



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE
DGAT1 E NO GENE DA *LEPTINA* EM UMA POPULAÇÃO
DE NOVILHAS NELORE**

MARIA ELIANE VECHEITINI

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque
Co-orientadora: Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento
Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

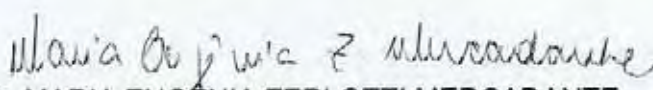
TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DGAT1 E
LEPTINA EM UMA POPULAÇÃO DE NOVILHAS NELORE

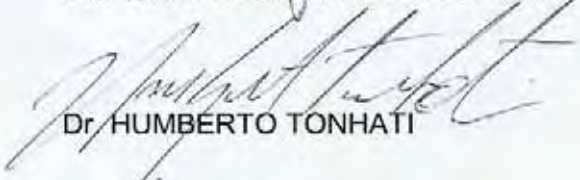
AUTORA: MARIA ELIANE VECHETINI

ORIENTADORA: Dra. LÚCIA GALVÃO DE ALBUQUERQUE

Co-Orientador(a): Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE

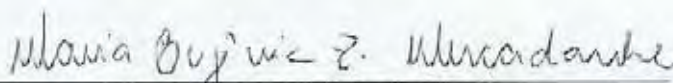
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE


Dr. HUMBERTO TONHATI


Dra. LENIRA EL FARO ZADRA

Data da realização: 24 de setembro de 2007.



Presidente da Comissão Examinadora

Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE

Co-Orientadora no exercício da orientação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA ELIANE VECHETINI, solteira, nascida no dia 06 de abril de 1981, em Araras - São Paulo, filha de Armando Vechetini († *in memorian*) e Maria José Ortiz Vechetini. Iniciou em agosto de 2000 o curso de Zootecnia na Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – FCAV – Jaboticabal/ SP. Em dezembro de 2004 conclui a graduação, obtendo-se o título de Zootecnista. Em agosto de 2005 ingressou no curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, na faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), na UNESP – Campus de Jaboticabal – SP, obtendo-se o grau de mestre em 24 de setembro de 2007 sob orientação da professora Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque.

OFEREÇO...

Meus irmãos Elaine, Roger, Willian e LÍlian...

Meus cunhados Marcelo, Neto, Mariana e Quênia...

Meus sobrinhos Julia, Pedro e Enzo...

Minha Mãe Maria José e meu Pai Armando.

Minha família MA-RA-VI-LHO-SA!!!

DEDICO...

Ao Marcelo,

Meu namorado e companheiro,

*Que conseguiu reduzir toda a angústia e apreensão
com seu amor e carinho!*

Meus Sinceros Agradecimentos...

À Profa. Lucia Galvão de Albuquerque pela orientação e confiança.

À Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, minha co-orientadora, pela essencial participação durante o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À FAPESP, pela concessão do auxílio-pesquisa que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

À FCAV – UNESP de Jaboticabal, pelo oferecimento de ensino de qualidade e de estrutura adequada para meu desenvolvimento profissional.

À EEZS – Instituto de Zootecnia de Sertãozinho/ SP e toda sua equipe, pela disponibilidade dos dados utilizados neste experimento.

À banca examinadora: Prof. Humberto Tonhati e Dra. Lenira El Faro, pelas valiosas sugestões que muito enriqueceram esta dissertação.

Aos amigos do Departamento de Zootecnia: Márcio Cinachi, Annaíza, Arione, Fernando (Uruguaio), Denise, Fernanda Monsalves, Fernanda Breda, Márcio Ribeiro, Marcos (Lasanha), Monyka, Armand, Selma, Rafael, Maira, Leonardo, Geléia, Raul, e Davi.

Aos técnicos João Boer e Paulo Tosta, e aos estagiários e amigos Livia, Renan, Gregório, Fernanda Camargo, Larissa, Caju, Aline, Elias (Gafa), Bruna (Longa), André, Henri, Ricardo, Eveline e Vanessa, do Laboratório de Genética Molecular do prédio de Melhoramento Animal, da FCAV – UNESP, pelo apoio nos momentos de dificuldade (que foram muitos), e também nos momentos de alegria (que foram inesquecíveis)!

Às amigas Liliam, Bia, Priscilla e Luciana, pela companhia durante às aulas, os cafés, os bate-papos....

Aos imprescindíveis amigos Raphael, Malu, Viúva (Fernanda), Simone, Sabryna pela compreensão, companheirismo, carinho, sinceridade e principalmente pela paciência!

Aos amigos de todas as horas, principalmente daquelas mais descontraídas e divertidas, Fabiano, Ana, Stael, Paulinha, Gláucia, Renato, Beth, Gui Guerra e Luciano, que me ajudaram a tornara caminhada mais suave, ainda mais depois dos churrascos....

ÍNDICE

RESUMO _____	xii
ABSTRACT _____	xiii
INTRODUÇÃO _____	1
REVISÃO DE LITERATURA _____	4
Gene que codifica a enzima DGAT1 _____	4
Gene que codifica o hormônio da Leptina _____	6
MATERIAL E MÉTODOS _____	8
Origem dos animais _____	8
Colheita de material para extração de DNA _____	8
Análises Laboratoriais _____	9
Extração de DNA _____	9
Eletroforese em gel de agarose _____	10
Amplificação do DNA por PCR do gene <i>DGAT1</i> e do gene <i>LEPTINA</i> _____	10
Padronização do ensaio RFLP para o gene <i>DGAT1</i> e para o gene <i>LEPTINA</i> _____	11
Determinação das freqüências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade, e teste do χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg _____	13
RESULTADOS _____	16
Extração de DNA _____	16
Amplificação por PCR, análise RFLP e cálculo das freqüências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade, e teste do χ^2 para o gene <i>DGAT1</i> _____	16
Amplificação por PCR, análise RFLP e cálculo das freqüências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade, e teste do χ^2 para o gene <i>Leptina</i> _____	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	26
CONCLUSÕES _____	27
REFERÊNCIAS _____	28

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- FIGURA 1.** Estrutura do gene *DGAT1*. Exons estão representados por retângulos. K232A indica a mutação não-conservativa AA → GC _____ 6
- Tabela 1.** Condições de amplificação dos fragmentos dos genes *DGAT1* e *LEPTINA* _____ 11
- Tabela 2.** Condições de digestão dos fragmentos dos genes *DGAT1* e *LEPTINA* _____ 12
- FIGURA 2.** Representação esquemática do fragmento do gene *DGAT1* que contém o polimorfismo K232A. **A.** As seqüências em negrito nas extremidades do fragmento representam os iniciadores utilizados para a amplificação; **B.** sítio de corte da endonuclease *Eae I*; **C.** alelos formados pela restrição com a enzima *Eae I*. _____ 12
- FIGURA 3.** Representação esquemática do fragmento do gene *LEPTINA* que contém a substituição C → A. **A.** As seqüências em negrito nas extremidades do fragmento representam os iniciadores utilizados para a amplificação; **B.** sítio de corte da endonuclease *Bsa AI*; **C.** alelos formados pela restrição com a enzima *Bsa AI* _____ 13
- FIGURA 4.** Eletroforograma contendo amostras de DNA genômico extraído. _____ 16
- FIGURA 5.** Eletroforograma contendo produtos amplificados do gene *DGAT1* em 15 animais, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: marcador de DNA 100bp. _____ 17
- FIGURA 6.** **A.** Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela endonuclease de restrição *Eae I* para o gene ***DGAT1***, com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100pb. **B.** Detalhe dos padrões de migração dos dois genótipos encontrados na população. _____ 18
- FIGURA 7.** Distribuição de freqüências observadas dos alelos A e K do gene ***DGAT1*** nos rebanhos _____ 19
- Tabela 3.** Número de animais (N_o) e freqüências genotípicas (F_o) observadas, e número de animais (N_e) e freqüências genotípicas

esperadas (F_e) dos genótipos do gene DGAT1 _____	20
Tabela 4. Número de animais observado (N_o), esperado (N_e), e frequências genóticas observadas (F_o), e esperadas (F_e) do gene DGAT1 para cada rebanho estudado _____	21
FIGURA 8. Eletroforograma contendo os produtos de PCR que correspondem à região entre o intron 2 e exon 3 do gene LEPTINA em 15 animais, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100 pb _____	22
FIGURA 9. A. Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela <i>Bsa</i> AI para o gene LEPTINA , com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100 pb. B. Detalhe dos padrões de migração dos três genótipos encontrados na população. _____	23
Figura 10. Distribuição de frequências dos alelos A e G do gene LEPTINA entre os grupos de seleção. _____	24
Tabela 5. Número de animais (N_o) e frequências genóticas observadas (F_o), e número de animais (N_e) e frequências genóticas esperadas (F_e) dos genótipos do gene LEPTINA . _____	25
Tabela 6. Número observado (N_o), esperado (N_e), e frequências genóticas observadas (F_o), e esperadas (F_e) do gene LEPTINA entre os 3 grupos estudados. _____	25

ABREVIATURAS:

AOL - área de olho de lombo

cM – centimorgan

DEP - diferença esperada na progênie

DGAT1 – gene que codifica a enzima Acyl - CoA:diacylglicerol acyltransferase

DNA – ácido desoxirribonucleico (desoxiribonucleic acid)

dNTP – dideoxinucleotídeo livre (deoxyribonucleotide triphosphate)

Kb - quilo base

KDa - quilo dalton

NeC – Nelore Controle

NeS – Nelore Seleção

NeT – Nelore Tradicional

pb- pares de base

PCR – reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction)

QTL – loco de característica quantitativa (quantitative trait loci)

RFLP – Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (restriction fragment length polymorphism)

