Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Expressão gênica e polimorfismos no gene da leptina e suas associações com a puberdade em Nelore

Fernanda Regina Hora Savalio

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2010

Fernanda Regina Hora Savalio
Zootecnista

Expressão gênica e polimorfismos no gene da leptina e suas associações com a puberdade em Nelore

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Savalio, Fernanda Regina Hora
Expressão gênica e polimorfismos no gene da leptina e suas associações com a puberdade em Nelore / Fernanda Regina Hora Savalio. - - Piracicaba, 2010.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Expressão gênica 2. Gado Nelore 3. Leptina 4. Novilhos - Fêmea 5. Polimorfismo 6. Puberdade I. Título

CDD 636.291
S264e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

FICHA CATALOGRÁFICA

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha mãe Maria do Carmo, ao meu pai Santiago, à minha irmã Renata, aos meus avôs Antônio e José e ao Antonio pela compreensão, incentivo e carinho em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo por me amar e estar sempre ao meu lado durante todo este estudo.

Aos amigos Nelson, Elizabeth (Lili), Rosângela, Lílian, Rogério, Rafael, Roberley, Carlos (Carlão), Cedric (Lobinho), meu avô José e Isabel pelas constantes orações por mim e apoio a cada ligação.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela orientação, paciência e ensinamentos.

Aos Professores Dr. Luis Felipe Prada e Silva, Dr. Alexandre Vaz Pires e Dr. Gerson Barreto Mourão, pela colaboração durante o desenvolvimento do meu projeto.

Aos órgãos de financiamento FAPESP e a CAPES.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal Nirlei e Jorge, pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal, pela convivência, ajuda e compreensão.

A Kerli, Fernanda, Andrezza, Lilian, Gustavo, Ana Paula, Minos, Marcelo, Clarissa, Priscila e Renato pelas ajudas constantes, risadas e o agradável convívio no laboratório.

“Os que vencem não são aqueles que ajuntam maior número de bens. São os que amaram a família e conheceram a alegria de ver esse amor retribuído. São aqueles que souberam o que significa dedicar a vida a um propósito maior do que a si mesmo. São os que conheceram a Deus e esperam ansiosamente pela eternidade com Ele.”

Ruth Hayley Barton

SUMÁRIO

RESUMO....11
ABSTRACT....13
1 INTRODUÇÃO....15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....17
2.1 A Raça Nelore e PP14....17
2.2 Leptina....19
2.3 Ação da leptina sobre a puberdade....21
2.4 Polimorfismos no gene da leptina em bovinos....24
2.5 Polimorfismos no promotor da leptina em bovinos....27
3 MATERIAL E MÉTODOS....31
3.1 Coletas de tecido....31
3.1.1 Rebanho 1....31
3.1.2 Rebanho 2....31
3.2 Expressão gênica....32
3.2.1 Extração de RNA total, verificação da quantidade e integridade....32
3.2.2 Desenho dos iniciadores para expressão gênica....33
3.2.3 Síntese de cDNA....33
3.2.4 RT - PCR quantitativa....34
3.2.5 Análise da expressão do gene da leptina....35
3.2.6 Análise estatística....36
3.3 Polimorfismo....37
3.3.1 Extração de DNA, verificação da quantidade e integridade....37
3.3.2 Desenho dos iniciadores para detecção de polimorfismos....38
3.3.3 PCR e purificação do produto amplificado....39
3.3.4 Reação de seqüenciamento....39
3.3.5 Purificação da reação de seqüenciamento....40
3.3.6 Determinação das seqüências....40
3.3.7 Clonagem....40
3.3.8 Estimativas das DEPs para PP14....42

