.; KÖPKE, K.; WIMMERS, K. et al. Association between polymorphism of the leptin gene (LEP) and performance traits in a porcine resource family and in commercial outbred population. **Animal Genetics**, v.29 (supplement 1), p.70, 1998.
- HENRY, B.A.; GODING, J.W.; ALEXANDER, W.S. et al. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. **Endocrinology**, v.140, p.1175-1182, 1999.

- HERVEY, G.R. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. **Journal Physiology**, v.145, p.336-52, 1958.
- HOSSNER, K.L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: potential application in animal production. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p.463-72, 1998.
- HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P.; JI, S. et al. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. **Journal Endocrinology**, v.164, p.51-57, 2000.
- HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A., MATTERI, R.L. et al. The biology of leptin: A review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1405-20, 1998.
- HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p.457-75, 1998.
- JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R. et al. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**, v.9, p.1-14, 1998.
- KAWAKITA, Y.; ABE, H.; HODATE, K. et al. The relation between plasma leptin concentrations and carcass lipid contents in Japanese Black steers. **Livestock Production Science**, v.73, p.25-34, 2001.
- KENNEDY, G.C. The role of depot fat in hypothalamic control of food intake in the rat. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.140, p.578-92, 1953.
- KIM, H.; CHI, Y.; CHUNG, K. et al. Differential response of obese gene expression from fasting in bovine adipose tissues. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.64, p.2240-2242, 2000.
- KONFORTOV, B.A.; LICENCE, V.E.; MILLER, J.R. et al. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, v.10, p.1142-5, 1999.
- LIEFERS, S.C.; te PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F. et al. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633-1638, 2002.
- LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H. et al. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v.28, p. 238-246, 1997.
- MINTON, J.E.; BINDEL, D.J.; DROVILLARD, J.S. et al. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76 (supplement 1), p. 231, 1998.
- NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D.H. et al. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **Endocrinology**, v.141, p.3965-3975, 2000.
- POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C. et al. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1427, 1997.
- RAMSAY, T.G.; YAN, X.; MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **Journal of Animal Science**, v.76, p.484-90, 1998.

- ROBERT, C.; PALIN, M.; COULOMBE, N. et al. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p. 473-82, 1998.
- ROH, S.; CLARKE, I.J.; XU, R. et al. The *in vitro* effect of leptin on basal and growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone secretion from the ovine pituitary gland. **Neuroendocrinology**, v.68, n.6, p.361-364, 1998.
- STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; BEATTLE, C.W. The bovine homologue of obese gene maps to chromosome 4. **Mammalian Genome**, v.7, p.399-400, 1996.
- TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB life**, v.53, p.131-135, 2002.
- TAOUI, M.; CHEN, J.; DAVIAUD, C. et al. Cloning the chicken leptin gene. **Gene**, v.208, p.239-42, 1998.
- TELLAM, R.L. *Bos taurus* OBESE mRNA, complete cds. **GenBank** Accession No. U43943. 1995.
- TELLAM, R.L. *Bos taurus* leptin (obese) gene, complete cds. **GenBank** Accession No. U50365. 1996.
- TESSANE, K.; HINES, H.C.; DAVIS, M.E. Relationships of polymorphisms in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. **Ohio State University Extension Bulletin Research and Reviews: Beef and Sheeps**, Special Circular no. 170, 1999.
- TOKUDA, T.; MATSUI, R.; YANO, H. Leptin concentrations in the blood of ruminants. **South Africa Journal of Animal Science**, v. 29, p. 211-212, 1999.
- TSUCHIYA, T.; NAGAO, Y.; OZAWA, A. et al. Decrease of obese gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue by fasting. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, p.2068-9, 1998.
- VICENT, A.L. A restriction fragment length polymorphism in the porcine leptin receptor (LEPR) gene. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2287, 1997.
- WILKINS, R.J., DAVEY, H.W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.28, p.376, 1997.
- XIE, C.; WEGNER, J.; BROCKMAWN, G.A. Leptin, a palatability molecule ? – A review. **Archiv Fuer Tierzucht**, p.191-9, 1999.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p.425-32, 1994.

CAPÍTULO 2

POLIMORFISMOS NO GENE DA OBESIDADE (LEPTINA) EM DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS DE BOVINOS DE CORTE TERMINADOS NO SISTEMA SUPERPRECOCE

Polimorfismos no Gene da Obesidade (Leptina) em Diferentes Grupos Genéticos de Bovinos de Corte Terminados no Sistema Superprecoce

RESUMO - Este estudo foi conduzido com novilhos pertencentes a diferentes grupos genéticos, Angus x Nelore (n=31), Simental x Nelore (n=30) e Canchim (n=30), objetivando identificar SSCPs (Polimorfismos de Conformação de Cadeia Simples) e RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição) no gene da obesidade e relacionar esses polimorfismos com a área-de-olho-de-lombo (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça. Cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na seqüência do gene da leptina bovina depositada no *Genbank* (U50365), para a amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de fragmentos a partir do DNA genômico extraído dos leucócitos. Os fragmentos LEPT1, LEPT2, LEPT3 e LEPT7 foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida para identificação dos SSCPs. O fragmento LEPT4 foi digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* para detecção do RFLP. Os fragmentos LEPT1, LEPT2 e LEPT7 apresentaram sete, quatro e cinco padrões diferentes de migração, respectivamente, enquanto o fragmento LEPT3 apresentou padrão monomórfico. O genótipo LEPT7-A foi relacionado à maior AOL ($P<0,05$), sendo que este genótipo foi mais freqüente no grupo Simental x Nelore, o qual também apresentou menor EGS ($P<0,05$) em relação aos animais Angus x Nelore. As freqüências do alelo A e do genótipo homozigoto AA do RFLP foram as maiores nas três populações estudadas, com valores de 90, 93 e 80%; e de 84, 87 e 68% para Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente. Polimorfismos no exon 3 do gene da obesidade são potenciais candidatos para serem utilizados como marcadores moleculares para características de carcaça nos programas de melhoramento genético de bovinos de corte.

Palavras-chave: Leptina, Gado de Corte, Polimorfismos, RFLP e SSCP

Obese (Leptin) Gene Polymorphisms of Different Genetic Groups of Beef Cattle Finished in a Brazilian Early Cattle System

ABSTRACT - This study was carried out with Angus x Nelore (n=31), Simmental x Nelore (n=30) and Canchim (n=30) in order to identify SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) within obese (leptin) gene and to relate these polymorphisms with carcass's ribeye area (REA) and subcutaneous fat layer (SFL). Based on bovine leptin gene sequence (Genbank accession number: U50365), five primers were designed for PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of fragments using genomic DNA extracted from leukocyte. LEPT1, LEPT2, LEPT3 and LEPT7 fragments were electrophoresed through polyacrilamide gel for SSCPs identification. LEPT4 was digested with *Sau3AI* for RFLP detection. LEPT1, LEPT2 and LEPT7 fragments showed seven, four and five migration patterns, respectively, while LEPT3 showed monomorphic pattern. LEPT7-A genotype was associated with higher REA ($P<0.05$), and this genotype was more frequent within Simmental x Nelore group, which had lesser SFL ($P<0.05$) in relation to Angus x Nelore. In LEPT4-RFLP, the frequencies of A allele and AA genotype were higher within three studied populations, their values were 90, 93 and 80%; and 84, 87 and 68% for Angus x Nelore, Canchim and Simmental x Nelore, respectively. Polymorphisms within exon 3 of obese gene are potential candidates for using as molecular markers of carcass traits in beef cattle breed improvement programs.

Key-words: Beef Cattle, Leptin, Polymorphisms, RFLP and SSCP

Introdução

Na bovinocultura de corte, a redução dos custos de produção vem sendo alcançada através da diminuição da idade ao abate dos animais. Neste contexto, definem-se como bovinos superprecoces aqueles que após o desmame são terminados em regime de confinamento e abatidos antes dos 15 meses de idade (SILVEIRA, 2001). Para colocar em prática este conceito, além de medidas de manejo adequadas, faz-se necessário a escolha de animais mais precoces e com potencial genético para terminação de carcaça num curto espaço de tempo, o que depende da velocidade de desenvolvimento muscular e deposição de gordura na carcaça.

Como a precocidade é um exemplo de característica quantitativa, cuja manifestação depende da ação conjunta de vários genes, a sua manipulação em programas de melhoramento genético animal é mais complexa e onerosa. No entanto, com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível não só o estudo mais detalhado de genes envolvidos com características quantitativas, mas também permitiu que a maior eficácia dos programas de melhoramento genético possa ser alcançada através da seleção de animais com o uso de marcadores moleculares. A busca por estes marcadores baseia-se primariamente em análises de polimorfismos localizados em genes estruturais, responsáveis por manifestações de características de importância econômica.