RNA_m – RNA mensageiro

RPM - rotações por minuto

RTU – ultra-som de tempo real

SAM - seleção assistida por marcadores

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism)

BTA – cromossomo bovino (bovine *taurus* autosome)

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *DGAT1* E *LEPTINA* EM UMA POPULAÇÃO DE NOVILHAS NELORE

RESUMO: Este estudo foi conduzido com 125 novilhas da raça Nelore de três rebanhos: Nelore Seleção (NeS), Nelore Tradicional (NeT), ambos selecionados para peso ao sobreano, e Nelore Controle (NeC), selecionado para a média deste peso, com o objetivo de avaliar polimorfismos do tipo PCR-RFLP's nos genes *DGAT1* e *LEPTINA*. Os rebanhos analisados pertencem ao Programa de Melhoramento Genético das Raças Zebuínas, da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho – SP - Brasil. O DNA genômico foi extraído de leucócitos pelo método salino. Para a amplificação dos fragmentos de gene foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos na literatura. Os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição para a detecção dos polimorfismos *DGAT1* - EaeI e *LEPTINA* - BsaAI, e submetidos a eletroforese em gel de agarose. O *DGAT1*^K (lisina) foi o alelo que apresentou maior frequência nos rebanhos. As maiores frequências do genótipo *DGAT1*^{KK} foram encontradas nos rebanhos selecionados NeS e NeT, respectivamente, seguido pelo heterozigoto *DGAT1*^{KA}. Nenhum animal apresentou o genótipo *DGAT1*^{AA} (alanina). As frequências alélicas e genotípicas do *DGAT1* não diferiram entre NeS e NeT, mas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre esses e o rebanho controle NeC. Em relação ao hormônio Leptina, as frequências dos alelos foram $LEP^A = LEP^G = 0,50$ em toda a população. O heterozigoto LEP^{AG} foi o genótipo que apresentou maior frequência para os três rebanhos. A maior frequência do genótipo LEP^{GG} foi observada no rebanho controle (NeC), mas as frequências alélicas e genotípicas entre os rebanhos não foram estatisticamente diferentes.

Palavras-chave: *DGAT1*, *LEPTINA*, marcadores moleculares, Nelore, RFLP.

TITLE: POLYMORPHISM CHARACTERIZATION IN *DGAT1* AND *LEPTIN* GENES IN A NELORE HEIFERS POPULATION

ABSTRACT: This study was conducted with 125 Nelore heifers from three different herds: selection (NeS), traditional (NeT), both selected for yearling weight, and control (NeC), selected for mean yearling weight, and had the objective of looking for PCR-RFLP's polymorphisms in *DGAT1* and *LEPTIN* genes. The herds analysed belong to the Zebu Breeding Program, of the Animal Breeding Experiment Station of Sertãozinho – SP – Brazil. The DNA was extracted from leukocytes by the saline protocol, and to amplify the gene fragments primers previously described were used. The PCR products were digested by restriction enzymes to detect the *DGAT1* - EaeI e *LEPTINA* - BsaAI polymorphisms, and were submitted to electrophoresis. The *DGAT1*^K allele (lisine) presented the larger frequency in the population. The highest frequencies of the *DGAT1*^{KK} were found in the NeS e NeT herds, respectively, followed by the *DGAT1*^{KA}. Neither animal presented the *DGAT1*^{AA} genotype (alanine). Selected herds (NeS and NeT) allelic and genotypic frequencies for this locus were not significantly different. However, significant differences ($p < 0.05$) were detected between the selected (NeS and NeT) and the control herds (NeC). In respect of the Leptin hormone, the allele frequencies were $LEP^A = LEP^G = 0,50$ in all the population. The LEP^{AG} was the most frequent genotype in all the three herds. The control group (NeC) presented the LEP^{GG} largest frequency, however, no significant differences were observed among the three herds for this locus.

Key-words: *DGAT1*, *LEPTIN*, molecular markers, Nelore, RFLP.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é uma atividade de grande importância social e econômica no Brasil. Elevar a produtividade e a qualidade do setor pecuário, de forma sustentável tem se constituído no maior desafio para a pesquisa.

A seleção fenotípica em longo prazo pode alterar a frequência alélica de um grande número de loci, os quais afetam mais que um carácter e/ou estão ligados a outros loci, resultando além da resposta direta no carácter selecionado, também respostas correlacionadas (desejáveis/ indesejáveis) em muitos outros caracteres.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível o estudo mais detalhado de genes envolvidos com características quantitativas, o que permitirá avanços nos programas de melhoramento genético, através do uso de seleção assistida por marcadores. A busca por estes marcadores baseia-se primariamente em análises de polimorfismos localizados em genes estruturais, responsáveis pela manifestação de características de importância econômica.

A técnica de PCR-RFLP apresenta alta confiabilidade e eficiência na detecção de mutações pontuais, que podem servir como marcadores genéticos para características de interesse econômico. Este procedimento tem custo relativamente baixo, além da facilidade de manipulação.

As substituições nucleotídicas geram sítios de restrição polimórficos, os quais, podem ser facilmente identificados através de análises de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (ZADWORNY & KUHNLEIN, 1990), podendo ser usados como marcadores genéticos.

O marcador genético pode ser usado para relacionar alelos de características quantitativas e informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa. A aplicação destes marcadores, tanto pela combinação dos alelos de duas ou mais raças, quanto pela seleção dos melhores alelos dentro de uma raça, para o estudo da variabilidade pode de maneira aplicada, ser correlacionado com características produtivas.

O *DGAT1* foi descrito por vários autores como sendo responsável pela síntese e metabolismo de triglicerídeos em várias espécies mamíferas (JING et al., 2007; CASES et al., 1998). Alguns autores afirmam que este gene está envolvido com a quantidade de gordura no leite (GRISART et al., 2004), e também com a deposição de gordura em gado de corte (THALLER et al., 2003).

LACORTE et al. (2006), estudando a mutação *DGAT1* K232A em bovinos, encontraram altas frequências do alelo A (mutante alanina) para a raça Holandesa (73%), e frequências intermediárias para seus cruzados (Gir x Holandesa - 39%). As frequências desse alelo foram muito baixas nas raças Gir e Red Sindhi (4,0 e 2,5%, respectivamente), e o mesmo não foi encontrado nas amostras das raças Nelore e Guzerá. Um decréscimo significativo em produção de proteína e leite, e aumento em produção de gordura foi associado com o alelo K (lisina), enquanto o alelo A (alanina) foi associado com o efeito contrário (SPELMAN et al., 2002, THALLER et al., 2003, WELLER et al., 2003).

O gene da *LEPTINA* é responsável pela síntese de um hormônio envolvido com os mecanismos de regulação da ingestão de alimentos e com o metabolismo energético, prevenindo a deposição excessiva de gordura corporal (CHILLIARD et al., 1998). Este gene também 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 (CEDDIA et al. 1998).

CHOUDHARY et al. (2006), estudando o polimorfismo *Bsa*AI - RFLP da *LEPTINA*, relataram que a frequência do homozigoto AA foi muito baixa (0,03 a 0,07) nas raças estudadas (Gir, Hariana, Sahiwal, Nimari, Jersey, Holandesa e seus cruzamentos). A população Holandesa mostrou a mais alta frequência do genótipo GG (0,67) e a mais baixa frequência do heterozigoto (0,30).

A Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho mantém um experimento de seleção para peso ao sobreano na raça Nelore, com uma população controle, desde 1981. No momento esta população está com quatro gerações de seleção para esta característica, o que fornece uma boa oportunidade de estudar a ocorrência de polimorfismos em alguns genes de interesse na produção de carne.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Identificar polimorfismos do tipo PCR-RFLP nos genes *DGAT1* e da *LEPTINA*;
- 2.2. Verificar as frequências alélicas e genotípicas dos possíveis polimorfismos em dois rebanhos selecionados para peso ao sobreano e em um rebanho controle.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gene que codifica a enzima Acyl CoA:diacylglicerol acyltransferase (*DGAT1*)

O gene *DGAT1* bovino tem, aproximadamente, 8.6 Kb e compreende 17 exons, medindo em média 121,8 pb, e está localizado no cromossomo bovino 14. A conformação dos introns é estritamente conservada entre humanos e bovinos (GRISART *et al.*, 2002).

A identificação do cDNA do gene *DGAT1* em ratos (CASAS *et al.*, 1998) e em humanos (OELKERS *et al.*, 1998) tem permitido a documentação do papel-chave do *DGAT1* na síntese de triglicerídeos em várias espécies animais e vegetais. A enzima DGAT1 catalisa o passo final na biossíntese de trigliceróis (TG), e esta reação envolve a acilação dependente de acyl-CoA da sn-1,2 diacylglicerol (DG), a qual é fornecida pela esterificação de 2-monoacylglicerol (monoacylglicerol pathway), ou pela hidrólise da fosfatidase (sn- glycerol-3phosphate pathway) (LEHNER & KUKSIS, 1996).

CASES *et al.* (1998) afirmaram que a enzima acyl-CoA: diacylglycerol-acyltransferase exerce papel fundamental no metabolismo do diacylglycerol celular em processos fisiológicos, como a absorção intestinal de gordura, síntese lipoprotéica, formação do tecido adiposo e lactação.

CASAS *et al.* (2003) também descrevem algumas características que apontam o *DGAT1* como um gene candidato funcional e posicional para a deposição de gordura intramuscular: (1) o produto deste gene é diretamente envolvido com a síntese de triglicerídeos; (2) as análises das seqüências expressadas fornecem evidências de sua transcrição não somente em glândulas mamárias bovinas, mas também em tecidos adiposos; (3) o mapeamento do híbrido radioativo localiza o *DGAT1* próximo ao microsatélite CSSM66 no cromossomo 14, o qual está relacionado com a gordura de cobertura em carcaças bovinas. De acordo com os achados desses autores, é possível que a região entre 0 e 20 cM do BTA 14 abrigue genes responsáveis pela produção de gordura,

independente da especialização (corte ou leite) em bovinos e, um dos genes candidatos localizados nesta região é o *DGAT1*.

