

POLIMORFISMOS (g.16024A>G e g.16039T>C) DO GENE *FASN* RELACIONADOS À COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE EM RAÇAS BOVINAS

FASN GENE POLYMORPHISMS (g.16024A>G AND g.16039T>C) RELATED TO MEAT LIPID COMPOSITION IN CATTLE BREEDS

Walker C.C.¹, Egito A.A.^{2*}, Feijó G.L.D.², Morais M.G.¹

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil. *andrea.egito@embrapa.br

Keywords: Bovine; Lipid composition; Fatty acid synthase; Locally adapted breed; SNP.

Palavras-chave: Bovinos; Composição lipídica; Ácido graxo sintase; Raças localmente adaptadas; SNP.

ABSTRACT

One of the steps in the genetic characterization of Brazilian locally adapted cattle breeds has been the evaluation of polymorphisms in candidate genes related to characteristics of economic interest to promote their potential and diversified use. This work aimed to verify the genetic variability of *FASN* gene polymorphisms related to the lipid composition of meat. The animals were genotyped for *FASN* gene polymorphisms g.16024A>G and g.16039T>C by PCR-RFLP. Haplotype TW that was associated with an increase in C18:1 ratio in meat, was more common in animals of the Wagyu breed than in other breeds evaluated. Among the locally adapted breeds, the Crioulo Lageana and Caracu had the highest frequency of haplotype TW. There was a high genetic variability of the evaluated polymorphisms in locally adapted breeds, showing its potential for use in breeding programs. Considering the variability observed in the frequency of *FASN* gene, are needed to evaluate the effect of these genes on the variation of lipid composition in the analyzed breeds.

RESUMO

Uma das etapas dentro da caracterização genética das raças bovinas localmente adaptadas do Brasil tem sido a avaliação de polimorfismos em genes candidatos relacionados a características de interesse econômico visando promover o seu uso potencial e diversificado. Neste trabalho objetivou-se verificar a variabilidade genética de polimorfismos do gene *FASN* relacionados com a composição lipídica da carne. Os animais foram genotipados para os polimorfismos g.16024A>G e g.16039T>C do gene *FASN* pela técnica de PCR-RFLP. O haplótipo TW, associado ao aumento da relação de C18:1 na carne, foi mais frequente nos animais da raça Wagyu do que nas outras raças avaliadas. Dentre as raças localmente adaptadas, a Crioula Lageana e a Caracu apresentaram as maiores frequências do haplótipo TW. A alta variabilidade genética dos polimorfismos avaliados nas raças localmente adaptadas evidencia seu potencial de uso em programas de melhoramento genético. Considerando a alta variabilidade observada nas frequências gênicas dos polimorfismos do gene *FASN*, estudos envolvendo a associação de dados fenotípicos e genéticos são necessários para avaliar o efeito destes genes na variação da composição lipídica nas raças analisadas.

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos presentes na carne bovina possuem influência direta em seu sabor e aroma, pois são responsáveis pela liberação de compostos voláteis durante o cozimento, assim como interferem na vida de prateleira deste produto. Além desses fatos, o perfil lipídico das carnes vermelhas ainda recebe grande atenção pela proporção de ácidos graxos saturados e sua relação negativa com a saúde humana. Este interesse resulta principalmente da necessidade de encontrar formas de se obter um produto mais saudável (Wood *et al.*, 2003), através do aumento do conteúdo de monoinsaturados e poliinsaturados. As ferramentas