O gene da obesidade, clonado de ratos em 1994 (ZHANG et al., 1994), é responsável pela síntese da leptina, um hormônio envolvido com os mecanismos que regulam a ingestão e o metabolismo energético, prevenindo a deposição excessiva de gordura corporal (CHILLIARD et al., 1998). Em bovinos, este gene apresenta-se com aproximadamente 18,9 kb, localiza-se no cromossomo quatro (POMP et al., 1997) e é composto por três exons que perfazem aproximadamente 3,2 kb e dois íntrons que somados representam 15,7 kb. A transcrição desse gene resulta em RNAm de 3.090 nt (JI et al., 1998), o qual codifica uma cadeia polipeptídica com 167 aminoácidos, dos quais 21 aminoácidos iniciais representam uma seqüência sinal que é descartada antes da proteína madura de 16 kDa ser secretada no sangue (ZHANG et al., 1994). A organização exon-íntron desse gene é muito conservada entre camundongos, humanos e bovinos. A região 5' não traduzida de aproximadamente 3 kb apresenta sítios para as proteínas intensificadoras/CCAAT (C/EBP), Sp1 e TATA *box*, indicando que esse gene

está sujeito à regulação por fatores de transcrição (TANIGUCHI et al., 2002).

Polimorfismos no gene da obesidade bovino foram detectados (STONE et al., 1996; LIEN et al., 1997; POMP et al., 1997; WILKINS e DAVEY, 1997; FITZSIMMONS et al., 1998; KONFORTOV et al., 1999; HAEGEMAN et al., 2000) e associados à deposição de gordura na carcaça de bovinos de corte (FITZSIMMONS et al., 1998; BUCHANAN et al., 2002) e com características de balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade em gado leiteiro (LIEFERS et al., 2002).

TESSANNE et al. (1999) genotiparam 137 bovinos da raça Angus para dois microsátélites polimórficos (WILKINS e DAVEY, 1997 e) e dois RFLPs (LIEN et al., 1997) e investigaram a relação entre os genótipos e as características de carcaça, encontrando efeito significativo entre o microsátélite polimórfico descoberto por WILKINS e DAVEY (1997) e a área de olho-de-lombo.

Sendo assim, este estudo teve por objetivos identificar a existência de polimorfismos pelas técnicas de SSCP e RFLP no gene da obesidade de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos e associá-los com a área-de-olho-de-lombo (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça de animais submetidos ao sistema superprecoce.

Material e Métodos

O confinamento no sistema superprecoce teve a duração de quatro meses, que compreendeu o período de outubro de 2000 a fevereiro de 2001. Para tanto, utilizaram-se bezerros machos, mestiços, pertencentes a três grupos genéticos Angus x Nelore (n=31), Simental x Nelore (n=30) e Canchim (n=30), desmamados em média com sete meses de idade e alimentados com dieta a base feno de brachiaria, farelo de soja, milho moído, suplemento vitamínico e mineral, Rumensin, com relação volumoso:concentrado de 25:75 (na fase de crescimento) e 15:85 (na fase de terminação).

Os animais foram distribuídos em número de cinco por baía, 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).

A avaliação das características de carcaça foi feita com os animais em jejum de no mínimo 12 horas e realizada por ocasião do abate, quando as médias da idade (em dias) e do peso vivo (em kg) dos animais foram de 573 e 443, 641 e 430 e 446 e 477, para os grupos Angus x Nelore, Simental x Nelore e Canchim, respectivamente. Para tanto, mediu-se a área de secção do músculo *longissimus* (área-de-olho-de-lombo ou AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) do mesmo a partir de imagens obtidas entre a 12^a e a 13^a costela dos animais experimentais, conforme técnica descrita por PERKINS et al. (1992) modificada por GRESHAM (1998), utilizando um aparelho de ultra-sonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02). As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

Amostras de aproximadamente 5,0 ml de sangue foram colhidas por animal utilizando-se tubos a vácuo com EDTA. O sangue foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos para a separação da camada de leucócitos, a qual foi coletada e armazenada a -20°C até o momento da extração do DNA.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal (SP).

O DNA genômico foi extraído da camada de leucócitos conforme o protocolo descrito por MIRETTI (1998), que consiste na remoção dos eritrócitos por sucessivas lavagens com tampão contendo o detergente Nonidet P-40, com subsequente lise e precipitação das proteínas dos leucócitos utilizando-se tampão de lavagem com elevada concentração salina e posterior utilização de SDS. 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 1mL 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.

Foram desenhados cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) com o intuito de amplificar a maior região possível da sequência do gene da obesidade bovino depositada no *Genbank* (AC: U50365). As sequências e as posições desses

primers, com o nome e o tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases (pb), estão apresentados na Tabela 1. Na Figura 1 está esquematizado o gene *ob* (leptina) bovino baseado na seqüência depositada no *Genbank* e nas informações de TANIGUCHI et al. (2002), com as posições dos exons e íntrons, bem como os fragmentos amplificados e a posição do sítio de restrição da enzima *Sau3AI*.

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

Table 1. Primers sequences and positions with the PCR-fragment's name and size (in base pair) of obese gene (U50365).

Fragmento <i>Fragment</i>	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores <i>Primers Sequence</i>	Posição <i>Position</i>	Tamanho (pb) <i>Length (bp)</i>
LEPT 1	5'-TCCGTTGTTCACTGTGGCATC- 3'	425	469
	5'-AGAGGTGCGGCGGAATCAAG- 3'	894	
LEPT 2	5'-TTGATTCCGCCGCACCTCTC- 3'	875	540
	5'-AGGCAGGAGGCAAGGGAAGTAG- 3'	1415	
LEPT 3	5' -TTGCCTCCTGCCTTCTCACTC- 3'	1402	644
	5' -CCTGGTGGCTCAGACGGTAAA- 3'	2046	
LEPT 4	5'-TCTTTACCGTCTGAGCCACCA- 3'	2023	482
	5'-GCCACCCACAGCAATCAATC- 3'	2505	
LEPT 7	5'-GGAAGGGCAGAAAGATAGGAGC- 3'	2803	689
	5' -AGGAGGAGCGAGAGAGAAATGGC- 3'	3492	

As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 30 µL, contendo 160 ng de DNA, 0,75 µM de cada primer, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl), 250 µM de dNTP, 0,5U de enzima *Taq* DNA polimerase, em termociclador. O programa de amplificação consistiu de um ciclo para desnaturaçã o inicial a 96°C por 120 segundos, seguido de 35 ciclos para desnaturaçã o a 96°C por 30 segundos, anelamento dos primers a X °C por 80 segundos, e extensã o a 72°C por 60 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos, onde X variou de acordo com o par de primers utilizado: LEPT 1, LEPT 2 e LEPT 3 = 67 °C, LEPT 4 = 66 °C e LEPT 7 = 68 °C.

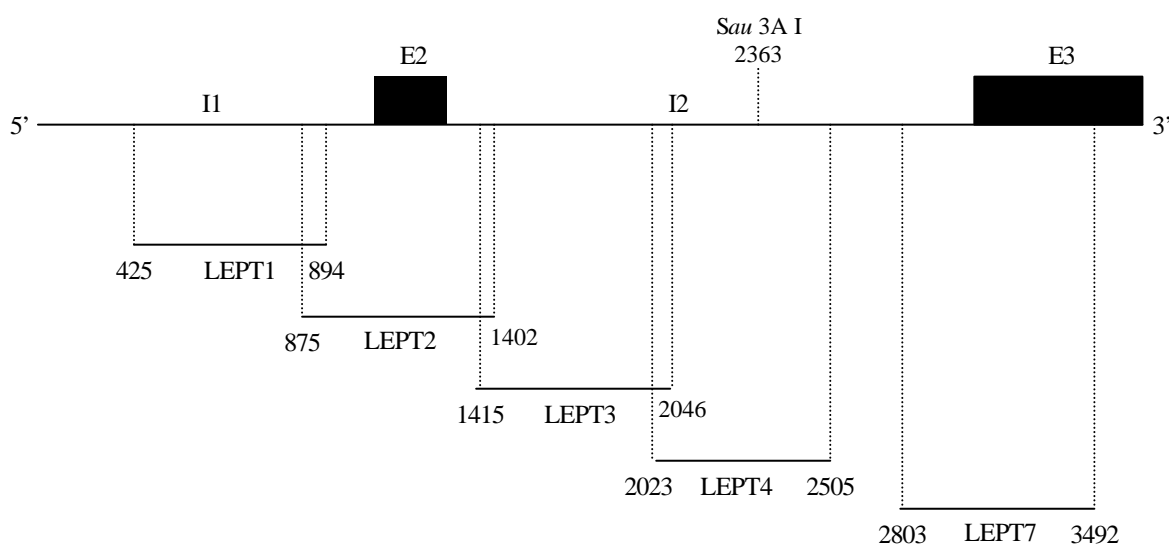


Figura 1. Mapa do gene *ob* (leptina), baseado na sequência depositada no *Genbank* (AC: U50365) e nas informações de TANIGUCHI et al. (2002), com as posições dos *primers*, os nomes dos fragmentos amplificados e o sítio da enzima de restrição *Sau3AI* (E=exon, I=íntron).

Figure 1 *Leptin (ob) gene map, based on Genbank sequence (AC: U50365) and TANIGUCHI et al. (2002) information, showing primers positions, fragment's names and Sau3AI site.*

Os fragmentos LEPT 1, LEPT 2, LEPT 3 e LEPT7 foram analisados através da técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples). 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 (BASSAM et al., 1991) para visualização das bandas.