Segundo GRISART *et al.* (2002), existem pelo menos quatro substituições nucleotídicas no *DGAT1*, porém três delas ocorrem dentro de introns. Os autores afirmam que, devido ao fato de a substituição K232A ocorrer em um exon e ocasionar troca de um aminoácido, esta é responsável pelos efeitos do QTL presente no cromossomo 14. O esquema da estrutura do gene *DGAT1* está como apresentado na Figura 1.

A substituição de dinucleotídeos (AA/CG) no início do éxon VIII do gene *DGAT1* resulta na troca do aminoácido lisina (AA) pela alanina (CG), e ocasiona efeito direto na ação da enzima. Esta mutação é conhecida como K232A, e é tida como causadora das variações observadas em deposição de gordura, e por afetar positivamente a qualidade do leite (GRISART *et al.*, 2002; GRISART *et al.*, 2004).

O alelo lisina do gene *DGAT1* tem efeito positivo sobre o conteúdo de gordura do leite em diferentes raças (WINTER *et al.*, 2002). O fato de o alelo lisina ser consistentemente associado com maior conteúdo de lipídeos em diferentes tecidos sugere o envolvimento deste fator na variação do conteúdo de gordura. THALLER *et al.* (2003) sugeriram que a mutação K232A pode afetar a deposição de gordura intramuscular e subcutânea em bovinos. Estudando *Bos taurus*, esses autores observaram que o alelo da lisina é a versão mais eficiente com relação à síntese de triglicérides, devido à tendência para maior conteúdo de gordura no músculo *semitendinosus* em animais homozigotos lisina/lisina, e ressaltaram que estes efeitos podem ser recessivos. Além disto, foi descrito um QTL para produção de gordura localizado no BTA14 próximo à região onde se encontra o gene *DGAT1* (CASAS *et al.*, 2000; CASAS *et al.*, 2003, CASAS *et al.*, 2005).

Segundo CASAS *et al.* (2003), QTLs irão potencializar o ganho genético, especialmente para características difíceis ou onerosas de serem mensuradas, através de seleção assistida por marcadores. Para aumentar a eficiência de seleção para características de interesse econômico será necessário o desenvolvimento de estratégias de seleção considerando polimorfismos e o modo recessivo de herança (THALLER *et al.*, 2003).

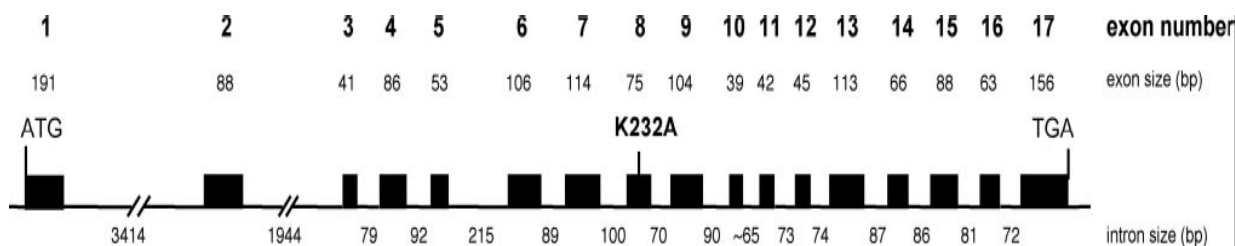


FIGURA 1. Estrutura do gene *DGAT1*. Exons estão representados por retângulos. K232A indica a mutação não-conservativa AA → GC. (Fonte: WINTER *et al.*, 2002).

3.2 Gene que codifica o hormônio da Leptina

O gene da *LEPTINA*, 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.*, 2001). O hormônio denominado leptina é sintetizado e secretado pelos adipócitos, e está altamente correlacionado com o peso corporal e a adiposidade (CHEHAB *et al.*, 1996). O gene da Leptina em bovinos apresenta-se com, aproximadamente, 18,9 kb, localiza-se no BTA 4 (POMP *et al.*, 1997) e é composto por três exons, que perfazem 3,2 kb e dois introns, que somados totalizam 15,7 kb.

A transcrição desse gene resulta em um 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). Segundo esses últimos, a organização exon-intron desse gene é muito conservada entre camundongos, humanos e bovinos.

Em bovinos de corte, polimorfismos neste gene foram detectados (POMP *et al.*, 1997; KONFORTOV *et al.*, 1999; HAEGMAN *et al.*, 2000), e associados ao consumo de ração (LAGONIGRO *et al.*, 2003), a área-de-olho-de-lombo (SALMAN, 2003), e a deposição de gordura na carcaça (BUCHANAN *et al.*, 2002).

No estudo de BUCHANAN *et al.* (2002) foi observada uma transição de citosina (C) por timina (T) no exon 2 do gene da *LEPTINA* bovina, responsável pela mudança de arginina por cisteína na seqüência de aminoácidos. A freqüência 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 freqüência do alelo C foi associada com carcaças mais magras, com menor nível de expressão deste gene e com raças continentais (Charolês e Simental).

SALMAN (2003) encontrou sete polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCPs) no éxon 3 do gene da leptina de bovinos de corte de três grupos genéticos (Angus x Nelore, Simental x Nelore e Canchim x Nelore), sendo que a freqüência de um desses SSCP's foi associada à maior área-de-olho-de-lombo.

COSTA (2006) não identificou polimorfismos através da técnica RFLP no gene da *LEPTINA* em fêmeas Nelore selecionadas para precocidade sexual. O autor sugeriu que uma explicação para esta ocorrência é o fato de a população amostrada ser pura e selecionada para precocidade, o que pode ter ocasionado a fixação de apenas um alelo, visto que não foi possível avaliar também uma população controle, ou seja, não selecionada para tal característica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos animais

Os animais amostrados para esse estudo são provenientes de rebanhos da raça Nelore da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho – SP (EEZS), unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizada ao norte do estado de São Paulo (21° 10' latitude norte e 48° 5' longitude oeste), Brasil. Estes animais fazem parte do Programa de Seleção das Raças Zebuínas, iniciado em 1978, e desde 1980 estão separados em três rebanhos, sendo Nelore Seleção, (NeS) e Nelore Tradicional (NeT) selecionados para peso ao sobreano, e um rebanho controle (NeC), em que os animais mantidos para reprodução estão na média desse peso, em um esquema de seleção dentro de rebanhos. O NeT diferencia-se do NeS por ter recebido, eventualmente, touros de outros rebanhos, inclusive comerciais.

Das 125 novilhas analisadas, nascidas entre 2003 e 2004, 41 são do rebanho NeS, 42 do NeT e 42 do NeC. Esta população tem coeficiente de geração médio de 5,1 anos (RAZOOK, 2006), sendo, portanto, representantes da 4ª geração de seleção em cada um dos rebanhos. Após 24 anos (1981 a 2004) de seleção, a média dos valores genéticos do peso ao sobreano das novilhas é de 1,9 kg no NeC, 42,2 kg no NeS e 44,6 kg no NeT (RAZOOK & MERCADANTE, 2007).

4.2. Colheita de material para extração de DNA

Para as análises laboratoriais foram colhidos cerca de 5mL de sangue periférico de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos *vacutainer* contendo 7,5 mg de EDTA. Após a colheita, os tubos foram mantidos à -20° C até o momento da extração de DNA.

4.3. Análises Laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética e Citogenética “Marcos Gianoni”, do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

4.4. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído conforme metodologia descrita por ZADWORNY & KUHNLEIN (1990).

Após descongelar as amostras, foram aliquotados 1000µL de sangue de cada amostra em tubos *eppendorf* de 2mL. Foram adicionados 40µL de Nonidet P-40 (12,5%) em cada tubo completando-se em seguida o volume com TKM-1. Cada tubo foi vigorosamente agitado em vortex e centrifugado por 15 min a 10600 x g / 28°C.

O sobrenadante de cada amostra foi então descartado, e adicionou-se 1000µL de TKM-1 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M) e EDTA (0,1M) pH 8,0], agitou-se novamente em vortex até dissolver o pellet, completou-se novamente o volume e centrifugou-se por mais 10 minutos a 10600 x g / 28°C. Este procedimento foi repetido até a obtenção de um pellet de coloração clara.

Novamente o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1000µL de TKM2 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M); EDTA (0,1M) pH 8,0 e NaCl (1M)] + 100µL de SDS10%, agitando-se em seguida as amostras vigorosamente em vortex até dissolução total do pellet. As amostras foram então levadas ao banho-maria a 55°C por uma hora. Após este período adicionou-se 400µL de NaCl 6M por amostra, agitando-se vigorosamente em vortex e centrifugando a 14840 x g por 20 minutos / 4°C.

Foram aliquotados 1000µL do sobrenadante de cada amostra e transferido para tubos novos (2,0mL), adicionando-se então 1000µL de etanol absoluto (gelado) e misturando cada amostra, vagarosamente, por inversão. As amostras foram centrifugadas a 14840 x g / 15 minutos / 4°C, descartando-se o sobrenadante

e adicionando 1000µL de etanol 70% (gelado) seguido de nova centrifugação a 14840 x g 5 minutos /4°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram secadas por inversão sobre papel absorvente por aproximadamente 2 horas e o DNA foi ressuspendido em 100µL de TE [Tris - HCl (1M) pH 8,0 e EDTA (0,1 M) pH 8,0] 10:1, sendo então levado ao agitador a 265 x g /12 horas.

