

Estudo de associação de polimorfismos nos genes LEP e TG com características de qualidade de carne e carcaça em bovinos da raça Canchim

Isadora Inácio Sousa¹, Isabella Maiumi Zaidan Blecha², Sallene da Silva Maciel³, Anna Beatriz Robottom Ferreira⁴, Gelson Luís Dias Feijó⁵, Ricardo Favero⁶, Gustavo Garcia Santiago⁷, Fabiane Siqueira⁸

1 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

2 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

3 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

4 - Embrapa Gado e Corte

5 - Embrapa Gado de Corte

6 - Universidade Estadual de Londrina - UEL

7 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

8 - Embrapa Gado de Corte

RESUMO - Avaliou-se os marcadores moleculares do tipo SNP (Single-nucleotide Polymorphism) E2FB (AY138588.1:c.305C>T) e TG5 (X05380.1:g.-422C>T) nos genes da leptina e da tireoglobulina em animais da raça Canchim. As genotipagens foram realizadas por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) e as frequências alélicas e genotípicas foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. Os desvios de frequências observadas em relação às esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados a 5% de significância e os dados foram submetidos à ANOVA por meio do PROC GLM (SAS). No marcador LEP/Kpn2I observou-se associação sugestiva ($P=0,0555$) para área de olho de lombo e marmoreio ($P=0,068$), porém não foi verificado efeito significativo para o marcador TG/MboI nas variáveis estudadas. Estudos com número maior de animais para estes marcadores podem aumentar o potencial dos mesmos para serem incluídos em painéis de SNP customizados visando o melhoramento da raça Canchim.

Palavras-chave: bovino de corte, marcador molecular, melhoramento genético, seleção assistida por marcadores

Association study of polymorphisms on the LEP and TG genes with beef and carcass quality characteristics in Canchim cattle

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the SNP type (Single-nucleotide Polymorphism) molecular markers E2FB (AY138588.1: c.305C>T) and TG5 (X05380.1: g.-422C> T) in the leptin and thyroglobulin genes in Canchim breed animals. Genotyping was performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) and the allelic and genotype frequencies were compared by chi-square test. The observed frequency deviations from those expected for the Hardy-Weinberg Equilibrium were analyzed at 5% significance and obtained data were submitted to ANOVA by PROC GLM (SAS). In the LEP / Kpn2I marker, a suggestive association ($P = 0.0555$) was observed for the ribeye area and marbling ($P = 0.068$), but no significant effect was observed for the TG / MboI marker in the studied variables. Studies with larger numbers of animals for these markers can increase their potential to be included in panels of customized SNP aiming the improvement of the Canchim breed.

Keywords: beef cattle, molecular markers, genetic improvement, marker assisted selection

Introdução

O setor de bovinocultura de corte brasileiro têm se preocupado não somente com o aumento da produção, mas também com a qualidade da carne produzida, sendo uma das maiores dificuldades dos produtores a melhoria de características como a quantidade de gordura entremeada, a cobertura de gordura da carcaça e a área do músculo *Longissimus dorsi*. Uma opção de estratégia para o melhoramento das características de qualidade de carne e carcaça é a Seleção Assistida por Marcadores (SAM), por meio da análise de polimorfismos localizados em genes candidatos que desempenham alguma função biológica de interesse e posteriormente a inclusão destes em painéis de SNP para melhoramento de raças bovinas. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar estudo de associação entre os marcadores *LEP/Kpn21* (BUCHANAN et al., 2002) e *TG/MboI* (BARENDSE, 1999) com as características área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e marmoreio (MAR) em animais da raça Canchim.