A técnica de RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição) foi aplicada ao fragmento LEPT 4, o qual foi digerido a 37 °C por 2,5 horas com a enzima de restrição *Sau3AI* (Q.Biogene), para detecção do polimorfismo descrito por POMP et al. (1997). 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 (Gibco, BRL).

As frequências genótípicas do RFLP observado no fragmento LEPT4 foram estimadas conforme o procedimento descrito por WEIR (1990) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

Os efeitos das raças e das frequências dos polimorfismos observados no gene da leptina sobre a área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) foram analisados pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) do SAS (1993).

Resultados e Discussão

Os resultados das imagens obtidas por ultrasonografia revelaram que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os animais experimentais pertencentes aos diferentes grupos genéticos quanto à área-de-olho-de-lombo (AOL), sendo que os valores médios obtidos para Angus x Nelore ($n=31$), Simental x Nelore ($n=30$) e Canchim ($n=30$) foram: 73,87, 73,25 e 73,25 cm^2 , respectivamente. Com relação à espessura de gordura subcutânea (EGS), os animais Angus x Nelore depositaram significativamente ($P<0,05$) mais gordura (5,97 mm) que os Simental x Nelore (3,85 mm) e os Canchim (3,85 mm).

Dentro das populações analisadas foi possível caracterizar por SSCP diferentes padrões de migração dos fragmentos LEPT1, LEPT2 e LEPT7. Como os animais homozigotos e heterozigotos não podem ser identificados baseando-se apenas nesta análise, os diferentes padrões de SSCP (genótipos) foram simplesmente nomeados com letras. Foram observados sete (A, B, C, D, E, G e L), quatro (A, B, C e D) e cinco (A, B, C, D e E) padrões de migração dos fragmentos LEPT1 (Figura 2), LEPT2 (Figura 3) e LEPT7 (Figura 4), respectivamente.

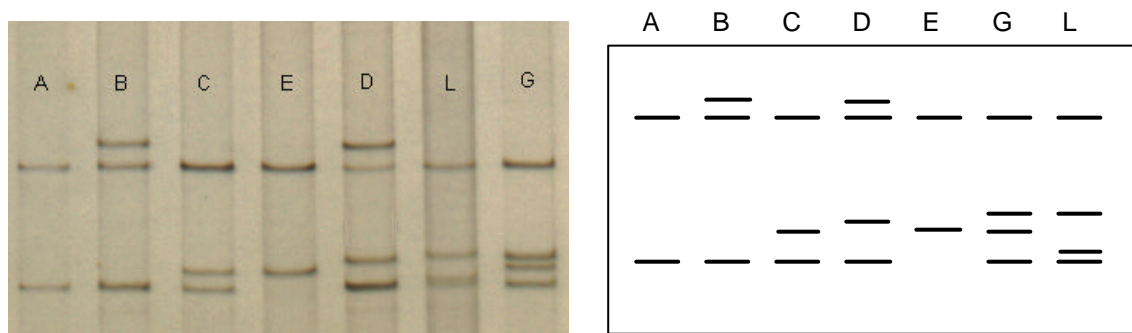


Figura 2. Diferentes padrões de migração (SSCP) do fragmento LEPT 1 (469 pb) do gene da leptina em gel de poliácridamida 15% após 13 horas de corrida a 100V.

Figure 2. SSCP patterns of LEPT1 fragment (469 pb) within leptin gene in 15% polyacrilamide gel after 13 hours of running at 100V.

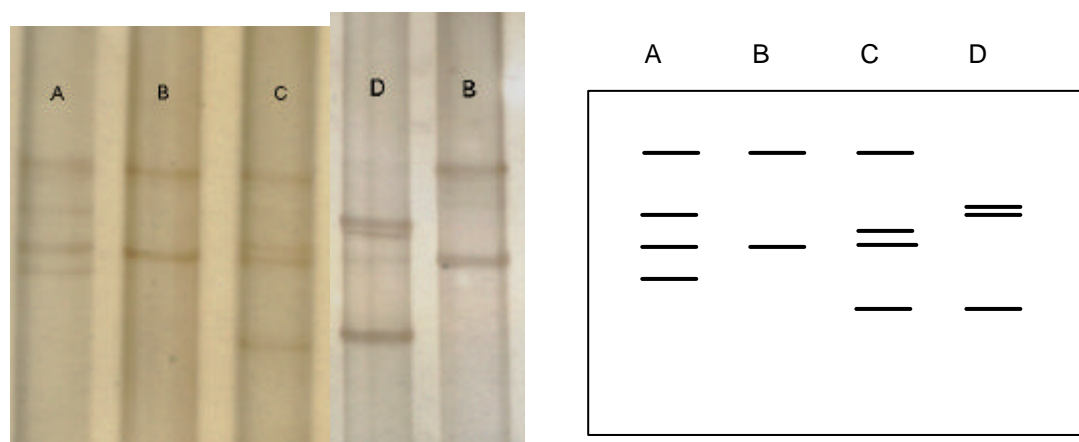


Figura 3. Diferentes padrões de migração (SSCP) do fragmento LEPT 2 (540 pb) do gene da leptina em gel de poliácridamida 15% após 15 horas de corrida a 100V.

Figure 3. SSCP patterns of LEPT2 fragment (540 pb) within leptin gene in 15% polyacrilamide gel after 15 hours of running at 100V.

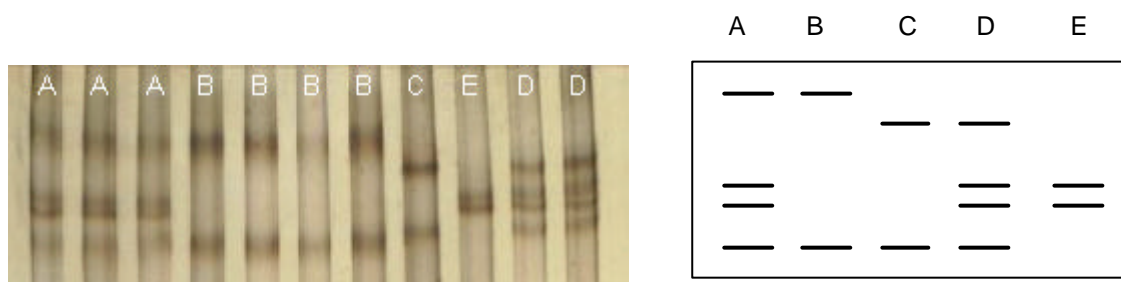


Figura 4. Diferentes padrões de migração (SSCP) do fragmento LEPT 7 (689 pb) do gene da leptina em gel de poliácridamida 10% após 24 horas de corrida a 100V.

Figure 4. SSCP patterns of LEPT7 fragment (689 pb) within leptin gene in 10% polyacrilamide gel after 24 hours of running at 100V.

Pela técnica de SSCP não foi possível a detecção de polimorfismos no fragmento LEPT3, já que todas as amostras analisadas apresentaram mesmo padrão de migração em géis de poliácridamida 15% (Figura 5).

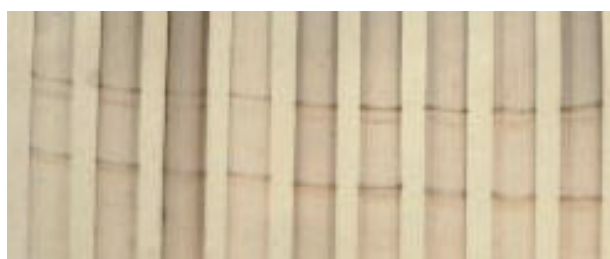


Figura 5. Padrão de migração do fragmento LEPT 3 (644 pb) em gel de poliácridamida 15% após 20 horas de corrida a 100V.

Figure 5. SSCP patterns of LEPT3 fragment (644 pb) within leptin gene in 15% polyacrilamide gel after 20 hours of running at 100V.

Na Tabela 2 podem ser verificadas as frequências dos genótipos observados para os fragmentos LEPT1, LEPT2 e LEPT7.

Tabela 2. Frequências dos genótipos (SSCP) observados para os fragmentos LEPT1, LEPT2 e LEPT7 do gene da leptina de novilhos pertencentes a três grupos genéticos.

Table 2. Genotypes (SSCP) frequencies of LEPT1, LEPT2 e LEPT7 fragments within leptin gene of three genetic groups of beef steers.