4.5. Eletroforese em gel de agarose

Visando analisar a qualidade e a quantidade do DNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando cerca de 3 µL de solução (DNA extraído, produto de PCR, ou produto de digestão), mais 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl 0,1mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%), em gel de agarose (1%) preparado com tampão TBE 1X (10 mM Tris HCl pH = 7,6, 1mM EDTA pH 8,0, e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) com brometo de etídeo (0,05 µg/mL), fotodocumentado em aparelho GEL-DOC, com transluminador ultravioleta, e analisados pelo software *Image Analysis* da Kodak ®.

4.6. Amplificação do DNA por PCR do gene *DGAT1* e do gene *LEPTINA*

A reação de PCR para o gene *DGAT1* (Genbank Ac: AJ318490) foi realizada em 124 novilhas, e para o gene *LEPTINA* (Genbank Ac: Y11369), a amostra utilizada foi de 125 animais.

As condições de amplificação dos fragmentos de interesse, de ambos os genes estão descritas na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Biometra ®, e a padronização da temperatura ideal de amplificação foi realizada em termociclador Gradiente Apollo ®.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e visualizados como descrito no item 5.5.

Tabela 1. Condições de amplificação dos fragmentos dos genes *DGAT1* e *LEPTINA*.

GENE	DGAT1	LEPTINA
Referência	KAUPE et al., 2004	LIEN et al., 1997
Iniciadores	F: 5' gcaccatcctcttctcaag 3' R: 5' ggaagcgctttcgatg 3'	F: 5' gtctggaggcaaagggcagggt 3' R: 5' ccaccacctctgtggagtag 3'
Região amplificada	Éxon VIII, que contém substituição AA → CG (polimorfismo K232A)	Parte do intron II até parte do éxon III, que contém substituição G → A
Fragmento gerado	412 pb	522 pb
Programa de amplificação	95° C – 5' 95° C – 45'' 57° C – 45'' 72° C – 45'' 72° C – 10' } 35 vezes	94° C – 5' 94° C – 40'' 66° C – 45'' 72° C – 1' 72° C – 5' } 35 vezes
Reação de amplificação	Volume final 25 µL; 100 ng DNA; 1,5 pmol cada primer; tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl [pH 9,0], 1,5 mM MgCl ₂ e 50 mM KCl); 100 µM dNTP; 0,5 U Taq DNA polimerase	Volume final 25 µL; 100 ng DNA; 1,5 pmol cada primer; tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl [pH 9,0], 1,5 mM MgCl ₂ e 50 mM KCl); 100 µM dNTP; 0,5 U Taq DNA polimerase

4.7. Padronização do ensaio RFLP para o gene *DGAT1* e para o gene *LEPTINA*

Após a amplificação dos fragmentos dos genes *DGAT1* e *LEPTINA*, os mesmos foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição EaeI e BsaAI, respectivamente, seguindo as condições descritas na Tabela 2.

Os fragmentos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, de acordo com a metodologia descrita no item 5.5..

Tabela 2. Condições de digestão dos fragmentos dos genes *DGAT1* e *LEPTINA*.

GENE	DGAT1	LEPTINA
Referência	KAUPE et al., 2004	LIEN et al., 1997
Enzima de restrição	EaeI	Bsa AI
Reação de digestão	5uL produto amplificado; 2,5 U enzima; Tampão enzima [1X]; Solução final 15 uL.	5uL produto amplificado; 2,5 U enzima; Tampão enzima [1X]; Solução final 15 uL.
Programa de digestão	37° C / 16 horas, seguido de inativação por 65° C / 20'.	37° C / 16 horas, seguido de inativação por 80° C / 20'.
Sítio de restrição	5' - ... C/GGCCA ... - 3' 3' - ... GCCGG/T ... - 5'	5' - ...CAC/GTG... - 3' 3' - ...GAG/CTC... - 5'
Substituição	GC (lisina) por AA (alanina)	G por A (não há troca de aminoácidos)
Genótipos possíveis	KK (+/+)	AA (+/+)
	AK (+/-)	AG (+/-)
	AA (-/-)	GG (-/-)
Tamanho do fragmento em pb	412	522
	210	441
	202	81

Para melhor compreensão, na Figura 2 está a representação esquemática do sítio de corte da enzima de restrição *EaeI*, dentro do fragmento do gene *DGAT1*, como descrito por KAUPE et al. (2004).

A. CACCATCCTCTTCCTCAAGCTGTTCTCCTACCGGGACGTCAACCTCTGGTGCCGAGAGCGCAGGGCT GGGGCCAAGGCCAAGGCTGGTGAGGGCTGCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACTTGCCTCG GGACCGGCAGGGGCTCGGCTCACCCCGACCCGCCCTGCCGCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTA AGGGGCGGCCAACGGGGGAGCTGCCAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACAACCTGACCTACCGCGGT GAGGATCCTGCCGGGGGCTGGGGGGACTGCCCGCGGCCTGGCCTGCTAGCCCCGCCCTCCCTTC CAGATCTCTACTACTTCTCTTCGCCCCCACCCTGTGCTACGAGCTCAACTTCCCCCGCTCCCCCGC ATCCGAAAGCGCTTCC B. <i>EaeI</i>: 5' - ... G/CGCC A ... - 3' 3' - ... C GCCGG/T ... - 5' C. AAGCCA – LISINA (alelo K – 412pb) C/GGCCA – ALANINA (alelo A – 202 e 210 pb) → alelo mutante
--

FIGURA 2. Representação esquemática do fragmento do gene *DGAT1* que contém o polimorfismo K232A. **A.** As seqüências em negrito nas extremidades do fragmento representam os iniciadores utilizados para

a amplificação; **B.** sítio de corte da endonuclease *EaeI*; **C.** alelos formados pela restrição com a enzima *EaeI*.

Na Figura 3 está a representação esquemática do sítio de corte da enzima de restrição BsaAI dentro do fragmento do gene *LEPTINA*, como descrito por LIEN *et al.* (1997).

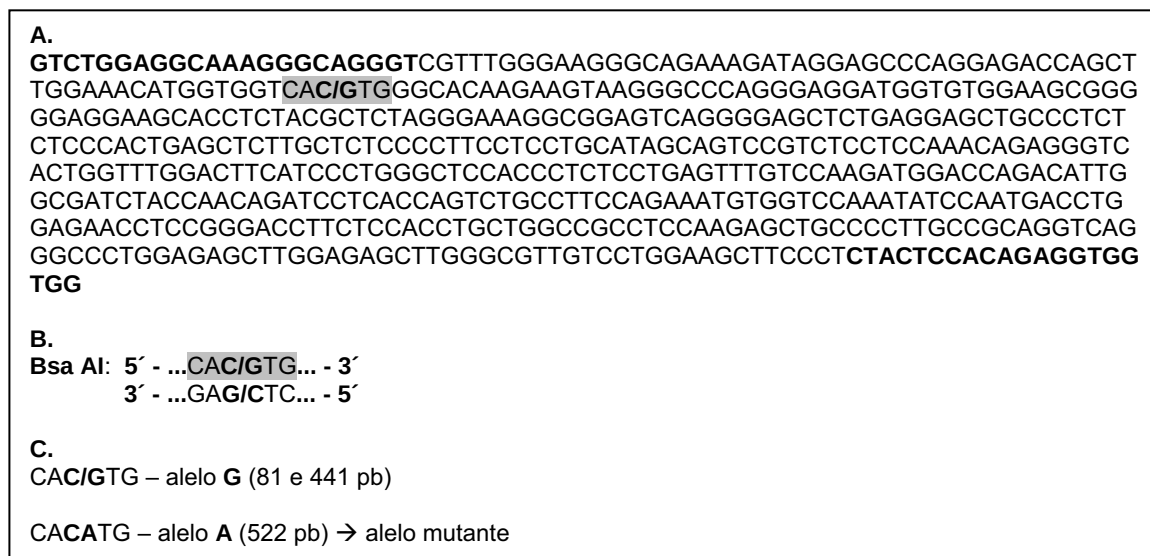


FIGURA 3. Representação esquemática do fragmento do gene *LEPTINA* que contém a substituição C → A. **A.** As seqüências em negrito nas extremidades do fragmento representam os iniciadores utilizados para a amplificação; **B.** sítio de corte da endonuclease Bsa AI; **C.** alelos formados pela restrição com a enzima Bsa AI.

4.8. Determinação das freqüências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade, e teste do χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os marcadores moleculares RFLP são codominantes, portanto as freqüências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem simples dos alelos a partir dos resultados observados no gel de eletroforese. A análise de RFLP resulta em somente dois alelos, alelo “a” e alelo “b”, com freqüência gênica p e q, respectivamente. As freqüências alélicas, genotípicas, erro padrão,

heterozigosidade, e teste do χ^2 para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimadas conforme o procedimento descrito por WEIR (1990), cujas equações são descritas a seguir:

a) Freqüência alélicas (f):

$$p(A) = \frac{2N_{AA} + N_{AB}}{2N} \quad q(B) = \frac{2N_{BB} + N_{AB}}{2N}$$

b) Erro Padrão da Freqüência Alélica (EP):

$$EP_p = EP_q = \sqrt{\frac{p_i(1-p_i)}{2N}}$$

c) Freqüência Genotípica (F):

$$F(AA) = \frac{N_{AA}}{N}$$

$$F(AB) = \frac{N_{AB}}{N}$$

$$F(BB) = \frac{N_{BB}}{N}$$

d) Heterozigosidade (H):

$$H = 1 - \sum F_{Oii}$$

e) Heterozigosidade esperada (H_e):

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

f) Teste χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(n_{oij} - n_{eij})^2}{n_{oij}} \right]$$

Sendo que:

N_{AA} = Número de animais de genótipo AA

N_{BB} = Número de animais de genótipo BB

N_{AB} = Número de animais de genótipo AB

N = Número total de animais da amostra

$p_{(A)}$ = Freqüência do alelo A

$q_{(B)}$ = Freqüência do alelo B

p_i = Freqüência do alelo i

F_{oij} = Freqüência observada do homozigoto ii

n_{oi} = número observado de animais da classe genotípica ij

n_{ei} = número esperado de animais da classe genotípica ij

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada gene foi avaliado por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 0,05. A diferenciação gênica e genotípica para cada gene entre os rebanhos estudados também foi avaliada por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 0,05, utilizando o *software* GENEPOP (ROUSSET, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração de DNA

O protocolo utilizado para extração do DNA mostrou-se rápido, eficaz e de fácil aplicação. O DNA extraído visualizado por eletroforese em gel de agarose (1%) mostrou-se íntegro, sem quaisquer sinais de contaminação e em boa quantidade, como pode ser observado na Figura 4. Desta maneira, não foi necessário tratamento do material extraído, nem mesmo diluição das amostras.