3.3.9 Determinação das freqüências alélicas, genotípicas, estimação da heterozigose e conteúdo de informação polimórfica 42
3.3.10 Análise estatística 43
3.3.11 Construção e análise de haplótipos 44
3.3.12 Reconstrução gênica 46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 Expressão gênica 47
4.1.1 Extração e quantificação do RNA 47
4.1.2 RT – PCR quantitativa 48
4.1.3 Análise da expressão do gene da leptina 48
4.2 Polimorfismos 52
4.2.1 Extração e quantificação do DNA 52
4.2.2 Desenho de iniciadores 53
4.2.3 Amplificação por PCR 54
4.2.4 Purificação do produto da PCR 56
4.2.5 Seqüenciamento, purificação e determinação das seqüências 57
4.2.6 Detecção de polimorfismos no promotor e gene da leptina 58
4.2.7 Dados fenotípicos para DEP para PP14 65
4.2.8 Análise dos polimorfismos 65
4.3 Combinações genotípicas e de haplótipos 76
4.3.1 Combinações genotípicas 77
4.3.1 Haplótipos 80
4. 4 Reconstrução gênica 83
5 CONCLUSÕES 87
REFERÊNCIAS 89
ANEXOS 99

RESUMO

Expressão gênica e polimorfismos no gene da leptina e suas associações com a puberdade em Nelore

Nos últimos anos o gene da leptina, vem sendo objeto de intensa investigação em bovinos pela sua associação com características econômicas, tais como, metabolismo energético, eficiência e consumo alimentar, deposição de gordura e características reprodutivas. Estudos anteriores apontam que esse gene possa influenciar o início da puberdade tanto em animais como em humanos. Tendo em vista a importância desse gene para a pecuária nacional, os objetivos do presente estudo foram determinar a relação entre expressão do gene da leptina e puberdade em novilhas Nelore; identificar polimorfismos no promotor e no gene da leptina; avaliar os efeitos desses polimorfismos com a puberdade, expressão do gene e diferença esperada na progênie (DEP) para probabilidade de prenhez de novilha aos 14 meses (PP14). Amostras de tecido adiposo subcutâneo foram coletadas de 28 novilhas Nelore com idade em torno de 25 meses, sendo 14 pré-púberes e 14 púberes. Análises foram feitas por RT-PCR quantitativa, utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído das amostras de tecido adiposo. A expressão da leptina foi 2,1 vezes maior *(P*=0,0337) no tecido adiposo das novilhas púberes, sugerindo que esse gene possa estar influenciando o início da puberdade nestes animais. Amostras de DNA foram extraídas para identificar polimorfismos no gene e no promotor da leptina que poderiam estar associados com a puberdade e a expressão do gene no tecido adiposo subcutâneo. Foram identificados 37 polimorfismos, dos quais 20 não haviam sido reportados previamente. Nenhum dos 37 polimorfismos encontrados ou dos 10 haplótipos formados a partir dos polimorfismos, foram associados (*P*≥0,05) com a maior expressão do gene ou com a puberdade nestas novilhas. Aparte disso, o DNA de 96 fêmeas Nelore, sendo 48 com alta DEP para PP14 e 48 com baixa DEP para PP14 pertencentes a outro rebanho, foi extraído a partir de sangue periférico. Uma região de 715 pb do gene da leptina foi seqüenciada nestas 96 amostras. Nenhuns dos 11 polimorfismos identificados apresentaram associação (*P*≥0,05) com os valores de alta ou baixa DEP para PP14, entretanto a substituição do haplótipo 1, o mais freqüente, pelo haplótipo 2 revelou uma associação sugestiva (*P*=0,0923) com a característica, indicando que a substituição possa estar contribuindo para a variação da DEP para PP14. Fêmeas com o haplótipo 2 em média tiveram efeito de -9,51 a DEP para PP14 em relação aquelas com o haplótipo mais freqüente. Este estudo confirma a associação da expressão do gene da leptina com a puberdade, descreve novos polimorfismos identificados neste gene e apresenta resultados iniciais da associação dos polimorfismos com expressão e puberdade em Nelore.

Palavras-chave: Leptina; Expressão gênica; Polimorfismo; Novilha; Nelore e puberdade

ABSTRACT

Gene expression and polymorphisms in the leptin gene and their association with puberty in Nelore