Fragmento <i>Fragment</i>	Genótipo <i>Genotype</i>	Grupo Genético <i>Genetic Group</i>					
		Angus x Nelore <i>Angus x Nellore</i>		Canchim		Simental x Nelore <i>Simmental x Nellore</i>	
		N	%	n	%	n	%
LEPT1	A	7	22,6	13	43,3	22	73,3
	B	15	48,4	4	13,3	1	3,3
	C	5	16,1	4	13,3	2	6,7
	D	2	6,5	2	6,7	0	0,0
	E	1	3,2	0	0,0	0	0,0
	G	0	0,0	0	0,0	1	3,3
	L	1	3,2	7	23,3	4	13,3
	Total	31	100	30	100	30	100
LEPT2	A	27	90,0	26	89,7	19	86,4
	B	2	6,7	0	0,0	1	4,5
	C	1	3,3	0	0,0	0	0,0
	D	0	0,0	3	10,3	2	9,1
	Total	30	100	29	100	22	100
LEPT7	A	6	20,7	5	17,9	11	40,7
	B	17	58,6	19	67,9	12	44,4
	C	5	17,2	2	7,1	2	7,4
	D	1	3,4	0	0,0	2	7,4
	E	0	0,0	2	7,1	0	0,0
	Total	29	100	28	100	27	100

Nos grupos experimentais Canchim e Simental x Nelore, o genótipo LEPT1-A foi o mais freqüente, sendo de 43,3 e 73,3 %, respectivamente. Entre os animais Angus x Nelore, o genótipo mais freqüente foi o LEPT1-B (48,4%). Os genótipos LEPT1-D, LEPT1-E e LEPT1-G foram os menos freqüentes, sendo que o genótipo LEPT1-G e o LEPT1-E só foram observados nos grupos Simental x Nelore e no Angus x Nelore, respectivamente. Os genótipos LEPT1-A, LEPT1-B, LEPT1-C e LEPT1-L foram observados em todos os grupos genéticos.

Em relação ao fragmento LEPT2, observou-se que o genótipo mais freqüente em todos os grupos experimentais foi o LEPT2-A, sendo de 90,0, 89,7 e 86,4% nos grupos Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente. Os genótipos LEPT2-B, LEPT2-C e LEPT2-D apresentaram freqüência baixa nos três grupos estudados, sendo que o LEPT2-D não foi observado entre os animais Angus x Nelore, da mesma forma que o LEPT2-C não foi observado no grupo Simental x Nelore. Entre os animais da raça Canchim não foram observados os genótipos LEPT2-B e LEPT2-C.

O genótipo LEPT7-B, seguido do LEPT7-A, foi o mais freqüente em todos os grupos experimentais. O genótipo LEPT7-E não foi observado entre os animais Angus x Nelore e nos Simental x Nelore, assim como o genótipo LEPT7-D, não foi observado no grupo Canchim.

A análise RFLP, realizada com o fragmento LEPT 4 (482 pb) que abrange a região que se inicia na posição 2023 e termina na posição 2505 do gene da leptina bovina e que apresenta sítio de restrição na posição 2363 para enzima *Sau3AI*, permitiu visualizar em gel de agarose 1,8% fragmentos de 340 e 142 pb, que caracterizaram o alelo A. Um sítio adicional para esta enzima na posição 2335 foi responsável pela digestão do fragmento de 340 pb em fragmentos de 312 pb e 28 pb (não visível no gel), os quais caracterizaram o alelo B. Os padrões de migração desses fragmentos e os três genótipos (AA, AB e BB) observados nas populações estudadas podem ser visualizados na Figura 6.

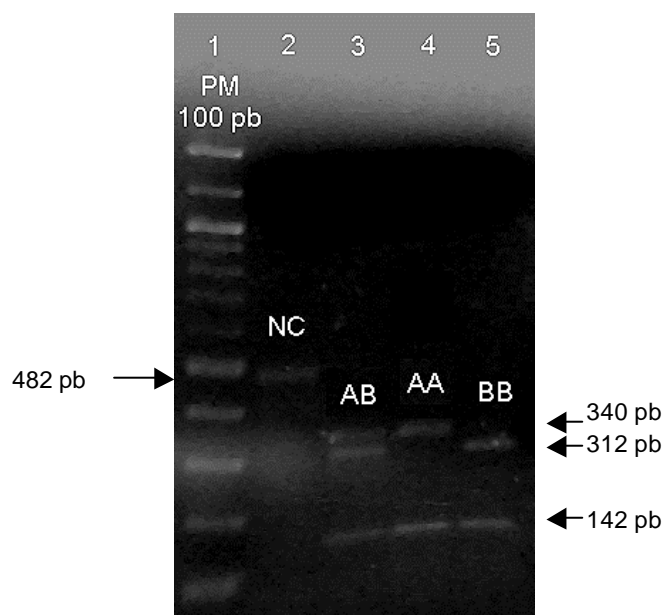


Figura 6. Padrão de migração em gel de agarose 1,8% do RFLP-*Sau3AI* no fragmento LEPT4 (482 pb). Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pares de base (Gibco, BRL); Coluna 2: produto de PCR não digerido com a enzima; Coluna 3: Genótipo AB (fragmentos 340, 312 e 142 pb); Coluna 4: Genótipo AA (fragmentos 340 e 142 pb); Coluna 5: Genótipo BB (fragmentos 312 e 142 pb).

Figure 6. Migration pattern in 1.8% agarose gel of *Sau3AI* RFLP in LEPT4 fragment (482 pb). Column 1: 100 pb molecular weight pattern (Gibco, BRL); Column 2: uncut PCR product; Column 3: AB genotype (340, 312 and 142 pb fragments); Column 4: AA genotype (340 and 142 pb fragments); Column 5: BB genotype (312 and 142 pb fragments).

Na Tabela 3 são apresentadas as frequências genotípica e alélica do RFLP no fragmento LEPT4 do gene da leptina dentro das populações estudadas, bem como os seus respectivos valores de Qui-quadrado (χ^2). Pode-se observar que as frequências do alelo A e do genótipo homocigoto AA foram as maiores nas três populações estudadas, com valores de 90, 93 e 80%, e de 84, 87 e 68% para Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente. O grupo Simental apresentou maior frequência do genótipo heterocigoto (AB) e no grupo Canchim não foi observado o genótipo homocigoto BB.

Como não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os valores do Qui-quadrado (χ^2) calculados para cada um dos grupos experimentais (0,15; 2,12 e 1,56 para Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente) e o valor do χ^2 tabelado, concluiu-se que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas observadas em cada um dos grupos genéticos estudados com seus respectivos valores de Qui-quadrado calculados.

Table 3. Genotype and allelic frequencies observed in each genetic group with their respective calculated Chi-square.

Grupo Genético <i>Genetic Group</i>	n	Frequências genotípicas <i>Genotype Frequencies</i> (%)			Frequências Alélica <i>Allele Frequencies</i> (%)		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
Angus x Nelore <i>Angus x Nellore</i>	31	84	13	3	90	10	0,15
Canchim	30	87	13	0	93	7	2,12
Simental x Nelore <i>Simmental x Nellore</i>	25	68	24	8	80	20	1,56

n = número de animais do grupo genético

n = number of animals within genetic group

Não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) das frequências dos SSCPs e do RFLP sobre as características de área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) das carcaças dos animais pertencentes aos três grupos genéticos, com exceção dos genótipos observados no fragmento LEPT7 que se relacionaram com a AOL. Na Figura 6 pode-se perceber que os animais do genótipo LEPT7-A (um provável heterozigoto por ter apresentado quatro bandas no gel de SSCP) apresentaram maior ($P < 0,05$) AOL ($76,32 \text{ cm}^2$) em relação aos do genótipo LEPT7-B ($70,69 \text{ cm}^2$), enquanto que aqueles do genótipo LEPT7-C ($73,37 \text{ cm}^2$) não se diferenciaram dos demais com relação a esta característica (Figura 7). As frequências desses genótipos não tiveram efeito significativo sobre as médias de espessura de gordura subcutânea (EGS), as quais foram de 4,45, 4,94 e 3,10 mm para os genótipos LEPT7-A, LEPT7-B e LEPT7-C, respectivamente.

Quando se considerou o efeito de raça sobre as características de AOL e EGS, observou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais com relação a AOL ($73,87$; $73,26$ e $73,25 \text{ cm}^2$, para Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente), mas os animais Angus x Nelore apresentaram maior ($P < 0,05$) EGS (5,97 mm) em relação àqueles dos grupos Canchim (3,85 mm) e Simental x Nelore (3,85 mm).

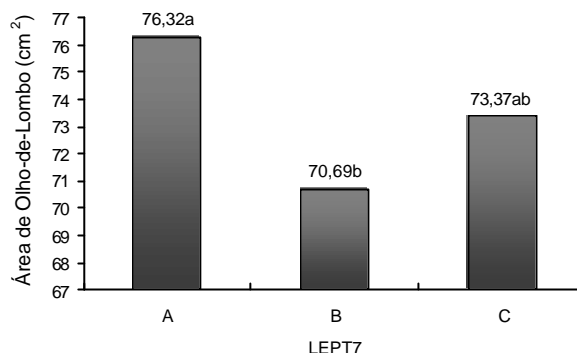


Figura 7. Efeito dos genótipos A, B e C, observados no fragmento LEPT7 do gene da obesidade, sobre a área de olho-de-lombo (cm²) dos animais experimentais.
 Figure 7. Effect of LEPT7-A, B and C genotypes on experimental animal's ribeye area (cm²)

Como já havia sido observado por CHARDULO (2000), existe diferença com relação às características de carcaça e de carne entre as raças Angus, Charolês e Simental, comprovada pela maior precocidade para terminação de carcaça da raça Angus, a qual proporcionou a produção de carne mais macia em função da maior camada de gordura de cobertura, que pode ter sido responsável pela redução do impacto do resfriamento rápido da carcaça no frigorífico. Tal diferença entre a raça Angus e as demais pode estar associada com a variabilidade genética no gene da leptina, evidenciada com a detecção de vários polimorfismos, não só no presente estudo, mas em outros desenvolvidos anteriormente (LIEN et al., 1997; POMP et al., 1997; WILKINS e DAVEY, 1997; FITZSIMMONS et al., 1998; KONFORTOV et al., 1999; HAEGEMAN et al., 2000).