moleculares podem ser valiosas para oferecer pistas de que tipos de redes genéticas estão envolvidas nos mecanismos de síntese e metabolismo de ácidos graxos na carne (Yeon et al., 2013). O gene *FASN*, que codifica a enzima ácido graxo sintase, é apontado como um dos responsáveis pela variação na composição de ácidos graxos em bovinos (Abe et al., 2009). Ácido graxo sintase é a denominação dada para um complexo de sete enzimas, codificadas por um único gene localizado no cromossomo 19, que catalisam a formação de ácido palmítico (C16:0) a partir da condensação sequencial de uma molécula acetil-coA e sete malonil-coA, na presença de NADPH (Smith, 1994; Roy et al., 2006). Abe et al. (2009) identificaram dois SNPs (polimorfismos de base única) no gene *FASN* (g.16024A>G e g.16039T>C) em bovinos Wagyu x Limousin, encontradas no éxon 34, que determinam as substituições de aminoácidos treonina (T) para alanina (A) e triptofano (W) para arginina (R). Estes polimorfismos podem ter resultado em uma mudança na ação da enzima, provocando o alongamento de C16:0 para ácido esteárico (C18:0), sendo posteriormente convertido em ácido oléico (C18:1) por dessaturases, de modo que ao genótipo TW foi atribuído o aumento de C18:1 e na proporção de monoinsaturados:saturados na gordura intramuscular. Considerando estas informações, o objetivo deste trabalho foi verificar as frequências gênicas dos polimorfismos g.16024A>G e g.16039T>C do gene *FASN* em bovinos de raças criadas no Brasil visando auxiliar o uso potencial e diversificado das raças localmente adaptadas contribuindo, desta forma, para sua conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal da Embrapa Gado de Corte. Foram genotipados 318 animais de diferentes raças criadas no Brasil, sendo três raças zebuínas: Nelore (40), Guzará (40) e Gir (20); quatro raças taurinas localmente adaptadas: Curraleiro (40), Crioulo Lageano (40), Caracu (40) e Pantaneiro (40); duas raças taurinas especializadas: Holandês (21) e Wagyu (16) e a F1 Nelore x Wagyu (21). A genotipagem dos polimorfismos do gene *FASN* foi realizada pela técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). A amplificação do gene *FASN* foi realizada com os *primers* descritos por Abe et al. (2009), dando origem a um fragmento de 336 pb. As reações de PCR foram feitas com um volume final de 20 µL, utilizando-se 10 ng de DNA genômico; tampão 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,4 µM de primer; 1,0 UI de Taq DNA polimerase. O protocolo da PCR foi de 94 °C/5', seguido por 30 ciclos de 94 °C/1'; temperatura de anelamento de 60 °C /1' e 72 °C/1', e com extensão final de 72 °C/7'. O fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *HhaI* para a detecção do polimorfismo g.16024A>G e, com a enzima *NciI* para o polimorfismo g.16039T>C. As digestões foram realizadas utilizando 7µL do produto amplificado e 5 UI da enzima de restrição apropriada, seguido de incubação por 4 horas para *HhaI* e *NciI*, à 37 °C. Os fragmentos de DNA digeridos foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose 2%, corados com SyberGold (1:10.000) exposto a luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado pela comparação com um marcador, padrão de peso molecular de 1kb. Visando assegurar o padrão de digestão observado, amostras representando os possíveis genótipos do gene *FASN*, previamente genotipadas por PCR-RFLP, foram sequenciadas em sequenciador automático ABI-3130® (Applied Biosystems) utilizando método descrito por Sanger (1988), sendo a sequência referência obtida no Genebank (nº de acesso AF285607). Segundo o observado por Abe et al. (2009), após a clivagem e a separação dos produtos digeridos por eletroforese observou-se, com a enzima *HhaI*, os alelos A (sem digestão do fragmento inicial de 336 pb) e G (fragmento de 262 pb e 74 pb) e, com a enzima *NciI*, os alelos T (sem digestão do fragmento inicial de 336 pb) e C (fragmento de 247 bp e 89 pb). A combinação dos alelos observados deu origem aos haplótipos TW e AR (Tabela I).

Tabela I. Haplótipos do gene *FASN*. (*Haplotype of the gene FASN.*)

Genótipos		Haplótipos
g.16024A>G (<i>HhaI</i>)	g.16039T>C (<i>NciI</i>)	
AA	TT	TW/TW
AG	TC	TW/AR
GG	CC	AR/AR

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta e foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), a 5% de probabilidade. Para este procedimento estatístico utilizou-se o PROC GLM do software SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado pelo teste exato de Fisher usando o programa GENEPOP (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abe *et al.* (2009), não encontraram evidências de recombinação entre as duas mutações dada sua proximidade, portanto, os alelos identificados pela digestão enzimática do fragmento dos dois polimorfismos foram representados pelo caractere que simboliza os possíveis aminoácidos codificados, ou seja TW e AR. O haplótipo TW é apontado como favorável, pois está associado à redução no conteúdo de mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) e aumento de C18:1 nos tecidos adiposos (Abe *et al.*, 2009; Matsushashi *et al.*, 2011), resultando desta forma, em aumento da proporção monoinsaturados:saturados. No presente trabalho também não foram observados eventos de recombinação dos alelos nas populações analisadas das raças taurinas e zebuínas. A genotipagem das amostras por sequenciamento comprovou o padrão de clivagem observado nos géis de agarose (Figura 1). As frequências alélicas observadas na raça Wagyu foram significativamente diferentes a todas as raças estudadas ($P < 0,01$) (Tabela II e III).