In recent years, the leptin gene has been subject of intense research in cattle, possibly because of its association with economic characteristics, such as, energy metabolism, feed efficiency, feed intake, fat deposition and reproductive characteristics. Previous studies suggest that this gene might be influencing the onset of puberty in both animals and humans. Given the importance of this gene for the national livestock, the goals of this study was to determine the relationship between leptin gene expression and puberty in Nelore heifers; identified polymorphisms in the promoter and leptin gene; evaluate the effect of these polymorphisms on puberty, gene expression and expected progeny difference (EPD) for probability of pregnancy of heifers at 14 months (PP14). Samples of subcutaneous adipose tissue were collected from 28 heifers aged around 25 months, 14 prepubertal and 14 pubertal. Leptin gene expression was determined by quantitative RT-PCR using cDNA synthesized from total RNA extracted from adipose tissue samples. The expression of leptin was 2.1 times higher (P=0,0337) in subcutaneous adipose tissue of pubertal heifers, suggesting that this gene might be influencing the onset of puberty in these animals. DNA from these heifers were extracted to identify polymorphisms in the promoter and leptin gene that could be associated with puberty and gene expression in subcutaneous adipose tissue of these heifers. We identified a total of 37 polymorphisms, 20 of which have not been reported previously. None of the 37 polymorphisms found or the 10 haplotypes formed from the polymorphisms were associated (P≥0.05) with higher expression of the gene or with puberty in these heifers. Apart from this, DNA of 96 Nelore, being 48 with high EPD for PP14 and 48 with low EPD for PP14 belonging to another herd, was extracted from peripheral blood. A region of 715 bp in the leptin gene was sequenced in these 96 samples. None of the 11 polymorphisms identified were associated (P≥0.05) with high or low values of EPD for PP14, however replacing the haplotype 1, the most frequent, for haplotype 2 showed a suggestive association (P=0,0923) with the trait, indicating that the replacement can contribute to the variation of EPD for PP14. Females with haplotype 2 had an average effect of -9.51 on EPD for PP14 compared to those with the most frequent haplotype. This study confirms the association of leptin expression on puberty, describes new polymorphisms identified in this gene and presents initial results of the association of polymorphisms with expression and puberty in Nelore.

Keywords: Leptin; Gene expression; Polymorphism; Heifer; Nelore and puberty

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte tem ocupado lugar de destaque nas exportações brasileiras nos últimos anos. Em 2000, o Brasil exportou 554 mil toneladas (equivalente carcaça) de carne, com projeção de exportação de 1,700 milhões de toneladas (equivalente carcaça) em 2010 (FNP, 2010). O desenvolvimento tecnológico na produção de bovinos, principalmente o melhoramento genético e a sanidade do rebanho, foi fundamental para esse aumento nas exportações da carne bovina brasileira.

Pela importância econômica para o Brasil, existe uma preocupação crescente em produzir bovinos que sejam melhores geneticamente que seus pais. Gerando um desafio para os produtores, os quais precisam produzir animais que, além de atender as exigências mercadológicas, também sejam adaptados às condições climáticas brasileiras e atinjam a precocidade sexual mais cedo, melhorando assim a taxa de desfrute do rebanho.

Estima-se que cerca de 80 % do rebanho nacional é composto por *Bos indicus* e/ou cruzados de zebu (NOGUEIRA, 2003). Nestes animais o primeiro parto ocorre geralmente em torno dos 34 meses, o que corresponde a uma concepção ao redor dos 25 meses de idade, enquanto em animais *Bos taurus* a concepção ocorre por volta dos 14 meses (PEREIRA et al., 2002). Esse atraso nos zebuínos eleva os custos de produção e reduz a taxa de desfrute do rebanho, além de atrasar o processo de seleção genética.

Dentre os genes ligados a características reprodutivas, está o gene da leptina, que vem sendo investigado intensamente desde a sua descoberta em 1994. A leptina é um hormônio que participa da regulação do metabolismo energético, controle do consumo de alimentos e reprodução em muitas espécies, além de participar de outros importantes eventos inclusive a puberdade (WILLIAMS et al., 2002).

Os estudos com leptina iniciaram-se nos anos 50 com roedores obesos que apresentavam resistência à insulina, intolerância ao frio e infertilidade. Primeiramente esse gene foi identificado no tecido adiposo de camundongos geneticamente obesos (ZHANG et al., 1994).

Em humanos, a leptina parece ter o papel de desencadear a puberdade, pois a elevação de testosterona em garotos pré-puberes foi antecedida por picos de leptina, que voltaram ao normal depois de atingida a puberdade (MANTZOROS et al., 1997; SPICER, 2001). Por outro lado em garotas as concentrações de leptina vão aumentando progressivamente até o início da puberdade e se mantém mesmo depois de atingido a puberdade (CLAYTON et al., 1997; SPICER, 2001).