Revisão Bibliográfica

Testes de DNA que identificam o potencial genético dos indivíduos, mesmo em idades muito jovens, pode auxiliar em programas de melhoramento genético de bovinos de corte, sendo feita a análise dos marcadores moleculares para desvendar o potencial do indivíduo para determinada característica de interesse econômico (Sugisawa et al., 2002). Considera-se como marcador molecular todo e qualquer fenótipo molecular originado de um gene expresso ou de segmento específico de DNA, o qual pode corresponder a uma região expressa do genoma ou não, diferenciando dois ou mais indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Foi utilizada então a Seleção Assistida por Marcadores (SAM), através de análises de SNPs localizados em genes candidatos que desempenham alguma característica de interesse. Porém, este tipo de estudo possui limitações como o baixo número de SNPs utilizados. Em função deste e entre outros aspectos, a implementação da SAM tem sido desfavorável e os ganhos em eficiência e custo são muito reduzidos (Dekkers, 2004). Para corrigir estas limitações, deu-se início ao estudo de seleção genômica (SG), utilizando-se grande número de SNPs, o que permitiu envolver todo o genoma para a análise de uma ou várias características de interesse econômico, o que pode explicar os efeitos genéticos totais (Meuwissen; Hayes; Goddard, 2001). Alguns genes descritos como candidatos foram identificados como possíveis responsáveis pela qualidade de carcaça e de carne em bovinos de corte, como o *LEP* (BUCHANAN et al., 2002) e o *TG* (BARENDSE, 1999). O gene *LEP*, localizado no cromossomo 4, codifica a leptina, que é um hormônio produzido pelo tecido adiposo (ACCORSI et al., 2007). O polimorfismo *LEP/Kpn21* localizado neste gene é responsável pela substituição de um nucleotídeo de base citosina (alelo C) por um de base timina (alelo T), promovendo a troca de uma arginina por uma cisteína na sequência de aminoácidos da leptina (BUCHANAN, 2002). Já o gene *TG* está localizado no cromossomo 14 e codifica a tireoglobulina, precursora da triiodotironina e tetraiodotironina, que são sinalizadores do desenvolvimento de adipócitos que afetam o metabolismo de lipídeos (FORTES, 2007). O polimorfismo *TG/MboI* é caracterizado pela transição de um nucleotídeo de base citosina (alelo C) por um de base timina (alelo T) na sequência de nucleotídeos do gene, sendo o alelo T relacionado com maiores escores de marmoreio (BARENDSE, 1999).

Materiais e Métodos

Foram genotipados por PCR-RFLP 242 animais para o marcador *LEP/Kpn21* e 276 para o *TG/MboI*, sendo estes animais provenientes das PCADs realizadas nos anos de 2011 e 2012. As características estudadas (AOL, EGS e MAR) foram avaliadas por ultrassonografia em carcaça. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em aparelho termociclador *MyCycler* (BioRad®) com volume final de 25 µL. As sequências dos oligonucleotídeos *forward* 5'- ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC-3' e *reverse* 5'- TGGTGTCATCCTGGACCTTCC-3' foram utilizados para amplificar um fragmento com 94 pares de bases (pb). E para o marcador *TG/MboI* as sequências *forward* 5'-GGGGATGACTACGAGTATGACTG-3' e *reverse* 5'- GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA-3' foram utilizados para amplificar um fragmento com 545 pb. Os programas de PCR utilizados para os genes da leptina e da tireoglobulina foram de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento a 54°C por um minuto e 55°C por 30 segundos, respectivamente, e um passo de extensão a 72°C por um minuto. Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose à 1%, corados com SybrGold® e fotografados em luz ultravioleta. As reações de digestão também foram realizadas em termociclador *MyCycler* (BioRad®). Os produtos de PCR foram clivados com as enzimas de restrição *Kpn21* ([10U/ul]) e *MboI* ([10U/ul]) específica à temperatura de 37°C. O tempo de incubação em termociclador variou entre os marcadores, sendo três horas para *TG/MboI* utilizando-se 0,12 ul de enzima por amostra e seis horas para *LEP/Kpn21* com 0,2 ul por amostra. Os produtos das reações de digestão foram submetidos a eletroforeses horizontais em géis de agarose à 3% corados com SybrGold® e fotografados em luz ultravioleta. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado e os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados a 5% de significância. Nos estudos de associação, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o PROC GLM do SAS.

Resultados e Discussão

As frequências genotípicas mais observadas foram de 45,45% para CC no marcador *LEP/Kpn21* e 66,67% para TT no *TG/MboI*. Em relação aos alelos mais frequentemente observados foram 64% para C no marcador *LEP* e 72% para T no *TG* (Tabela 1). Em relação ao estudo de associação, o marcador *LEP/Kpn21* apresentou efeito sugestivo para as características AOL (P = 0,055) e MAR (P = 0,068). Já o marcador *TG/MboI* não apresentou associação significativa com as características estudadas. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2. Foi observado que a dominância do alelo T, em animais homocigotos para este alelo, conduz ao aumento de 77,8 cm² na média de AOL. Em comparação aos animais homocigotos para o alelo C e aos heterocigotos, as médias conduzem a um efeito menor na característica, sendo um aumento de 74,2 e 74,8 cm², respectivamente. Em um estudo com o mesmo SNP, Buchanan et al. (2002) observaram que o alelo T está associado com maior deposição de gordura na carcaça e o alelo C associado com carcaças mais magras. Geary et al. (2003), também estudando o mesmo SNP no gene LEP, descobriram associação entre as concentrações da leptina e a classificação de carcaça e deposição de gordura em animais cruzados. No entanto, Fortes et al. (2009) encontraram frequências de 81,0% para o alelo C e 19,0% para o alelo T para animais cruzados de cinco grupos genéticos (Nelore, Rubia Galega Nelore, Canchim, Brangus *three-cross* e Braunvieh *three-cross*) e não encontraram efeito significativo para AOL. Sobre o gene da tireoglobulina, os resultados estão de acordo com a literatura,