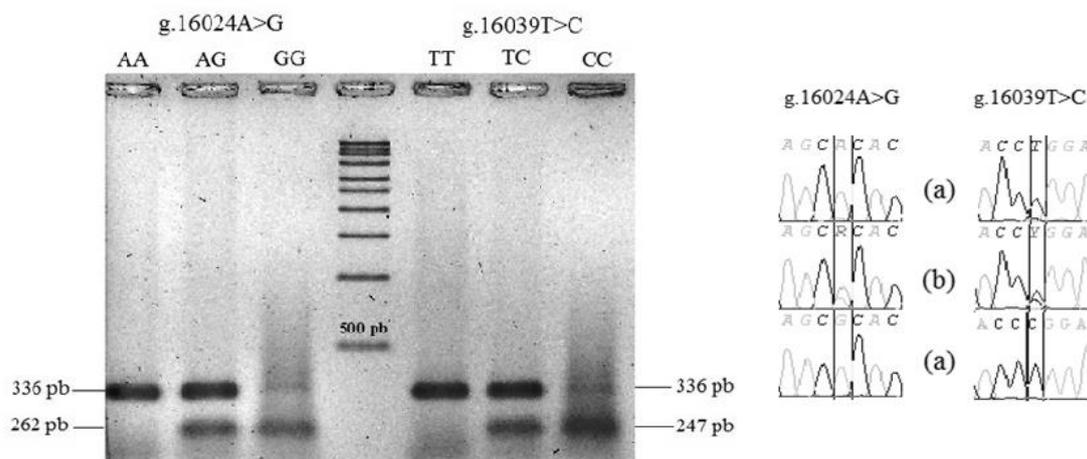


Figura 1. Genotipagem dos polimorfismos do gene *FASN* pela digestão enzimática do fragmento de DNA, separados em gel de agarose 2%. Eletroferogramas observados na genotipagem dos polimorfismos do gene *FASN* (a: homocigoto; b: heterocigoto).
(*Genotyping of polymorphisms in the FASN gene by enzymatic digestion of the DNA fragment, separated gel in 2% agarose. Electropherograms observed in genotyping of polymorphisms of the FASN gene (a: homozygous; b: heterozygous).*)

Tabela II. Frequências haplotípicas e alélicas dos polimorfismos g.16024A>G e g.16039T>C do gene *FASN* em raças criadas no Brasil (*Haplotype and allele frequencies of polymorphisms g.16024A>G and g.16039T>C FASN gene in breeds created in Brazil.*)

Raças (n)*	Frequências Haplotípicas			Frequências Alélicas	
	TW/TW	TW/AR	AR/AR	TW	AR
Nelore (39)	0	0,03	0,97	0,01	0,99
Gir (36)	0,03	0,05	0,92	0,06	0,94
Guzerá (40)	0,03	0,1	0,87	0,07	0,93
Caracu (40)	0,05	0,45	0,5	0,27	0,73
Curraleira (40)	0,02	0,13	0,85	0,09	0,91
C. Lageana (40)	0,05	0,55	0,4	0,32	0,68
Pantaneira (40)	0	0,12	0,88	0,06	0,94
Holandesa (39)	0,03	0,1	0,87	0,08	0,92
Wagyu (16)	0,5	0,4	0,1	0,72	0,28
½ Nel x ½ Wag (21)	0	0,38	0,62	0,19	0,81

*As populações estudadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela III. Comparação estatística realizada pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), das frequências genótípicas (diagonal superior) e frequências alélicas (diagonal inferior) dos polimorfismos g.16024A>G e g.16039T>C entre as raças estudadas. (Statistical comparison performed by Chi-square test (χ^2), the genotype frequencies (above diagonal) and allelic frequencies (below diagonal) of g.16024A>G e g.16039T>C between the studied breeds.)