Chehab et al. (1997) injetaram leptina em fêmeas de camundongos normais e 85% das fêmeas tratadas atingiram a puberdade antes que o grupo controle. Esse gene foi proposto como um indicador de adiposidade do corpo e foi demonstrado que pelo menos em roedores, tem um papel permissivo em puberdade (AHIMA et al., 1997).

A elucidação do mecanismo de regulação da puberdade em Nelore é fundamental para uma seleção genética mais eficaz da raça. Assim a pecuária brasileira terá um ganho em eficiência na produção de bovinos.

Tendo em vista a importância desse gene no melhoramento animal, os objetivos deste projeto foram: a) Determinar a relação entre expressão do gene da leptina e puberdade em novilhas Nelore; b) Identificar polimorfismos no gene da leptina; c) Verificar associação desses polimorfismos com a puberdade e a expressão do gene em novilhas; d) Verificar associação desses polimorfismos com diferença esperada na progênie (DEP) para probabilidade de prenhez de novilha aos 14 meses (PP14).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Raça Nelore e PP14

Os primeiros animais zebuínos que chegaram ao Brasil foram trazidos da Índia pelos portugueses no século XVIII. Em seu país de origem esses animais são usados basicamente para produção de leite e tração. No entanto, no Brasil são criados principalmente para produção de carne. Entre as raças indianas que foram trazidas, estava à raça Ongole, que ficou conhecida no Brasil como Nelore (SANTIAGO, 1985).

Atualmente o Brasil é detentor do maior rebanho comercial do mundo e também o líder em exportações de carne *in natura*. O rebanho nacional de bovinos é de cerca de 207 milhões de animais, sendo 20 % aptidão leite e 80 % aptidão corte. Entre os animais de corte, grande maioria é da raça Nelore ou produto de cruzamento de Nelore (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2007).

A enorme propagação da raça Nelore no Brasil ocorreu devido à alta adaptabilidade desses animais às condições tropicais e ao sistema de manejo em pasto. Além disso, o Nelore tem grande resistência a doenças, baixa mortalidade, longevidade e alta fertilidade. Mesmo quando comparado com outras raças zebuínas, a raça Nelore supera seus concorrentes no que se refere à rusticidade, resistência e prolificidade (SANTIAGO, 1983). Contudo, algumas características produtivas e reprodutivas ainda precisam ser melhoradas nessa raça, entre elas a produção de leite, período de lactação, maciez da carne, intervalo entre partos e, principalmente, idade da maturidade sexual.

Em raças zebuínas, a maturidade sexual da novilha ocorre geralmente em torno dos 24 meses ou mais e, mesmo que as novilhas sejam expostas ao touro em torno de 14 meses de idade, poucas serão aquelas que irão emprenhar e a concepção ocorrerá somente em torno dos 25 meses. Porém, quando se fala sobre entrada à puberdade em animais taurinos já está determinada que seja em torno de um ano de idade.

A seleção de fêmeas precoces na raça Nelore, com base em características reprodutivas, ainda tem sido lenta no Brasil. Muita ênfase é dada à

seleção de animais para desenvolvimento ponderal, enquanto que as características reprodutivas ficam em segundo plano, ou quando é praticada, ocorre com base no perímetro escrotal (PE) dos machos (FERRAZ et al., 2007). Entretanto, outra característica para precocidade sexual em novilha tem ganhado destaque. Trata-se da probabilidade de prenhez de novilha aos 14 meses (PP14). Essa característica é medida diretamente na fêmea e leva em conta a sua fertilidade inerente (FERRAZ et al., 2007).