Existem estudos que associaram essas diferenças nas características de carcaça da raça Angus em relação às raças Charolês e Simental com a variabilidade genética no gene da leptina. FITZSIMMONS et al. (1998), avaliando polimorfismos no microsatélite BM 1500 (próximo ao gene da leptina), encontraram associação entre o alelo de 138 pb, mais freqüente nos grupos de animais das raças Angus (59%) e Hereford (57%), com maior deposição de gordura da carcaça; enquanto que o alelo de 147 pb, mais freqüente entre os animais Charolês (54%) e Simental (58%), apresentou efeito contrário. No estudo de BUCHANAN et al. (2002), uma transição de citosina por timina no exon 2 do gene da leptina bovino, responsável pela mudança de arginina por cisteína na seqüência de aminoácidos, foi observada e a freqüência do alelo T foi

associada com carcaças mais gordas das raças britânicas (Angus e Hereford), enquanto que a frequência do alelo C foi associada com carcaças mais magras das raças continentais (Charolês e Simental).

O fragmento LEPT2, que abrange todo o exon 2 do gene da leptina bovino, apresentou quatro padrões de migração, dos quais um deles pode ser coincidente com o polimorfismo descrito por BUCHANAN et al. (2002), o qual já havia sido confirmado por KONFORTOV et al. (1999), e que foi associado com o teor de gordura na carcaça. Porém, no presente estudo, os genótipos identificados nessa região não foram associados com a AOL ou com a EGS, o que pode ter sido uma consequência do número reduzido de animais genotipados dentro de cada população estudada (Tabela 2).

Apesar das transições de citosina por timina na posição 1560 e de guanina por adenina na posição 1620 (considerando a sequência 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 LEPT3 (Figura 5), que corresponde a essa mesma região dentro do íntron 2, o que indica a inexistência de polimorfismos nessa região do gene da leptina dos animais considerados no presente estudo.

A associação de polimorfismos com características de carcaça é de grande importância para evidenciar seus potenciais para serem utilizados como marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético. Estes estudos, no entanto, não são fáceis de serem conduzidos por exigirem a análise de populações com grande número de animais com variabilidade genética e fenotípica, e o uso de modelos matemáticos adequados.

No estudo de TESSANNE et al. (1999), por exemplo, em que foi investigado a relação entre os genótipos para dois microsátélites polimórficos (WILKINS e DAVEY, 1997 e STONE et al., 1996) e dois RFLPs (LIEN et al., 1997) com características de carcaça, foi encontrado efeito significativo somente entre o microsátélite polimórfico descoberto por WILKINS e DAVEY (1997) e a AOL em um grupo de 137 bovinos da raça Angus. Os autores justificaram esta falta de significância com o fato do estudo ter sido conduzido em uma população pequena e composta por animais pertencentes a uma única raça pura (Angus). Além disso, existe o fato de ainda não ter sido determinado qual o verdadeiro papel que a leptina exerce sobre o

metabolismo dos ruminantes. Neste mesmo estudo, observou-se que os animais selecionados para alta e baixa concentração plasmática de IGF-I apresentaram frequências alélicas significativamente diferentes, indicando a existência de outros efeitos do genótipo da leptina em ruminantes.

No presente estudo, a maior AOL foi associada ao genótipo A observado no fragmento LEPT7, o qual abrange grande parte do exon 3. Após o sequenciamento e a definição dos alelos desse polimorfismo, análises de ligação entre ele e o microsátelite polimórfico descoberto por WILKINS e DAVEY (1997) poderão ser realizadas.

Ressalta-se que o genótipo LEPT7-A foi associado à maior AOL (Figura 7) e que o grupo de animais que apresentou maior frequência desse genótipo foi o dos mestiços Simental x Nelore (Tabela 2), o qual também mostrou menor deposição de gordura em relação ao grupo de animais Angus x Nelore, o que parece ter uma certa coerência biológica, já que normalmente o aumento na AOL está associado à diminuição da EGS. Isto foi observado através das diferenças numéricas entre a EGS e AOL dos animais dos genótipos LEPT7-A (4,45 mm e 76,32 cm²) e LEPT7-B (4,94 mm e 70,69 cm²), em que um aumento de aproximadamente 10% na EGS acompanhou a redução de 7,34% na AOL dos animais do genótipo B em relação aos do genótipo A. Através dessa observação, podemos presumir que os animais do genótipo LEPT7-B apresentam características de carcaça mais desejáveis para a terminação no sistema de produção de novilhos superprecoce.

A observação de dois alelos e três genótipos no fragmento LEPT4 após a digestão com a enzima de restrição *Sau3AI* está de acordo com POMP et al. (1997). No entanto, as frequências alélicas e genótípicas desse RFLP não causaram efeitos significativos sobre as características de carcaça avaliadas, o que pode ter ocorrido em função do pequeno número de observações, já que os animais que apresentaram maior frequência do genótipo heterozigoto AB (Simental x Nelore) foram os que também tiveram maior frequência do genótipo LEPT7-A, o qual foi associado à maior AOL. Logo, pode-se hipotetizar uma provável ligação entre estes dois genótipos e uma provável associação do RFLP-*Sau3AI* com características de carcaça. Além disso, esse RFLP 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 heterozigotas AB quando comparadas às vacas do genótipo AA.

Conclusões

As técnicas de SSCP e RFLP mostraram-se viáveis para a detecção de polimorfismos no gene da obesidade bovino e, conseqüentemente, para evidenciar a variabilidade genética existente nos três grupos genéticos estudados (Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore).

O RFLP-*Sau3AI* não foi associado com as características de área-de-olho-de-lombo e espessura de gordura subcutânea na carcaça de bovinos de corte pertencentes aos grupos genéticos Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore.

Os SSCPs LEPT7-A e LEPT7-B, dentro do exon 3 do gene da obesidade bovino, são potenciais candidatos para serem utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de bovinos de corte visando características de carcaça desejáveis para o sistema de produção de bovinos superprecoces.

Referência Bibliográfica

- BASSAM, B.J.; ANOLLÉS, G.C.E.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v.196, p.80-83, 1991.
- BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
- CHARDULO, L.A.L. **Desempenho, níveis plasmáticos de hormônio, expressão e quantificação das proteínas musculares, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos mestiços jovens de diferentes grupos genéticos submetidos ao sistema superprecoce**. Tese de Doutorado. FCAV, UNESP, Jaboticabal, 2000, 70p.
- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAUAUD, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.271-295, 2001.
- FITZSIMMONS, C.J.; SCHMUTZ, S.M.; BERGEN, R.D. et al. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.432-434, 1998.
- GRESHAM, J. D. Study Guide. Real-Time ultrasound training conference. Bovine applications. University of Tennessee at Martin. 1998. 20p.

- HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEEREN, A.; PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.31, p.70, 2000.
- JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R. et al. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**, v.9, p.1-14, 1998.
- KONFORTOV, B.A.; LICENCE, V.E.; MILLER, J.R. et al. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, v.10, p.1142-5, 1999.
- LIEFERS, S.C.; te PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F. et al. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633-1638, 2002.
- LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H. et al. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v.28, 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.
- PERKINS, T. L., GREEN, R. D., MILLER, M. F. Evaluation of alternative ultrasound measurement sites as estimator of yield grade factors in beef cattle. **Proceedings Western Section America Society of Animal Science**, v.43, p.294, 1992.
- POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C. et al. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1427, 1997.
- SAS. User's Guide, Version 6, Cary, NC:SAS Institute Inc., 1993.
- SILVEIRA, A.C. Produção do Novilho Superprecoce. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2001] CD-ROM. Palestras. A Produção Animal na Visão dos Brasileiros. p.284-293.
- STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; BEATTLE, C.W. The bovine homologue of obese gene maps to chromosome 4. **Mammalian Genome**, v.7, p.399-400, 1996.
- TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB life**, v.53, p.131-135, 2002.
- TESSANE, K.; HINES, H.C.; DAVIS, M.E. Relationships of polymorphisms in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. **Ohio State University Extension Bulletin Research and Reviews: Beef and Sheeps**, Special Circular no. 170, 1999.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Massachusetts:Sinauer Associates, 1990, 377p.
- WILKINS, R.J., DAVEY, H.W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.28, p.376, 1997.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p.425-32, 1994.