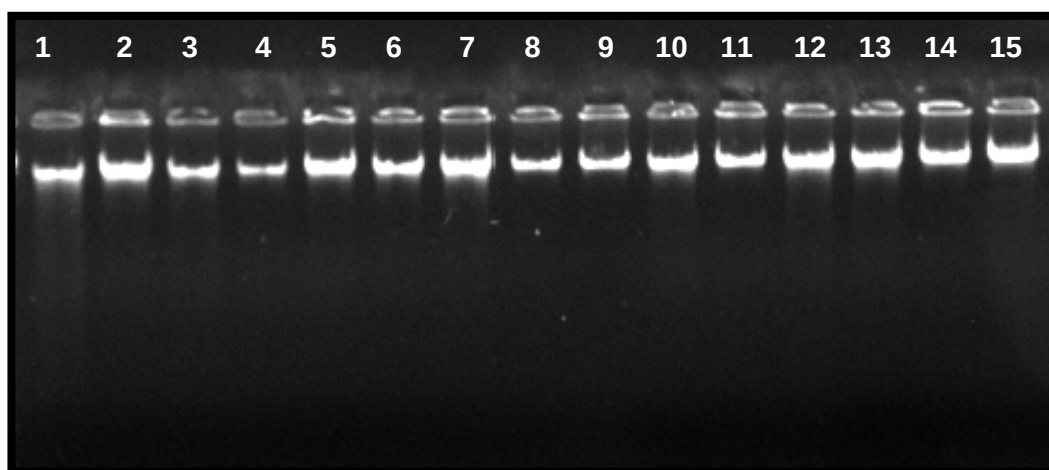


FIGURA 4. Eletroforograma contendo amostras de DNA genômico extraído.

5.2. Amplificação por PCR, análise RFLP e frequências alélicas para o gene *DGAT1*.

A reação de PCR do gene *DGAT1* foi realizada em 124 bovinos, sendo que o rebanho NeS foi constituído por uma amostra de 41 animais, o rebanho NeT por 41 animais, e o rebanho NeC por 40 animais. Os produtos de PCR foram submetidos aos procedimentos detalhados no item 5.5, e os fragmentos apresentaram o comprimento de 412 pares de base (pb) como descrito por KAUPE *et al.* (2004) (Figura 5).

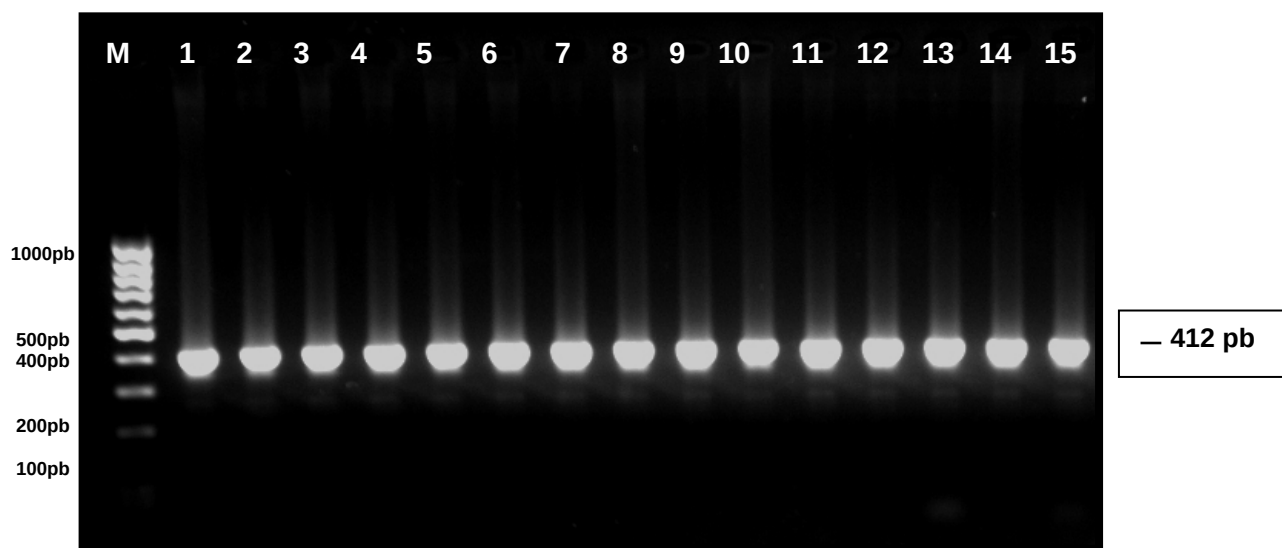


FIGURA 5. Eletroforograma contendo produtos amplificados do gene *DGAT1* em 15 animais, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: marcador de DNA 100bp.

O conteúdo total das soluções (15 μ L) da análise de PCR-RFLP foi submetido á eletroforese (procedimentos detalhados no item 4.5), e resultou em dois padrões de digestão, como apresentado na Figura 6.

O primeiro padrão, caracterizado pelo fragmento de 412 pb não digerido, corresponde ao homozigoto lisina - lisina (K/K). O segundo padrão corresponde ao heterozigoto A/K e apresentou uma banda formada pelo fragmento não-digerido de 412 pb do alelo K, e uma banda do alelo alanina (A), formada pelos fragmentos sobrepostos de 202 e 210 pares de base gerados pela digestão do sítio GC do fragmento, pela enzima *EaeI* (Figura 6).

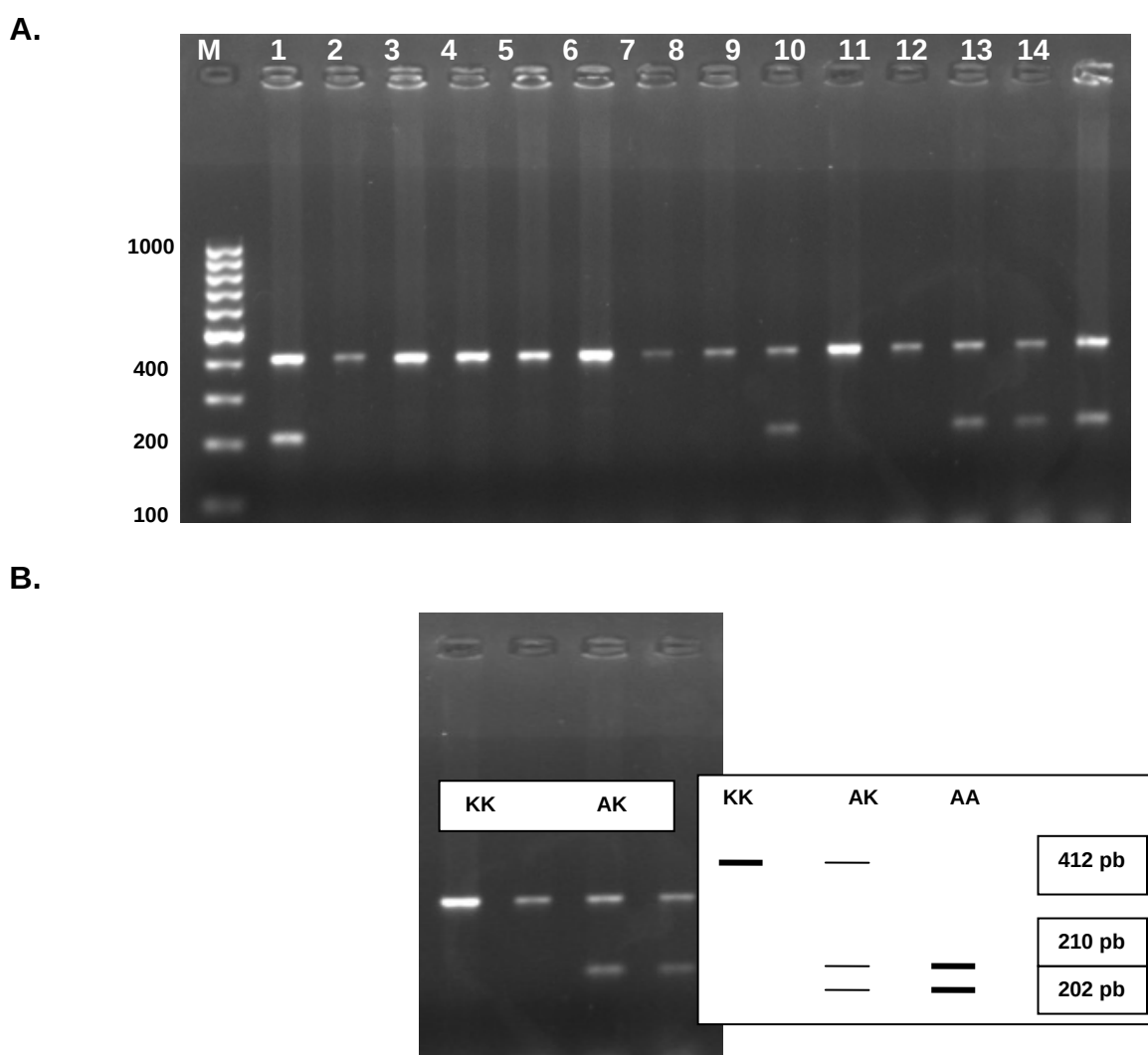


FIGURA 6. A. Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela endonuclease de restrição *EaeI* para o gene *DGAT1*, com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100pb. **B.** Detalhe dos padrões de migração dos dois genótipos encontrados na população.