A característica PP14 foi definida como a probabilidade da novilha com idade média de 12 a 16 meses emprenhar depois de exposta ao touro ou submetida à inseminação artificial. Caso seja confirmado o sucesso, essas novilhas recebem o valor 1, referente ao sucesso, ou o valor 0, indicando o fracasso (SILVA et al., 2003). Inicialmente, a taxa de prenhez será baixa, mas irá aumentando nas gerações sucessivas. Filhas de vacas super-precoces apresentaram mais de 70 % de prenhez aos 14 meses, enquanto que filhas de vacas normais apresentam menos de 30 % de prenhez à mesma idade (FERRAZ et al., 2007). Existe um índice para a diferença esperada na progênie (DEP) de PP14. Com esse índice é possível selecionar touros ou até mesmo fêmeas que tenham maior probabilidade de gerar filhas que fiquem prenhas aos 14 meses. Eller et al. (2002), utilizando modelos não lineares e o método R, reportaram que a estimativa de herdabilidade para PP14 nos animais estudados da raça Nelore foi 0,57.

Os valores da DEP podem ser positivos ou negativos. Para entender melhor os valores de DEP para PP14, temos como exemplo duas fêmeas. Fêmea A com DEP para PP14 de +25 e fêmea B com DEP PP14 de -10, se a taxa de prenhez da população avaliada for de 25 %, isso significa que a fêmea A terá 50 % de probabilidade de produzir filhas que apresentem prenhez aos 14 meses, enquanto que a fêmea B teria 15 % de probabilidade. Uma fêmea com DEP para PP14 igual a zero, portanto teria 25 % de probabilidade de que suas filhas ficariam prenhes aos 14 meses (FERRAZ et al., 2007).

2.2 Leptina

Os primeiros estudos com a leptina, conhecido como o gene da obesidade (ob), iniciaram-se nos anos 50. Em experimentos de parabiose a circulação sanguínea de ratos obesos e magros foi ligada, o que causou o definhamento dos ratos magros, enquanto os obesos continuavam a engordar. Percebeu-se então que havia algum fator circulante (conhecido como fator ob) produzido pela massa gordurosa que controlava o consumo de alimentos (COLEMAN, 1973; HERVEY, 1959). Mas foi somente nos anos 90, que Zhang et al. (1994), utilizando clonagem posicional, conseguiram identificar o gene em humanos e ratos, o qual recebeu o nome de leptina, que vem do grego "leptos" que significa magro.

Existe uma alta conservação deste gene entre as espécies, o que sugere que o gene possa ter funções semelhantes entre elas. O gene de humanos é 84 % idêntico ao gene de camundongos. O gene de bovinos possui homologia de cerca 95 % com ovinos e de 85 % com suínos (ZHANG et al., 1994; KUMAR et al., 1998; DOYON et al., 2001; MÁCAJOVÁ et al., 2004;).

Em bovinos o gene da leptina foi mapeado no cromossomo 4 (POMP et al., 1997), ocupando cerca de 18,9 Kb do genoma bovino e contém três exons separados por dois introns, mas somente os exons 2 e o 3 participam da transcrição da proteína (TANIGUCHI et al., 2002) (Figura 1).

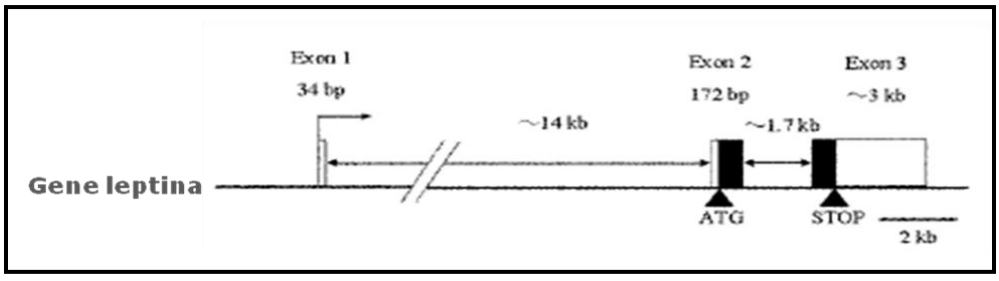

Figura 1 - Estrutura genômica do gene da leptina em bovinos. As caixas estão indicando a posição dos exons. A região traduzida está pintada, em aberto e não pintado estão os introns e a região não traduzida (adaptado de TANIGUCHI et al., 2002)

O produto deste gene é um peptídeo de 167 aminoácidos, o qual possui uma seqüência sinal secretório de 21 aminoácidos na extremidade amino - terminal que

com a translocação em microssomas é eliminada, formando um hormônio peptídeo de 146 aminoácidos, semelhante às citocinas, com peso de 16 kDa também chamado de leptina (ZHANG et al., 1994).