	Nel	Gir	Guz	Car	Cur	Crl	Pan	Hol	Wag	NxW
Nel		0,4566	0,2333	<,0001	0,1050	<,0001	0,0956	0,2207	<,0001	0,0002
Gir	0,1452		0,7724	0,0003	0,5789	<,0001	0,3430	0,7548	<,0001	0,0066
Guz	0,0576	0,1154		0,0013	0,9391	<,0001	0,5738	0,9991	<,0001	0,0274
Car	<,0001	0,0003	0,0009		0,0035	0,6556	0,0012	0,0011	<,0001	0,4573
Cur	0,0323	0,4479	0,7723	0,0021		<,0001	0,6022	0,9520	<,0001	0,0575
Crl	<,0001	<,0001	<,0001	0,4902	0,0002		<,0001	<,0001	0,0002	0,1979
Pan	0,1024	0,8563	0,7547	0,0003	0,5483	<,0001		0,5732	<,0001	0,0204
Hol	0,0531	0,6002	0,9636	0,0011	0,8089	<,0001	0,7217		<,0001	0,0311
Wag	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0001	<,0001	<,0001		0,0001
NxW	0,0004	0,0236	0,0573	0,3030	0,0998	0,1154	0,0295	0,0646	<,0001	

(Nel = Nelore; Guz = Guzerá; Car = Caracu; Cur = Curraleira; Crl = Crioulo Lageana; Pan = Pantaneira; Hol = Holandesa; Wag = Wagyu; NxW = F1 Nelore x Wagyu)

A disparidade da frequência de TW de bovinos Wagyu em relação a outras raças foi também relatada anteriormente, e pode estar ligada ao histórico de seleção destes animais, que visava o aumento da marmorização da carne (Abe *et al.*, 2009). Zembayashi *et al.* (1995) demonstraram ainda, que bovinos Wagyu possuem uma proporção mais elevada de monoinsaturados nos depósitos adiposos, quando comparado a animais de outras raças como Holandesa, Japanese Brown e Charolês. Kanzala *et al.* (1999) observaram que os índices de estimativa da atividade de enzimas alongases, como a ácido graxo sintase, aumentam concomitantemente ao grau de marmorização em bovinos cruzados Wagyu. Além disso, à medida que aumenta a deposição da gordura de marmorização, há mudanças na composição lipídica nesta gordura devido diluição de fosfolípidios com o acréscimo dos triacilgliceróis, provocando a elevação de monoinsaturados e saturados em detrimento às proporções de poli-insaturados (Kanzala *et al.* 1999). A frequência de TW nas raças zebuínas foi pequena, sendo de 0,01 em Nelore, 0,06 em Gir e 0,07 em Guzerá. Assim como no presente trabalho, frequências baixas (0,017) do alelo favorável do polimorfismo g.16024A>G do gene *FASN* foram relatadas por Kaneda *et al.* (2011) em animais zebuínos nativos dos países Camboja, Mianmar e Laos. Em contrapartida, Souza *et al.* (2012) verificaram que existem outros polimorfismos (g.15603A>G e g.17860C>T) no gene *FASN* que apresentam uma frequência alélica maior na raça Nelore, que foram associados a características de crescimento e a espessura de gordura subcutânea. Observou-se que a frequência do haplótipo TW na F1 Nelore x Wagyu (0,19) decresceu em relação à raça Wagyu (0,72), o que pode ser explicado pelo histórico dos animais analisados, pois sua formação foi realizada pela utilização de touros Nelore em vacas Wagyu. Possivelmente, dada a relação macho:fêmea empregada nos sistemas de acasalamento e a utilização de machos de uma raça onde originalmente existe uma baixa frequência do alelo favorável, pode ter causado a redução deste haplótipo nos animais meio-sangue. Estes resultados evidenciam que a utilização de touros Wagyu em vacas Nelore teria sido mais vantajosa, uma vez que na raça Wagyu observa-se uma maior proporção do haplótipo favorável, aumentando a probabilidade de animais F1 com frequência de TW mais alta. Em bovinos Crioulo Lageano e Caracu a frequência do haplótipo favorável (0,32 e 0,27, respectivamente) foi expressivamente maior que demais raças taurinas localmente adaptadas, Pantaneira e Curraleira, as quais as frequências de 0,1. A frequência de TW na raça Caracu pode ser atribuída ao fato de que entre as raças localmente adaptadas a esta foi a que provavelmente sofreu uma menor introgressão de genes zebuínos, e, até o momento, foi a única que esteve vinculada a programas de melhoramento animal, sendo a criação dessa raça praticamente voltada para corte (Egito *et al.*, 2007). A baixa frequência de TW observada em bovinos Pantaneiros (0,06) pode estar relacionada aos dados históricos da raça onde, no passado, houve a introgressão de genes zebuínos pela introdução de animais oriundos de populações onde existiam animais anelados (Serrano *et al.*, 2004). Esta introgressão de genes