CAPÍTULO 3

PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE DA OBESIDADE (LEPTINA) NO TECIDO ADIPOSEO DE BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS TERMINADOS NO SISTEMA SUPERPRECOCE

Padrão de Expressão do Gene da Obesidade (Leptina) no Tecido Adiposo de Bovinos de Corte de Diferentes Grupos Genéticos Terminados no Sistema Superprecoce

RESUMO - Este estudo teve o objetivo de avaliar a expressão do gene da obesidade no tecido adiposo subcutâneo e relacioná-la com características de área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos e terminados no sistema superprecoce. A AOL e a EGS foram avaliadas por ultra-sonografia. Amostras de tecido adiposo foram retiradas na região da base da cauda dos animais por ocasião do abate. A extração de RNA total foi realizada pelo método do isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio adaptado para amostras de tecido adiposo. Amostras de RNA total foram transferidas para membranas de náilon pelo método de *dot blotting*. A marcação das sondas com fosfatase alcalina e as reações de hibridização foram realizadas utilizando-se um *kit* comercial associado à um sistema quimioluminescente de detecção. As autoradiografias geradas foram analisadas em densitômetro e os valores do RNAm da leptina foram normalizados hibridizando-se a mesma membrana com um fragmento de DNA do RNAr 28S de rato e a quantidade relativa dos transcritos foi expressa em unidades arbitrárias. Os animais Angus x Nelore depositaram significativamente ($P < 0,05$) mais gordura (5,97 mm) que os Simental x Nelore (3,85 mm) e os Canchim (3,85 mm). Os animais Angus x Nelore expressaram quantidades de RNAm da leptina (0,25) semelhantes em relação aos Canchim (0,76) e significativamente ($P < 0,05$) menores que a dos Simental x Nelore (1,17). O padrão de expressão do gene da leptina variou entre os grupos genéticos estudados, mas não foi associado às características de área-de-olho-de-lombo e espessura de gordura.

Palavras-chave: leptina, bovinos de corte, tecido adiposo, expressão gênica

Obese (Leptin) Gene Expression in Adipose Tissue of Different Genetic Groups of Beef Cattle Finished in a Brazilian Early Cattle System

ABSTRACT - This study was carried out in order to evaluate adipose tissue obese gene expression and to associate with ribeye area (REA) and subcutaneous fat layer (SFL) of three beef cattle genetic groups finished in a super-precocious system. REA and FL were evaluated by ultra-sound. Adipose tissue samples were taken from area around tail insertion at slaughter. Total RNA was extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method modified for adipose tissue samples. Total RNA samples were transferred to nylon membrane by dot blotting. Probes were labeled with alkaline phosphatase and hybridizations reactions were done using a commercial kit associated to a chemiluminescent detection system. Autoradiographs were analyzed in densitometer. Leptin RNAm values were normalized with mouse 28S RNAr and relative amount of transcripts was expressed in arbitraries units. Angus x Nelore had higher ($P<0.05$) SFL (5.97 mm) than Simental x Nelore (3.85 mm) and Canchim (3.85 mm). Angus x Nelore expressed similar amounts of leptin RNAm (0.25) in relation to Canchim (0.76) and lower ($P<0.05$) than Simental x Nelore (1.17). Leptin gene expression varied among genetic groups but it was not associated to ribeye area and fat layer characteristics.

Key-words: leptin, beef cattle, adipose tissue, gene expression

Introdução

O gene da obesidade (leptina) de ratos foi clonado em 1994 pela equipe liderada por Jeffrey Friedman na Universidade de Rockefeller (ZHANG et al., 1994). O produto deste gene é uma proteína que provoca significativa redução na ingestão de alimentos, no peso e na porcentagem de gordura corporal, além de aumentar o gasto energético e reduzir as concentrações séricas de glicose e insulina em ratos obesos homocigotos (*ob/ob*) (HALAAS et al., 1995). Devido ao seu efeito de redução do peso corporal, esta proteína foi denominada leptina que, em grego, significa magro (CEDDIA et al., 1998).

Desde a descoberta do gene da obesidade, os conhecimentos sobre a fisiologia da leptina progrediram rapidamente em roedores e humanos, mas em relação aos ruminantes, pouco se descobriu a respeito de sua verdadeira e efetiva ação. Isto se deve ao fato da obesidade humana ser um dos problemas de saúde que mais preocupa os pesquisadores em diversos países. Na produção animal, a obesidade, por si só, não é a maior preocupação dos pesquisadores. Porém, o conhecimento sobre os mecanismos básicos que regulam a ingestão de alimentos, o metabolismo energético e a deposição de gordura corporal pode auxiliar na busca de animais mais precoces para terminação de carcaça, o que traz benefícios para a cadeia produtiva da carne bovina. Isto porque a diminuição do ciclo de produção e o aumento da taxa de desfrute do rebanho proporciona um giro de capital mais rápido aliado à oferta de carne de melhor qualidade.

No entanto, existem poucos trabalhos publicados relacionando a ação da leptina sobre as características de carcaça em bovinos, o que está relacionado com as dificuldades de se encontrar ferramentas específicas para o estudo da expressão gênica e das variações plasmáticas da leptina em ruminantes. KAWAKITA et al. (2001) não recomendaram o uso de níveis plasmáticos de leptina para prever o acúmulo de gordura na carcaça de bovinos Japanese Black devido ao baixo coeficiente de correlação observado para estas duas características. Porém, a leptina plasmática foi positivamente associada com a espessura de gordura no músculo *longísimus*, com o grau de marmoreio em bovinos de corte adultos (MINTON et al., 1998 e TOKUDA et al., 1999) e com a gordura corporal de novilhos na fase de crescimento (EHRHARDT et al., 2000). Em estudo mais recente, DELAVAUD et al. (2002) observaram uma relação

curvilínea entre os níveis da leptina plasmática e o tamanho dos adipócitos em vacas holandesas.

Com relação ao padrão de expressão do gene da obesidade e as características de carcaça, ROBERT et al. (1998) observaram que polimorfismos no gene da obesidade suíno estavam associados com animais magros e que níveis elevados de RNAm da leptina foram correlacionados com maior espessura de gordura subcutânea. Em bovinos, BUCHANAN et al. (2002) observaram uma transição de citosina por timina no exon 2 do gene da leptina bovino responsável pela mudança de arginina por cisteína na seqüência de aminoácidos e a frequência do alelo T foi associada com carcaças mais gordas, com maior expressão gênica e com as raças britânicas (Angus e Hereford), enquanto que a frequência do alelo C foi associada com carcaças mais magras, com menor nível de expressão do gene e com raças continentais (Charolês e Simental).

Este estudo teve o objetivo de avaliar a expressão do gene da obesidade no tecido adiposo subcutâneo e relacioná-la com características de área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) na carcaça de bovinos de corte pertencentes a três grupos genéticos e submetidos ao sistema superprecoce.

Material e Métodos

O confinamento no sistema superprecoce foi realizado no período de outubro de 2000 a fevereiro de 2001. Para tanto, utilizaram-se bezerros machos, mestiços, pertencentes a três grupos genéticos Angus x Nelore (n=31), Simental x Nelore (n=30) e Canchim (n=30), desmamados aos sete meses de idade e alimentados com dieta a base feno de brachiaria, farelo de soja, milho moído, suplemento vitamínico e mineral, Rumensin, com relação volumoso: concentrado de 25:75 (na fase de crescimento) e 15:85 (na fase de terminação).

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).

A avaliação das características de carcaça foi feita com os animais em jejum de no mínimo 12 horas e realizada por ocasião do abate, quando as médias da idade (em dias) e do peso vivo (em kg) dos animais foram de 573 e 443, 641 e 430 e 446 e 477, dos grupos Angus x Nelore, Simental x Nelore e Canchim, respectivamente. Para tanto, mediu-se a área de secção do músculo *longissimus* (área-de-olho-de-lombo ou AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) do mesmo a partir de imagens obtidas entre a 12^a e a 13^a costela dos animais experimentais, conforme técnica descrita por PERKINS et al. (1992) modificada por GRESHAM (1998), utilizando um aparelho de ultrasonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02). As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

Amostras de tecido adiposo foram colhidas no depósito de gordura subcutâneo na base da cauda de todos os animais experimentais na linha de abate do frigorífico FRIGOL, localizado no município de Lençóis Paulista (SP). Imediatamente após a colheita, amostras de aproximadamente 6g foram embaladas em papel alumínio, identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para freezer -80°C para posterior extração do RNA total.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal (SP).

O RNA total foi obtido pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZINSKY e SACCHI, 1984) modificado por LOUVEAU et al. (1991), que consistiu na homogeneização de 3g de tecido adiposo com 10 ml de solução desnaturante (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM pH 7,0, sarcosyl 0,5% e β -mercaptoetanol 0,1 M). Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi desengordurada por meio de duas lavagens sucessivas com 10 ml de clorofórmio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de acetato de sódio 2M (pH 4,0), 10 mL de fenol equilibrado em água e 2 mL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (49:1), que foram misturados por agitação vigorosa durante 30 segundos. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g, 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi aspirada com seringa plástica estéril e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado igual volume de isopropanol e centrifugada a 12.000 x g, 4°C por 10 minutos. O precipitado foi então

lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 12.000 x g, 4°C por 10 minutos, seco a vácuo e posteriormente solubilizado em 1 mL de água tratada com dietilpirocarboneto (H₂O-DEPC). A concentração do RNA total de tecido adiposo bovino foi estimada através da leitura da absorbância a 260 nm (Beckman – DU[®] 640 – Nucleic Acid and Protein Analyser) e a pureza verificada medindo-se também a absorbância a 280 nm. A integridade do RNA total foi analisada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,5%), observando-se a presença das bandas de RNA ribossomal (18S e 28S). As amostras de RNA total que se apresentaram contaminadas com DNA foram tratadas com a enzima DNase RNase-Free (Gibco, BRL).