A expressão e secreção da leptina está altamente correlacionada com a massa de gordura corporal e o tamanho dos adipócitos (HOUSEKNECHT et al., 1998), pois sua síntese ocorre principalmente no tecido adiposo branco, mas alguns estudos mostraram que o hormônio também pode ser sintetizado por outros tecidos, como estômago (BADO et al., 1998), placenta (HASSINK et al, 1997), músculo esquelético (WANG et al., 1998), células epiteliais mamárias (SMITH et al., 2002), hipófise e cérebro (MORASH et al., 1999). A síntese da leptina responde positivamente a sinais de outros hormônios como insulina, glicocorticóides (HOUSEKNECHT et al., 1998), além de fatores como quantidade de tecido adiposo, infecções, endotoxinas e citocinas (GRUNFELD et al., 1996). A síntese pode ser inibida por sinais hormonais, como os dos hormônios tireoidianos (ESCOBAR-MORREALE et al., 1997), agonistas β-adrenérgicos (LI et al., 1997) testosterona (CASTRACANE et al., 1998; CLAYTON et al., 2000) e também por outros fatores como jejum (AMSTALDEN et al., 2000), frio e atividades físicas (CASTRACANE et al., 1998). Vários polimorfismos encontrados na leptina, no seu promotor e receptor estão associados com diferenças na expressão e concentrações plasmáticas da leptina em bovinos em diferentes estágios fisiológicos (BUCHANAN et al., 2002; LIEFERS et al., 2004, 2005; NKUMAH et al., 2005).

O receptor da leptina possui seis isoformas, que derivam do *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA), das quais uma é longa e as demais 5 são curtas. A forma longa é expressa principalmente nas regiões do cérebro e é responsável pela ação da leptina no hipotálamo. As formas curtas estão presentes nos demais tecidos e são responsáveis pela ação periférica da leptina (MERCER et al., 1996).

No hipotálamo a leptina controla a ingestão de alimento, regula o metabolismo energético, além de ter papel importante na reprodução, através da sua ação sobre os neuropeptídios hipotalâmicos, principalmente o proopiomelanocortina (POMC) e o neuropeptídio Y (NPY) (HOUSEKNECHT et al., 1998; MÁCAJOVÁ et al., 2004). Entretanto, a sua ação no hipotálamo ainda não está totalmente elucidada. A

leptina age em todos os tecidos e órgãos que participam da regulação do balanço energético, além de participar também na regulação da homeostase (HOUSEKNECHT et al., 1998), formação de ossos, crescimento e resposta imune (ZIEBA et al., 2005). Esse hormônio peptídeo é filtrado e degradado pelo rim, onde é encontrada uma grande quantidade dos receptores de forma curta (MEYER et al., 1997).

2.3 Ação da leptina sobre a puberdade

A puberdade é definida como o primeiro estro com ovulação, seguido da formação de corpo lúteo. Vários fatores influenciam o início da puberdade em bovinos, entre eles idade, peso, raça, genótipo e ambiente (REECE, 2006). Associado a esses fatores existe a necessidade de maior disponibilidade de energia, insulina, glicose e leptina, que sinalizam para o hipotálamo de que o balanço energético esta favorável para o início da atividade reprodutiva (NOGUEIRA, 2003).

Poucas semanas antes do início da puberdade, as freqüências e amplitude dos pulsos secretórios pelo hipotálamo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) aumentam em um padrão rítmico. Esse hormônio é liberado na circulação até atingir a hipófise anterior onde estimula a secreção das gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). As gonadotrofinas intensificam o desenvolvimento folicular ovariano, ovulação e função do corpo lúteo (REECE, 2006).

Tem sido postulado que o responsável por regular a liberação do GnRH pelo hipotálamo seja um hormônio derivado dos adipócitos, a leptina. Esse hormônio é um importante elo entre o metabolismo e a reprodução e pode ser um sinal metabólico ao sistema reprodutivo que há suficiente depósito de gordura para atender a demanda calórica da reprodução (NEIL, 2006).