Os alelos K e A apresentaram frequências de 0,95 e 0,05, respectivamente (Figura 7), e serviram de base para o cálculo das frequências esperadas (F_e) e os números esperados (N_e) de animais para cada genótipo na amostra total, como mostrado na Tabela 3. O erro padrão (EP) das frequências alélicas foi de 0,01.

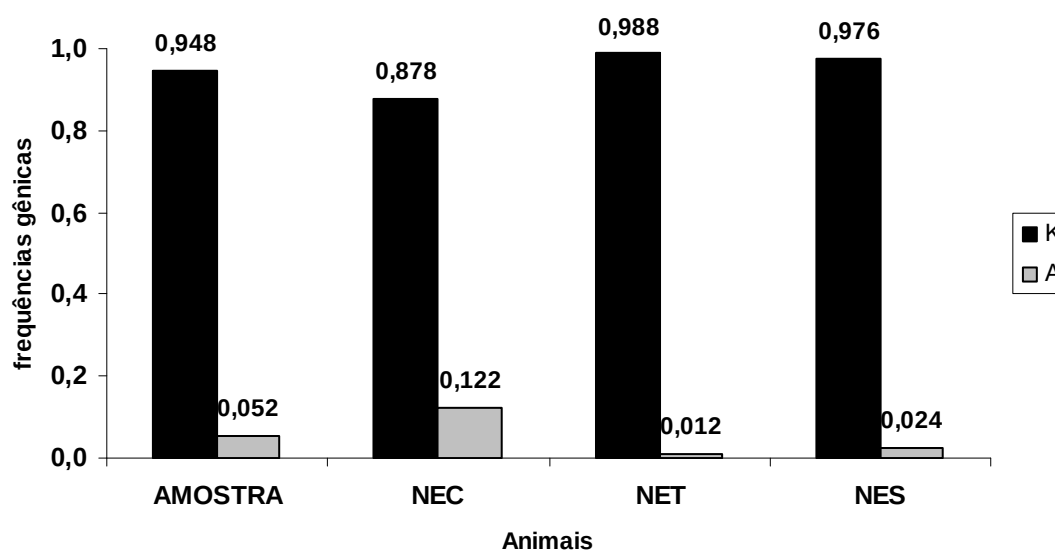


FIGURA 7. Distribuição de freqüências observadas dos alelos A e K do gene *DGAT1* nos rebanhos.

Maiores freqüências para o alelo K também já haviam sido descritas por PAPPAS *et al.* (2004) em Gir leiteiro e Nelore, KAUPE *et al.* (2004) em Nelore, EGITO *et al.* (2005) em Nelore e Guzerá, e LACORTE *et al.* (2006) em Nelore, Guzerá, Gir e Red Sindhi. Entretanto, esses autores, quando trabalhando com animais Nelore e Guzerá, observaram 100% de homozigose para a variante lisina, sugerindo que houve fixação deste alelo nestas raças. A ocorrência do alelo A em populações zebuínas, mesmo em baixas freqüências, é rara. PAPPAS *et al.* (2004), analisando animais da raça Gir, sugeriram que a presença da variante alanina (A) nesses animais pode ser devido a uma introgressão de genes *Bos taurus* durante o processo de seleção e melhoramento desta raça. CASAS *et al.* (2005), com animais da raça Brahman, relataram freqüência de 0,01 para este alelo. O contrário do que acontece em *Bos taurus* onde o alelo A é o mais freqüente (PAPPAS *et al.*, 2004; KAUPE *et al.*, 2004; EGITO *et al.*, 2005; LACORTE *et al.*, 2006).

Segundo WINTER *et al.* (2002), é possível que a variante Lisina (K) seja o alelo ancestral do *DGAT1*, devido à sua presença em *Bos grunniens*, e *Bubalus bubalus*. Esses autores sugerem que a conservação evolutiva do resíduo lisina na

posição 232 esteja ligada à importância deste alelo para a interação da enzima DGAT, como já foi sugerido para outras enzimas CoA-dependentes, e que a variante lisina represente o alelo mais eficiente com relação à síntese de gordura. Existem evidências que a substituição K232A tenha ocorrido após a divergência entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (WINTER *et al.*, 2002; KAUPÉ *et al.*, 2004).

A heterozigosidade observada (H) foi de 0,11, enquanto a heterozigosidade esperada (H_e), em uma população em equilíbrio de Hardy Weinberg, calculada a partir das frequências alélicas, foi 0,10 (Tabela 3).

Tabela 3. Número de animais (N_o) e frequências genotípicas (F_o) observadas, e número de animais (N_e) e frequências genotípicas esperadas (F_e) dos genótipos do gene **DGAT1** na população.

Genótipos	N_o	F_o	N_e	F_e
K/K	111	0,90	111,34	0,90
A/K	13	0,11	12,32	0,10
A/A	0	0,00	0,34	0,00

A hipótese de que a população está sob acasalamento ao acaso e não está sofrendo os efeitos de mutação, migração e seleção para este loco foi avaliada por um teste de qui-quadrado, com um nível de significância de 1%. O valor do χ^2 observado foi 0,037. Este resultado indica que as frequências observadas não diferem significativamente das esperadas, e que o loco *DGAT1* analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra estudada.

As frequências alélicas de K foram superiores às do alelo A nos três rebanhos estudados, como pode ser observado na Figura 7, apresentando frequências de 0,88 no rebanho NeC, de 0,99 no rebanho NeT, e de 0,98 no rebanho NeS. A frequência do alelo A no rebanho controle NeC (0,12) foi superior, e estatisticamente diferente ($p < 0,05$), (0,12), quando comparada aos outros rebanhos (NeT = 0,01, e NeS, 0,02), que não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). O erro padrão das frequências alélicas foi de 0,03 para o grupo NeC, e 0,01 para os grupos NeT e NeS.

Os números observados e esperados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequências genotípicas observadas e esperadas dos genótipos em cada rebanho podem ser visualizados na Tabela 4. Como observado para a amostra total, o loco *DGAT1* analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três rebanhos estudados, quando analisados separadamente.

Tabela 4. Número de animais observado (N_o), esperado (N_e), e frequências genotípicas observadas (F_o), e esperadas (F_e) do gene *DGAT1* para cada rebanho estudado.

Genótipos	Rebanho											
	NeC				NeT				NeS			
	N_o	F_o	N_e	F_e	N_o	F_o	N_e	F_e	N_o	F_o	N_e	F_e
K/K	31	0,756	31,61	0,771	39,000	0,951	39,024	0,952	41,000	0,976	41,006	0,976
A/K	10	0,244	8,78	0,214	2,000	0,049	1,951	0,048	1,000	0,024	0,988	0,024
A/A	0	0,000	0,61	0,015	0,000	0,000	0,024	0,001	0,000	0,000	0,006	0,000
χ^2	0,161				0,0001				0,0012			
Total	41				41				42			

A heterozigosidade foi superior no rebanho NeC, quando comparada aos outros rebanhos. As frequências genotípicas diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) somente entre os rebanhos selecionados NeS e NeT e o rebanho controle, o que pode sugerir algum efeito da seleção para peso ao sobreano agindo nesse loco. Entretanto, como esses rebanhos foram originados de um só rebanho em 1978, com poucos reprodutores cada um, principalmente o NeC que é o menor deles, essa diferença pode ser devido ao efeito de fundador.

5.3. Amplificação por PCR, análise RFLP e cálculo das frequências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade, e teste do χ^2 para o gene *LEPTINA*.

A reação de PCR do gene *LEPTINA* foi realizada em 125 bovinos, sendo que o rebanho NeS foi constituído por uma amostra de 41 animais, o rebanho NeT

e o rebanho NeC por 42 animais. Os produtos de PCR foram submetidos aos procedimentos detalhados no item 4.5.

Os segmentos de DNA amplificados pelos iniciadores exibiram o comprimento de 522 pb, como descrito por LIEN *et al.* (1997), e uma banda inespecífica, de aproximadamente 350 pb de comprimento, que não interferiu na análise pela técnica de RFLP (Figura 8).