A quantificação da expressão do gene da leptina no tecido adiposo foi realizada utilizando-se o método de *dot blotting*. Devido a grande dificuldade de se obter amostras de RNA total de tecido adiposo em quantidade e qualidade consideráveis para a confecção das membranas, foram utilizadas 11 amostras do grupo Angus x Nelore e 12 de cada um dos grupos Simental x Nelore e Canchim.

Para preparação da membrana, cinco µg de RNA total foram desnaturados em 25 µL de solução desnaturante (gloxal 1M, dimetil sulfóxido-DMSO 50%, fosfato de sódio 0,1M pH 7,0) por 1 hora em banho-maria a 50°C. Em seguida, as amostras foram diluídas para um volume final de 400 µl em solução de TE 10:1 (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e transferidas para membranas de náilon *Immobiline N+* (Millipore) através de um sistema de microfiltração *Bio-Dot Microfiltration Apparatus* (Bio Rad) e fixadas por *crosslinking* pela exposição a 160.000 µJ.cm⁻² de radiação ultravioleta com comprimento de onda de 250 nm utilizando um *Ultraviolet Crosslinker* mod. CL-1000 (UVP, INC.). Para retirar o glioxal, as membranas foram lavadas em solução de Tris 20 mM (pH 8,0) por 20 minutos. Além das amostras de RNA total, foram aplicadas na membrana quantidades diluídas em série (10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125 ng) de um fragmento de cDNA do RNA ribossomal (RNAr) 28S de rato e do fragmento de DNA correspondente ao exon 2 do gene da leptina bovino (Lept 2), o quais serviram como controles positivo e negativo nas reações de hibridização.

Como sondas foram utilizados o fragmento Lept 2 (540 pb) para detecção do RNAm da leptina e um fragmento de DNA do RNAr 28S (580 pb) para normalização dos resultados obtidos. O fragmento Lept 2 foi amplificado por PCR, cuja reação foi realizada para um volume final de 30 µL, contendo 160 ng de DNA, 0,75 µM

de cada *primer*, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl), 250 µM de dNTP, 0,5U de enzima Taq DNA polimerase. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 96 °C por 120 segundos seguida de 35 ciclos para desnaturação a 96 °C por 30 segundos; anelamento dos *primers* a 69 °C por 80 segundos; e extensão a 72 °C por 60 segundos; finalizando com um ciclo de 72 °C por 5 minutos. As seqüências dos *primers* utilizados foram: 5'-TTGATTCCGCCGCACCTCTC-3' (*forward*) e 5'-AGGCAGGAGGCAAGGGAAGTAG-3' (*reverse*).

Tanto a marcação das sondas com fosfatase alcalina quanto as reações de hibridização foram realizadas utilizando-se o *kit* Alkphos-Direct, associado ao sistema quimioluminescente de detecção com CDP-*Star* da Amersham Pharmacia Biotech, seguindo-se as instruções do fabricante. Terminada a reação de detecção a membrana foi exposta a um filme de raio-X (Kodak T-MAT), em cassete munido de intensificador, a temperatura ambiente.

A intensidade dos sinais nas autoradiografias geradas foi medida através da leitura da absorbância a 550 nm em densitômetro Shimadzu (modelo CS-9301) e os valores de área do RNAm da leptina foram divididos pelo valor médio das áreas obtidas para o RNAr 28S e a quantidade relativa dos transcritos foi expressa em unidades arbitrárias.

Os efeitos das raças e dos níveis de expressão do gene da leptina sobre a área-de-olho-de-lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) foram analisados pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) do SAS (1993).

Resultados e Discussão

Os resultados das imagens obtidas por ultrasonografia revelaram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os animais experimentais pertencentes aos diferentes grupos genéticos quanto à área-de-olho-de-lombo (AOL), sendo que os valores médios obtidos para Angus x Nelore (n=31), Simental x Nelore (n=30) e Canchim (n=30) foram: 73,87, 73,25 e 73,25 cm², respectivamente. Com relação à espessura de gordura subcutânea (EGS), os animais Angus x Nelore depositaram

significativamente ($P < 0,05$) mais gordura (5,97 mm) que os Simental x Nelore (3,85 mm) e os Canchim (3,85 mm), como pode ser melhor visualizado na Figura 1.

A análise de expressão gênica revelou que a média dos níveis de RNAm da leptina no tecido adiposo dos animais Angus x Nelore (0,25) foi semelhante à dos Canchim (0,76) e significativamente menor ($P < 0,05$) em relação à dos Simental x Nelore (1,18), como pode ser visto na Figura 2A. As autorradiografias das membranas hibridizadas com as sondas de leptina e de 28S são apresentadas na Figura 2B. Observando-se a autorradiografia da membrana hibridizada com 28S, nota-se que houve uniformidade nas quantidades de RNA total aplicadas à membrana. Somente uma amostra (número 10) do grupo Canchim apresentou-se em concentração menor em relação às demais, o que pode ter ocorrido devido a falhas na quantificação da amostra de RNA total por espectrofotometria ou devido a perdas durante o processo de transferência dessa amostra para a membrana de náilon. Apesar disso, quando esta membrana foi hibridizada com a sonda de leptina, não foi possível a leitura densitométrica dos sinais de todas amostras aplicadas, provavelmente devido ao baixo nível de expressão do RNAm da leptina no tecido adiposo de alguns animais. Logo, a quantificação do RNAm dentro de cada grupo experimental foi realizada em um número reduzido de animais (Angus x Nelore, $n=9$; Canchim, $n=9$ e Simental x Nelore, $n=8$).

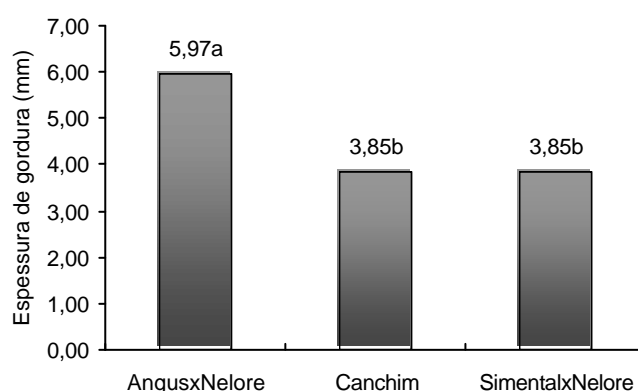


Figura 1. Diferenças entre as médias de espessura de gordura subcutânea (EGS) dos animais pertencentes aos três grupos genéticos.

Figure 1 Differences among fat layer (FL) means of three genetic groups of animals.

Apesar das diferenças significativas entre os grupos raciais com relação à espessura de gordura subcutânea e ao nível de RNAm de leptina no tecido adiposo,

estas duas características não se relacionaram estatisticamente, provavelmente devido ao reduzido número de amostras quantificadas nas análises de expressão gênica dentro de cada grupo experimental e aos elevados desvios padrões das médias das quantidades de RNAm da leptina.

Não se esperava observar o menor padrão de expressão do gene da leptina no grupo Angus x Nelore, o qual apresentou maior espessura de gordura na carcaça. Isto porque em suínos (RAMSAY et al., 1998 e ROBERT et al., 1998) a maior expressão do gene da leptina no tecido adiposo subcutâneo foi associada aos animais com maior deposição de gordura. Em bovinos, BUCHANAN et al. (2002) associaram carcaças mais gordas com maior expressão gênica e com as raças britânicas (Angus e Hereford); enquanto que as carcaças mais magras foram relacionadas com menor nível de expressão gênica e com as raças continentais (Charolês e Simental). Nesses estudos, porém, a expressão gênica foi medida em animais geneticamente selecionados para maior deposição de gordura dentro de cada grupo racial, o que não aconteceu no presente estudo, onde os animais utilizados na análise de expressão foram escolhidos ao acaso dentro de cada grupo.

Deve-se ressaltar que os animais do estudo de BUCHANAN et al. (2002) que apresentaram maior expressão do gene da leptina no tecido adiposo eram homozigotos (TT) para um polimorfismo no exon 2 do gene da leptina caracterizado pela transição de citosina por timina responsável pela mudança de arginina por cisteína na seqüência de aminoácidos. Estes autores levantaram a hipótese de que tal polimorfismo poderia ter causado uma perda parcial da função biológica da leptina que resultou em aumento na sua expressão gênica devido a um *feedback* compensatório.

Em outro experimento realizado com os mesmos animais utilizados no presente estudo, vários polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCPs) foram observados no gene da leptina, inclusive no exon 3, sendo que nesta região os SSCP's foram denominados de LEPT7-A, B, C ou D (SALMAN, 2003, dados não publicados). Considerando estes genótipos, observou-se uma diferença numérica entre a quantidade de RNAm da leptina no tecido adiposo dos animais do genótipo A (1,16) em relação àqueles do genótipo B (0,58), indicando uma possibilidade de que este polimorfismo não seja silencioso. No entanto, as análises dos efeitos desses polimorfismos sobre a seqüência de aminoácidos da leptina e, conseqüentemente, sobre

a sua conformação e função, só poderão ser realizadas após o seqüenciamento dos mesmos.