A leptina parece influenciar a puberdade em humanos. Em meninas e meninos as concentrações de leptina vão aumentando até a puberdade. Depois essas concentrações aumentam em meninas e diminuem em meninos (AHMED et al., 1999). Essa diminuição em meninos pode ser devido à testosterona que tem efeito negativo na síntese de leptina (CASTRACANE et al., 1998; CLAYTON et al., 2000). Crianças pré-

púberes com deficiência de leptina, quando tratadas com o hormônio, tiveram redução da saciedade, perderam gordura e aumentaram a secreção de gonadotrofina noturna (FAROOQI et al., 1999).

Ainda não está totalmente definida a ação da leptina sobre a puberdade. Sabe-se que a restrição alimentar atrasa a entrada dos animais na puberdade pela inibição dos pulsos de LH, em parte pela falta de um sinal do hormônio liberador de gonadotrofina e pela ação inibidora exercida pelo estradiol (WILLIAMS et al., 2002). Em vacas bem nutridas, períodos curtos de jejum não causariam efeitos drásticos sobre os pulsos de LH devido às reservas energéticas e à fermentação ruminal que pode durar dias (WILLIAMS et al., 2002). Entretanto em novilhas, Amstalden et al. (2000) reportaram que um período de jejum de 2 dias causou redução da expressão da leptina, leptina circulante, IGF-1, insulina e nas freqüências nos pulsos de LH.

Bovinos pré-puberes desnutridos não irão entrar na puberdade até que sejam nutridos corretamente. Assim também vacas ciclando pararão de ciclar quando enfrentarem períodos de desnutrição extremos. Pode-se concluir com isso que o gene da leptina age como fator no sistema de reprodução (MÁCAJOVÁ et al., 2004).

A leptina é sintetizada no tecido adiposo e é transportada até o hipotálamo e ali age diretamente em neurônios secretores de GnRH ativando a sua produção, mas pouca co-expressão entre neurônios produtores de GnRH e receptores da leptina foi observado (FINN, 1998). A leptina poderia então influenciar diretamente a produção de LH e FSH, pois foram identificados receptores da leptina na hipófise (JIN et al., 2000). Porém é mais aceito que a leptina exerça influência sobre o GnRH e conseqüentemente ao LH e FSH através dos neuropeptídios hipotalâmicos, o POMC e o NPY. A leptina estimula a produção do POMC que por sua vez estimula a síntese de GnRH, além de também estimular a síntese do hormônio estimulador da melanocortina (α – MSH) que influencia o comportamento alimentar animal (WILLIAMS et al., 2002). No entanto, é o NPY que tem sido apontado como o principal mediador dos efeitos da leptina sobre a reprodução. O NPY estimula a ingestão de alimentos, inibe a termogêneses, aumenta a insulina plasmática e as concentrações de glicocorticóides (DRYDEN, 1996), também age nos neurônios produtores de GnRH inibindo a sua secreção (AMSTALDEN et al., 2000). A leptina age centralmente inibindo os efeitos do NPY através da inibição da

síntese do NPY no núcleo arqueado (ERICKSON et al., 1996) (Figura 2). Segundo Clayton et al. (2000) o NPY pode ativar ou inibir a produção de GnRH, dependendo do estado do animal (se está em jejum ou alimentado) e também da idade. Em animais alimentados e nutridos o NPY aumenta os pulsos de GnRH, mas em animais desnutridos o NPY inibe o GnRH. Nesta situação os níveis de leptina também estarão baixos, o que reduz o seu efeito sobre a inibição do NPY, que por sua vez agiria nas células produtoras de GnRH reduzindo a sua secreção. De acordo com esses mesmos autores ainda não está claro como as ações opostas do NPY são mediadas no GnRH.

Vaiciunas et al. (2008) estudando os genes NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4, sugeriram que a combinação da alta expressão da leptina com a baixa expressão do receptor do NPY possa ativar a puberdade em novilhas *Bos indicus*.

Durante estresse nutricional, tanto em monogástrico como ruminantes, a expressão de mRNA de leptina é suprimida, enquanto que o NPY é elevado, resultando na supressão de LH (WILLIAMS et al., 2002). Mcdonald (1990) tratou ratos com NPY e verificou que o NPY suprimiu a freqüência de pulso e amplitude de secreção de LH durante várias horas.