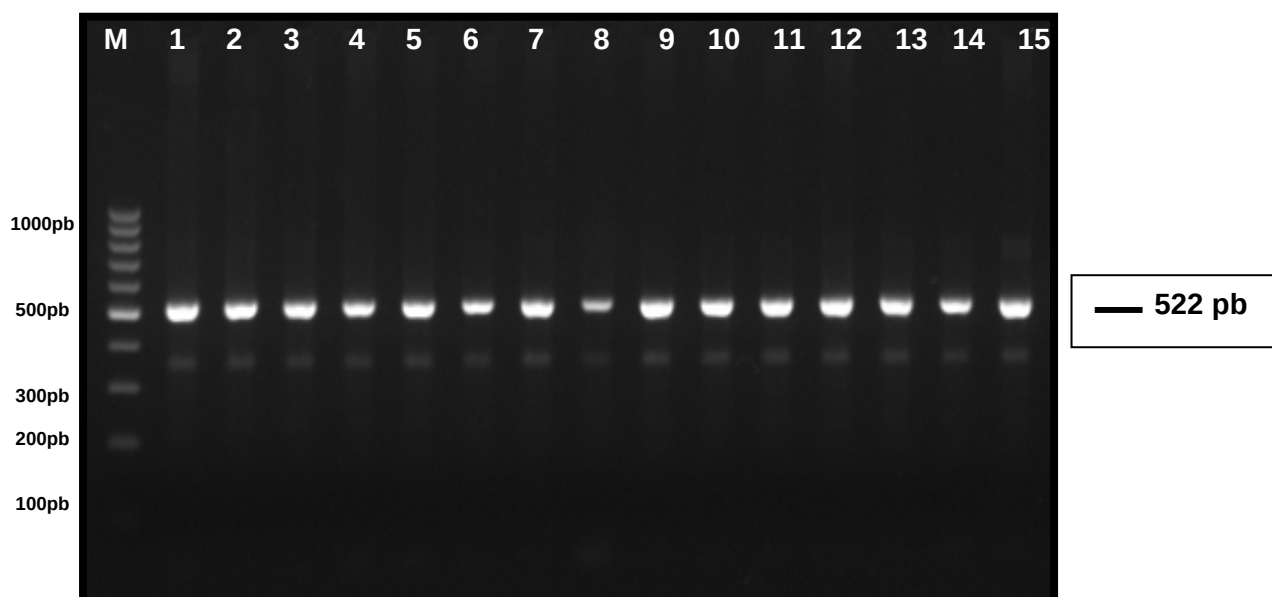


FIGURA 8. Eletroforograma contendo os produtos de PCR que correspondem à região entre o intron 2 e exon 3 do gene *LEPTINA* em 15 animais, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100 pb.

Foram observados 3 (três) padrões de digestão. O primeiro, contendo o fragmento de 522 pb não digerido, correspondendo ao homozigoto A/A. O segundo, contendo o fragmento não digerido de 522pb e dois outros fragmentos, produtos da digestão com a enzima *Bsa* AI (441 e 81 pb), correspondendo ao heterozigoto A/G. O terceiro padrão exibiu dois fragmentos com comprimentos de 441 e 81 pb, correspondendo ao homozigoto G/G (Figura 9).

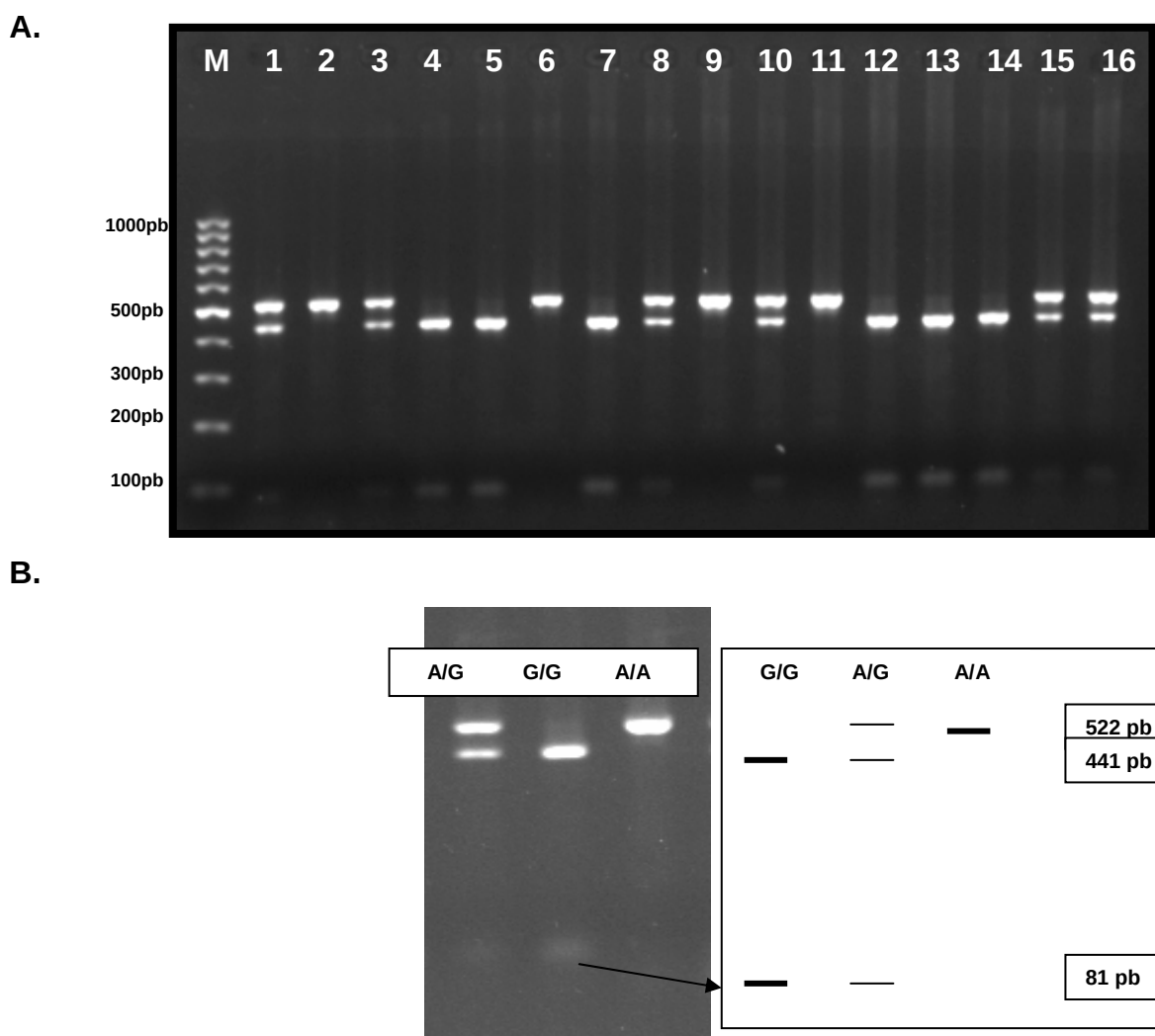


FIGURA 9. A. Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela *Bsa* AI para o gene *LEPTINA*, com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1,0%. M: Marcador de DNA 100 pb. **B.** Detalhe dos padrões de migração dos três genótipos encontrados na população.

Na amostra total, os alelos A e G apresentaram freqüências de 0,47 e 0,53, respectivamente, com erro padrão de 0,03 (Figura 10). As freqüências genotípicas esperadas e os números esperados de animais para cada genótipo, foram baseados nas freqüências alélicas. A heterozigosidade observada foi 0,45,

próxima da máxima esperada em uma população em equilíbrio. O segundo genótipo mais freqüente foi o G/G (Tabela 5).

Freqüências alélicas e genóticas inferiores às do presente trabalho foram descritas para o alelo A (0,25 a 0,28) e genótipo AA (0,03 a 0,07) em populações de *Bos indicus* (CHOUDHARY *et al.*, 2006). Esses autores descreveram pela primeira vez a presença do polimorfismo *LEP*-BsaAI em raças puras de *Bos indicus*, e sugeriram que pode ter havido uma força de seleção agindo contra o alelo A, ou favorecendo o alelo G nestas populações, o que parece não estar ocorrendo na presente amostra.

O valor do teste χ^2 para a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 1,62, bem abaixo do valor crítico com 1 grau de liberdade e $p \leq 0,05$ (3,84). Este resultado demonstra que as freqüências observadas não diferem significativamente das freqüências esperadas, e que o loco *LEP* analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta amostra.

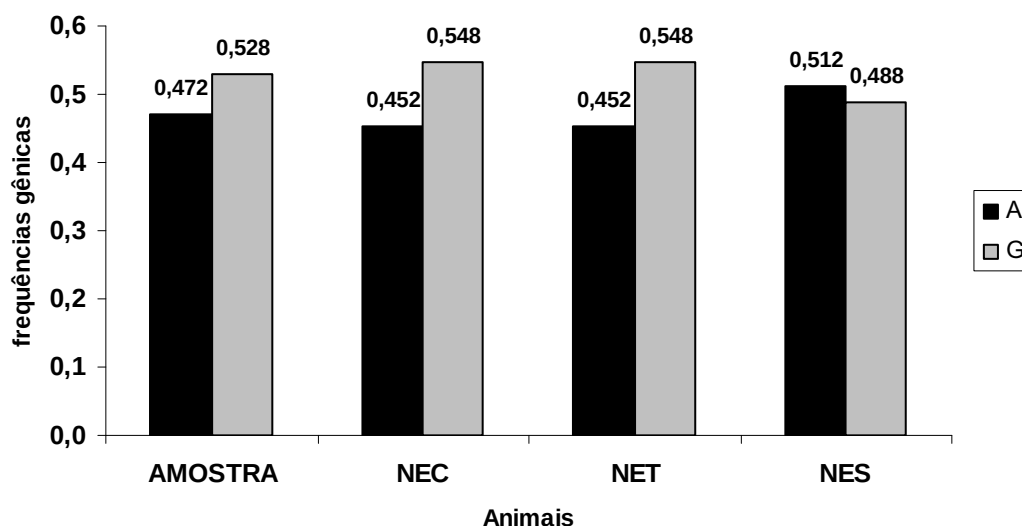


Figura 10. Distribuição de freqüências observadas dos alelos A e G do gene *LEPTINA* entre os rebanhos.

Tabela 5. Número observado (N_o) e esperados (N_e), freqüências genotípicas observadas (F_o) e esperadas (F_e) para o gene *LEPTINA* na população.