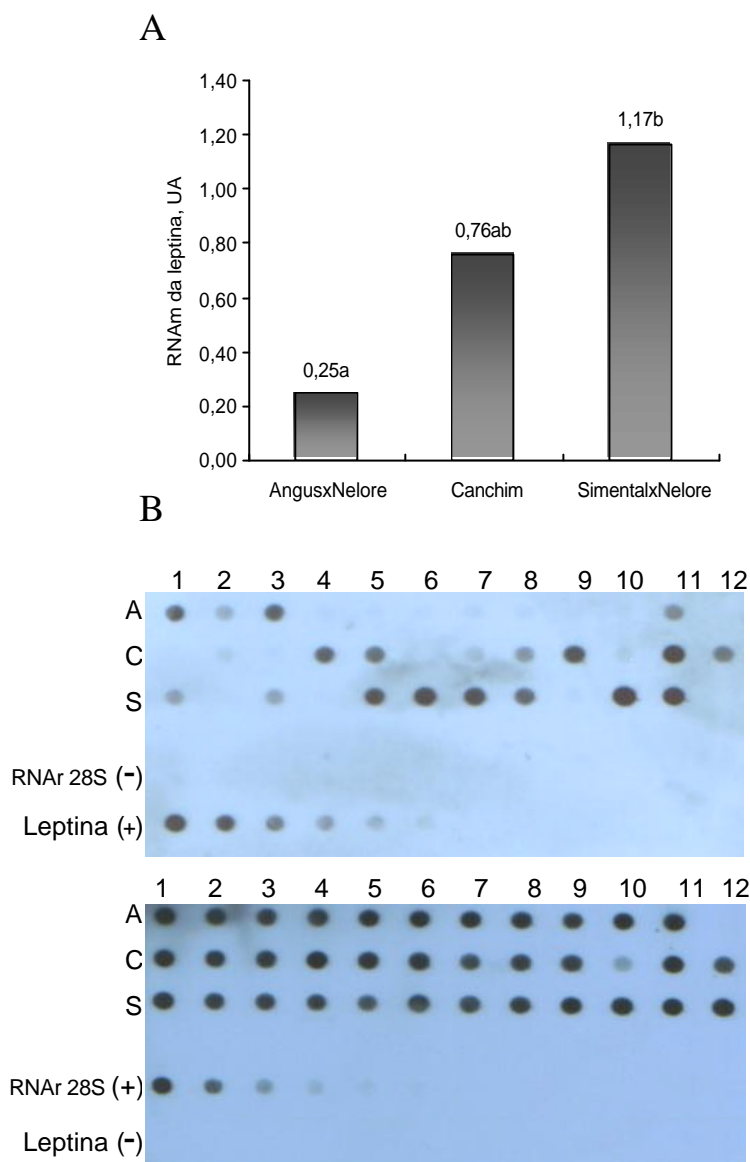


Figura 2. Painei A: Médias de RNAm da leptina em relação ao RNAr 28S, expressas em unidades arbitrárias (UA), no tecido adiposo dos animais dos três grupos genéticos. Painei B: Autorradiografias do RNAm da leptina e do RNAr 28S. Nas linhas A, C e S apresentam-se as amostras dos grupos Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore, respectivamente. Nas linhas (+) e (-) apresentam-se os controles utilizados (fragmento de DNA da leptina e do RNAr 28S) diluídos em série (10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125 ng). Nas colunas numeradas de 1 a 12 apresentam-se as amostras referentes a cada animal.

Figure 2. Panel A: Means of leptin RNAm in relation to 28S RNAr, expressed in arbitrary units (AU), within adipose tissue of experimental animals. Panel B: Autoradiograph of leptin and 28S RNAr RNAm. In lines A, C and S are Angus x Nellore, Canchim and Simmental x Nellore samples, respectively. In lines (+) and (-) are showed control samples (DNA fragment of

Leptina and 28S) serial diluted (10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.3125 ng). In column 1 to 12 are showed each animal sample.

Não foram encontradas na literatura consultada citações sobre o uso do método *dot blotting* associado a um sistema não radioativo de detecção de sinais para avaliação da expressão gênica da leptina no tecido adiposo animal. Nos experimentos com suínos (RAMSAY et al., 1998 e ROBERT et al., 1998) o método utilizado foi o *Northern blot* com amostras de RNA total, o qual não foi indicado por CHILLIARD et al. (2001) para a quantificação de RNAm da leptina no tecido adiposo de ruminantes. Os primeiros resultados de expressão gênica da leptina em bovinos foram obtidos através do *Northern blot* com o RNAm obtido em coluna de Poli A+ (JI et al., 1998) ou em ensaios de proteção a ribonuclease (TSUCHIYA et al., 1998). Recentemente, LEE e HOSSNER (2002) propuseram o uso de PCR competitiva quantitativa (qc-PCR) para avaliar a expressão do gene da leptina no tecido adiposo subcutâneo, abdominal e renal de ovinos, embora o método mais recente e refinado para medir expressão gênica seja a PCR quantitativa em tempo real (Quantitative Real Time PCR). A opção pelo uso do *dot blotting* no presente estudo baseou-se no fato do mesmo já estar devidamente padronizado no laboratório onde foram realizadas as análises de expressão gênica, o que pode ser comprovado com a qualidade da membrana hibridizada com o gene constitutivo do RNAr 28S de rato (Figura 2B).

Conclusões

O padrão de expressão do gene da obesidade bovino apresentou variação entre os grupos genéticos avaliados, sendo que os animais com maior deposição de gordura na carcaça (Angus x Nelore) foram os que apresentaram menores quantidades de RNAm da leptina.

Nas condições do presente estudo, não foi possível estabelecer uma relação estatística entre o padrão de expressão do gene da obesidade bovino e as características de área-de-olho-de-lombo e espessura de gordura subcutânea de novilhos superprecoces.

Referências Bibliográficas

- BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
- CEDDIA, R.P.; WILLIIAN JR., W.N.; LIMA, F.B. et al. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.715-22, 1998.
- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.271-295, 2001.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156, 1984.
- DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y. et al. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 1317-1328, 2002.
- EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J. et al. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 166, p.519-528, 2000.
- GRESHAM, J. D. Study Guide. Real-Time ultrasound training conference. Bovine applications. University of Tennessee at Martin. 1998. 20p.
- HALAAS, J.L.; GAZIWALA, K.S.; MAFFEI, M. et al. Weight-reducing effects of plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v.269, p. 543-9, 1995.
- JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R. et al. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**, v.9, p.1-14, 1998.
- KAWAKITA, Y.; ABE, H.; HODATE, K. et al. The relation between plasma leptin concentrations and carcass lipid contents in Japanese Black steers. **Livestock Production Science**, v.73, p.25-34, 2001.
- LEE, S.H.; HOSSNER, K.L. **Use of ribonuclease protection assay and quantitative PCR for the analysis of adipose tissue marker genes**. Department of Animal Science of Colorado State University, 2002. p.151-154 (Animal Science Research Report).
- LOUVEAU, I.; CHAUDHURI, S.; ETHEERTON, T.D. An improved method for isolating RNA from porcine adipose tissue. **Analytical Biochemistry**, v.169, p.308-10, 1991.
- MINTON, J.E.; BINDEL, D.J.; DROVILLARD, J.S. et al. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76 (supplement 1), p. 231, 1998.

- PERKINS, T. L., GREEN, R. D., MILLER, M. F. Evaluation of alternative ultrasound measurement sites as estimator of yield grade factors in beef cattle. **Proceedings Western Section America Society of Animal Science**, v.43, p.294, 1992.
- RAMSAY, T.G.; YAN, X.; MORRISON, C. The obesity in Swine: sequence and expression of porcine leptin. **Journal Animal Science**, v.76, p. 484-490, 1998.
- ROBERT, C.; PALIN, M.; COULOMBE, N. et al. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p. 473-82, 1998.
- SAS. User's Guide, Version 6, Cary, NC:SAS Institute Inc., 1993.
- TOKUDA, T.; MATSUI, R; YANO, H. Leptin concentrations in the blood of ruminants. **South Africa Journal of Animal Science**, v. 29, p. 211-212, 1999.
- TSUCHIYA, T.; NAGAO, Y.; OZAWA, A. et al. Decrease of obese gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue by fasting. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, p.2068-9, 1998.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p.425-32, 1994.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Novas perspectivas sobre a seleção de animais com o uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de bovinos de corte, visando características de carcaça desejáveis para terminação em sistema de produção de novilhos superprecoces surgem com a elucidação da variabilidade genética através da descoberta de novos polimorfismos no gene da leptina de bovinos pertencentes aos grupos genéticos Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore.

Existem indícios de que variações na expressão gênica da leptina entre os grupos genéticos Angus x Nelore, Canchim e Simental x Nelore sejam decorrentes de alterações na seqüência do gene que podem interferir na síntese da leptina e, ou na conformação da mesma alterando a manifestação de características de carcaça, em especial a velocidade de deposição de gordura sobre o músculo *longíssimus*. Para confirmar esta hipótese, no entanto, além do seqüenciamento dos SSCPs observados no gene da leptina desses animais, novos experimentos devem ser realizados com um número maior de animais devidamente genotipados e utilizando técnicas de análise de expressão gênica mais sensíveis.