pois em um estudo realizado em 2006 por Rincker e colaboradores, não foi observada associação desse polimorfismo com deposição de gordura intramuscular, AOL e EGC em animais da raça Simental. Veneroni (2007), analisando em 572 animais da raça Canchim, também não encontraram associação do polimorfismo *TG5* com espessura de gordura. Contudo, este gene deve ser considerado como gene candidato para auxiliar na busca de novos marcadores devido a sua importância como precursor de hormônios que afetam o metabolismo de lipídeos.

Conclusões

Tendo em vista que o efeito observado foi sugestivo para o marcador *LEP/Kpn2I* e não significativo para *TG/MboI*, vê-se a necessidade de um novo estudo com número maior de animais para estes marcadores, o que pode aumentar o efeito sobre as características, assim como o potencial dos mesmos para serem incluídos em painéis de SNP customizados, e desta forma contribuir para o melhoramento da raça Canchim.

Gráficos e Tabelas

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas encontradas para os marcadores *LEP/Kpn2I* e *TG/MboI*.

Frequências alélicas e genotípicas (%)					
<i>LEP/Kpn2I</i>	C	T	CC	CT	TT
	64	36	45,5	37,6	16,9
<i>TG/MboI</i>	T	C	TT	TC	CC
	72	28	66,7	10,1	23,2

Tabela 2. Médias e erro padrão das características fenotípicas analisadas para os genótipos dos marcadores *LEP/Kpn2I* e *TG/MboI*.

	P>F	<i>LEP/Kpn2I</i>			P>F	<i>TG/MboI</i>		
		CC	CT	TT		CC	TC	TT
AOL	0,0555	74,2 ±0,86a	74,8 ±0,91a	77,8 ±1,34b	0,6482	78,90 ±1,19	80,59 ±1,79	78,73 ±0,78
EGS	0,5088	2,29 ±0,05	2,25 ±0,05	2,37 ±0,08	0,7632	2,58 ±0,12	2,62 ±0,18	2,68 ±0,08
MAR	0,0689	2,66 ±0,04	2,58 ±0,05	2,78 ±0,07	0,3304	2,20 ±0,06	2,37 ±0,10	2,29 ±0,04

AOL= área de olho de lombo; EGS= espessura de gordura subcutânea; MAR= escore de marmoreio. Médias na mesma linha seguida de letras a e b diferem estatisticamente ($P<0,05$).

Referências

- ACCORSI, P. A.; MUNNO, A.; GAMBERONI, M.; VIGGIANI, R.; DE AMBROGI, M.; TAMANINE, C.; SEREN, E. Role of Leptin on Growth Hormone and Prolactin Secretion by Bovine Pituitary Explants. *Journal of Dairy Science*. v. 90, p. 1683-1691, 2007. BARENDSE, W. Assessing lipid metabolism. Patent International Publication number: WO 99/23248. World International Property Organization, 1999. BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. 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. DEKKERS, J. C. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 82, suppl., p. s313-s328, 2004. FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed., p. 220, 1998. FORTES, M.R.S.; CURTI, R.A.; CHARDULO, L.A.L. et al. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genetics and Molecular Biology*, v.32, p.75-82, 2009. FORTES, M. R. S. Polimorfismos dos genes *CAPNI*, *CASTI*, *LEP*, *TG* e *DGATI* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de São Paulo, 2007. GEARY, T.W.; McFADIN, E.L.; MacNEIL, M.D. et al. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *Journal of Animal Science*, v.81, p.1-8, 2003. MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, Bethesda, v. 157, n. 4, p. 1819-1829, 2001. RINCKER, C. B.; PYATT, N. A.; BERGER, L. L.; FAULKNER, D. B. Relationship among Gene STAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 686-93, 2006. SUGISAWA, L. ; SOUTELL, R. V. G.; SILVA, C. L. S. P.; FONZAR, J. F.; OLIVEIRA, F. P.; MARINI, A.; JÚNIOR, A. G.; FILHO, W. F. Utilização de marcadores moleculares para qualidade de carne em bovinos de corte. *Ciências Agrárias e da Saúde*, v. 2, n. 2, p. 43-46, 2002. VENERONI, G. B. Associação da região centromérica do cromossomo 14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim. 2007. 68 f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.