Genótipos	N_o	F_o	N_e	F_e
A/A	31	0,248	27,848	0,223
A/G	56	0,448	62,304	0,498
G/G	38	0,304	34,848	0,279
Total	125		125,000	

A freqüência do alelo G foi superior nos rebanhos selecionados NeC e NeT, com freqüência de 0,55. No rebanho NeS, o alelo mais freqüente foi o A com 0,51 (Figura 10). O erro padrão das freqüências alélicas foi de 0,05 para os grupos NeS e NeT, e de 0,07 para o grupo NeC. Não foram observadas diferenças significativas das freqüências alélicas entre os rebanhos.

A heterozigosidade observada foi superior no rebanho NeS (0,54) comparada aos outros dois rebanhos NeT (0,43) e NeC (0,38) (Tabela 7). Embora a freqüência genotípica do A/A tenha sido semelhante nos três rebanhos, a freqüência do genótipo G/G foi maior no NeS. Isto é reflexo das diferenças nas freqüências alélicas do NeS comparadas às dos NeT e NeC. O NeS, ao contrário dos outros dois rebanhos, apresentou uma freqüência maior do alelo G. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas das genotípicas entre os rebanhos.

Tabela 6. Número observado (N_o), esperado (N_e), e freqüências genotípicas observadas (F_o), e esperadas (F_e) do gene *LEPTINA* entre os 3 grupos estudados.

Genótipos	Grupos de seleção											
	NeC				NeT				NeS			
	No	Fo	Ne	Fe	No	Fo	Ne	Fé	No	Fo	Ne	Fé
A/A	11	0,262	8,60	0,205	10	0,238	8,60	0,205	10	0,244	10,76	0,262
A/G	16	0,381	20,81	0,495	18	0,429	20,81	0,495	22	0,537	20,49	0,500
G/G	15	0,357	12,60	0,300	14	0,333	12,60	0,300	9	0,220	9,76	0,238
χ^2			2,357				0,777				0,001	
Total			42				42				41	

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de polimorfismos em genes responsáveis pela produção de uma determinada proteína, seja ela estrutural ou de efeito enzimático, pode ocasionar alterações na seqüência de nucleotídeos. E, se esta mutação alterar de tal forma a seqüência de aminoácidos, modificará também a cadeia polipeptídica.

A mutação *DGAT1*-K232A resulta em uma troca de aminoácidos, como já mencionado anteriormente, devido a uma substituição di-nucleotídica (AA → GC). Alguns autores acreditam que o alelo K seja a versão mais eficiente da enzima (GRISART *et al.*, 2002), e que talvez por isso seja a variante ancestral do gene. Estes achados sugerem que a substituição tenha ocorrido após a separação entre taurinos e índicos (WINTER *et al.*, 2002; KAUPE *et al.*, 2004).

Já o polimorfismo *LEPT*-BsaAI não ocasiona alteração de aminoácidos, porém pode estar relacionada ao processo evolutivo dos bovinos (CHOUDHARY *et al.*, 2006), e pode vir a ser um marcador útil para detectar variações genéticas em rebanhos comerciais.

7. CONCLUSÕES

Detectaram-se a presença de polimorfismos para ambos os genes nos três rebanhos estudados.

Não foi detectado o genótipo *DGAT1*^{AA} (alanina) na população estudada, porém não houve fixação do alelo *DGAT1*^K.

Para o gene *LEPTINA*, os alelos A e G apresentaram frequências muito próximas, e o genótipo prevalente na população foi o heterozigoto *LEP*^{AG}.

8. REFERÊNCIAS

- BARENDSE, W. J. 1999. Assessing lipid metabolism. International patent application number PCT/AU98/00882. International publication No. WO 99/23248.
- 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**. 2002. v. 34, p. 105-116.
- CASAS, E., S. D. SHACKELFORD, J. W. KEELE, R. T. STONE, S. M. KAPPES, AND M. KOOHMARAIE. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of myostatin. **Journal of Animal Science**. 2000. v. 78, p. 560–569.
- CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH T. P. L.; STONE, T. R. Detection of QTL for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**. 2003. v. 81, p.2976-2983.
- CASAS, E.; WHITE, S.N.; RILEY, D.G.; SMITH, T.P.L.; BRENNEMAN, R.A.; OLSON, T.A.; JOHNSON, D.D.; COLEMAN, S.W.; BENNETT, G.L.; CHASE Jr., C.C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**. 2005. v. 83, p.13-19.
- CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W.; MYERS, H.M.; LEAR, S.R.; SANDE, E.; NOVAK, S.; COLLINS, C.; WELCH, C.B.; LUSIS, A.J.; ERICKSON, S.K.; FARESE JR., R.V. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy Science USA**. 1998. p. 13018-13023.
- CEDDIA, R. P.; WILLIAN Jr., W. N.; LIMA, F. B. et al. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. 1998. v. 31, p.715-722.
- CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; RONGHUA, L. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. **Natural Genetics**. 1996. v. 12, p. 318-20.

- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAL, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**. 2001. v. 21, p. 271-295.
- CHOUDHARY, V.; PUSHPENDRA, K.; BHATTACHARYA, T. K.; BHUSHAN, B.; SHARMA, A. DNA polymorphism of the leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Genetics and Molecular Biology**. 2005. v. 28, n. 4, p. 740-742.
- COSTA, R. B. Polimorfismos no gene da *Leptina* em novilhas Nelore. Jaboticabal. 39 f. Dissertação. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 2005.
- GRISART, B.; COOPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, L.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; MNI, M.; REID, S.; SIMON, P.; SPELMAN, R.; GEORGES, M.; SNELL, R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**. 2002. v. 12, p. 222-231.
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRE`REÂ, J. Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy Science USA**. 2004. v. 101, p. 2398-2403.
- HAEGEMAN, A.; VAN ZEGEREN, A.; PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**. 2000. v. 31, p. 70.
- JEREMIAH, L. E. The influence of subcutaneous fat thickness and marbling on beef palatability and consumer acceptability. **Food Research**. 1996. v. 29, p.513-520.
- JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R. et al. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**. 1998. v. 9, p. 1-14.
- KAUPE, B.; WINTER, A.; FRIES, R.; ERHARDT, G. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. **Journal of Dairy Research**. 2004. v. 71, p. 182–187.

- 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**. 1999. v. 10, p.1142-1145.
- LACORTE, G.A.; MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L.; CAMPOS, A. L.; MACIEL, R. P.; VERNEQUE, R. S.; TEODORO, R. L.; PEIXOTO, M. G. C. D.; CARVALHO, M. R. S.; FONSECA, C. G. *DGAT1 K232A* polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genetics and Molecular Research**. 2006. v. 5, n. 3, p. 475-482.
- LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F. et al. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**. 2003. v. 34, p. 371-374.
- LEHNER, R.; KUKSIS, A. Biosynthesis of triacylglycerols. **Prog. Lipid Research**. 1996. v. 35, p. 169-201.
- LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W.M.; BENKEL, B.B.; KNEELAND, J.; MIRETTI, M.M. **Variabilidade Genética no locus Bola-DRB3.2 de bovinos nativos e exóticos**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D.I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**. 1997. v. 28, p. 245.
- OELKERS, P.; BEHARI, A.; CROMLEY, D.; BILLHEIMER, J.T.; STURLEY, S.L. Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. **Journal of Biology and Chemistry**. 1998. v. 273, p. 26765-26771.
- 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**. 1997. v. 75, p. 1427.
- POTHOVEN, D. C. B.; ZIMMERLI, A. Fatty acid compositions of bovine adipose tissue and of in vitro lipogenesis. **Journal of Nutrition**. 1974. v. 104, p. 430-433.

- RAZOOK, A.G. Intensidades de seleção e mudanças genéticas em características de crescimento de rebanhos Nelore e Guzerá selecionados para peso pós-desmame. Relatório CNPq. 2006.
- RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Ganhos de produtividade com o uso de touros provados. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. **Requisitos de qualidade na bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2007. p. 93-114.
- REVERTER, A., D. J. JOHNSTON, H.-U. GRASER, M. L. WOLCOTT, AND W. H. UPTON. Genetic analyses of live-animal ultrasound and abattoir carcass traits in Australian Angus and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**. 2000. v. 78, p.1786-1795.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Notes (in press), 2007.
- SALMAN, A.K.D. **Polimorfismo e expressão gênica da Leptina em bovinos superprecoces**. Botucatu, 49p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.
- SPELMAN, R. J.; FORD, C. A.; McELHINNEY, P.; GREGORY, G. C.; SNELL, R. G. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**. 2002. v. 85, p. 3514–3517.
- TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life**. 2002. v. 53, p. 131-135.
- 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.
- THALLER, G.; KUHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G.; BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZUHLKE, H.; FRIES, R. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**. 2003. v. 34, p. 354-357.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. **Massachusetts: Sinauer Associates**. 1990. 377 p.

- WHEELER T. L., L. V. CUNDIFF, AND R. M. KOCH. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**. 1994. v. 72, p. 3145–3151.
- WILKINS, R.J.; DAVEY, H.W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**. 1997. v. 28, p. 376.
- WINTER A.; KRÄMER W.; WERNER F.A.O.; KOLLERS S.; KATA S.; DURSTEWITZ G.; BUITKAMP J.; WOMACK J.E.; THALLER G.; FRIES, R. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 2002. v. 99, p. 93005.
- WINTER, A.; ALZINGER, A.; FRIES, R. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine *DGAT1*. **Science Direct – Genomics**. 2004. v. 83, p. 172-180.
- ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoroly Applied Genetics**, v. 80, p. 631-634, 1990.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. 1994. v. 372, p. 425-432.