zebuínos na raça Pantaneira foi observada e monitorada por diferentes tipos de marcadores moleculares (Lara *et al.* 2002; Serrano *et al.*, 2004; Egito *et al.*, 2007). A existência dos haplótipos do gene *FASN* indicados como favoráveis nas raças localmente adaptadas, principalmente em Crioulo Lageano e Caracu, indicam seu potencial de utilização em programas de melhoramento animal que vissem a introgressão destes alelos em raças menos adaptadas ou que possuam uma menor proporção dos mesmos. Por outro lado, pode indicar também a possibilidade de uso destas populações em programas de melhoramento/conservação que visem inserir seus produtos em nichos de mercado diferenciados, onde o consumidor custea os benefícios que uma carne com propriedades nutricionais mais saudáveis oferece. Estudos de associação são necessários para avaliar a relação dos polimorfismos do gene *FASN*, com a variação da composição dos ácidos graxos monoinsaturados nas raças zebuínas e nas raças taurinas localmente adaptadas.

CONCLUSÕES

Existe uma alta variabilidade genética dos polimorfismos do gene *FASN* nas raças bovinas criadas no Brasil. A presença do haplótipo favorável TW do gene *FASN* é mais acentuada em bovinos da raça Wagyu em relação às outras populações estudadas. Entre as raças localmente adaptadas, a Crioula Lageana e a Caracu apresentaram as maiores porcentagens do haplótipo TW. Estudos envolvendo a associação deste marcador com dados fenotípicos, nas raças taurinas localmente adaptadas, são necessários para verificar se este haplótipo também está vinculado positivamente às variações no perfil lipídico da carne.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, à Embrapa Gado de Corte e à FUNDECT-MS pelo apoio financeiro e logístico e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo material biológico que compôs parte deste estudo.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Misumi, S., Nade, T., Nakajima, H., Shoji, N., Kobayashi, M. & Kobayashi, E. 2009. Novel mutations of the *FASN* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical Genetics*, v.47, p.397-411.
- Egito, A.A., Paiva, S.R., Albuquerque, M.S.M., Mariante, A. S., Almeida, L.D., Castro, S.R. & Grattapaglia, D. 2007. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics (Online)*, v.8, p.83.
- Kaneda, M., Lin, B.Z., Sasazaki, S., Oyama, K. & Mannen, H. 2011. Allele frequencies of gene polymorphisms related to economic traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle breeds. *Animal Science Journal*, v.82, p.717-721.
- Kazala, E.C., Lozeman, F.J., Mir, P.S., Laroche, A., Bailey D.R. & Weslake R.J. 1999. Relationship of fatty acid composition to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. *Journal of Animal Science*, v.77, p.1717-1725.
- Lara, M.A.C., Gama, L.L.T., Bufarah, G., Sereno, J.R.B., CELEGATO, É.M. & ABREU, U.P. 2002. Genetic polymorphisms at the k-caseína locus in Pantaneiro cattle. *Archivos de Zootecnia*, v.51, p.99-105.
- Matsushashi T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe T., Sakaguchi S. & Kobayashi, E. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, v.89, p.12-22.
- Regitano, L.C.A. & Coutinho, L.L. 2001. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.205.
- Roy, R., Ordovas, L., Zaragoza, P., Romero, A., Moreno, C., Altarriba, J. & Rodellar C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with milk-fat content. *Animal Genetics*, v.37, p.215-218.
- Sanger, F. 1988. Early nucleic acid chemistry. *Trends in Biochemical Sciences*, v.13, p.67-69.
- Serrano, G.M.S., Egito, A.A., McManus, C. & Mariante, A.S. 2004. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.29, p.543-549.
- Smith, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. 1994. *The FASEB Journal*, v.8, p.1248-1259.
- Souza, F.R.P., Chiquitelli, M.G., Fonseca, L.F.S., Cardoso, D.F., Fonseca P.D.S., Camargo, G.M.F., Gil, F.M.M., Boligon, A.A., Tonhati, H.; Mercadante, M.E.Z. & Albuquerque, L.G. 2012. Associations of *FASN* gene polymorphisms with economical traits in Nellore cattle (*Bos primigenius indicus*). *Molecular Biology Reports*, v.39, p.10097-10104.
- Wood, J.D. Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R. & Enser, M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, v.66, p. 21-32.

Yeon, S.H., Lee, S.H., Choi, B.H., Lee, H.J., Jang, G.W., Lee, K.T., Kim, K.H., Lee, J.H., Chung, H.Y. 2013. Genetic variation of *FASN* is associated with fatty acid composition of Hanwoo. *Meat Science*, v.94, p. 133-138.