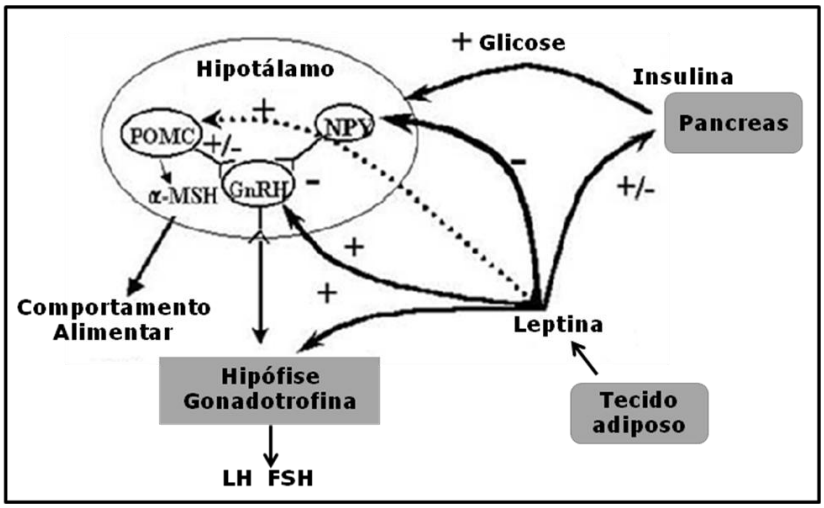

Figura 2 - Representação dos efeitos da leptina sobre o eixo hipotálamo hipófise (adaptado de WILLIAMS et al., 2002)

2.4 Polimorfismos no gene da leptina em bovinos

O interesse pelo gene da leptina tem aumentado nos últimos anos. A busca por polimorfismos neste gene procura responder se os sítios polimórficos encontrados podem estar associados com características produtivas e reprodutivas. Se essas associações existirem, elas poderão ser usadas em programas de melhoramento genético (LIEFERS et al., 2002; SOARES et al., 2006).

Konfortov et al. (1999) encontraram 20 polimorfismos de base única (SNP) em 22 animais de diversas raças *Bos taurus*, *Bos indicus* e no cruzamento das duas subespécies. Destes, 14 foram encontrados em introns e 6 em exons. O polimorfismo na posição 305 no exon 2 substitui uma citosina (C) para timina (T), o que acarreta na troca do aminoácido de arginina para cisteína. Já o polimorfismo na posição 140 encontrado no exon 3 altera o aminoácido de alanina para valina depois de uma substituição de um C/T.

No Intron 1, Konfortov et al. (1999) relataram a presença dos SNP 264 que troca um C/T, e do SNP 287 que troca um G/C. As freqüências alélicas encontradas foram de 0,59 do alelo C para o SNP na posição 264 e de 0,59 do G para o SNP na posição 287, enquanto Liefers et al. (2003) relataram freqüências de 0,67 para o C e de 0,60 para o G, respectivamente para os SNPs nas posições 264 e 287. Esses dois SNPs também foram encontrados por Lagonigro et al. (2003) que identificaram freqüências alélicas de 0,65 para o C e de 0,65 para o G, respectivamente, para os SNPs na posição 264 e 287 em animais de um rebanho experimental. Nestes estudos os autores não estudaram a relação destes SNPs com características fenotípicas.

Buchanan et al. (2002) estudando touros de raças britânicas e continentais, relataram que o SNP c.73C>T acarreta na mudança do aminoácido de arginina para cisteína no exon 2 (equivalente ao polimorfismo 305 relatado por KONFORTOV et al., 1999). Este SNP foi relacionado com maiores níveis de gordura na carcaça e também com maior expressão do mRNA da leptina nestes animais, sugerindo que esse SNP possa estar associado com maior expressão da leptina. Liefers et al. (2003) verificaram que os genótipos do SNP c.73C>T tiveram efeito na concentração de leptina no final da gestação em vacas Holandesas. Entretanto, esse SNP não foi

associado com média de ganho de peso diário e desempenho reprodutivo em vacas Aberdeen Angus e Charolesa pós-parto (ALMEIDA et al., 2007).

Em outro estudo com o SNP c.73C>T, Buchanan et al., (2003) estudaram a associação deste SNP com a produção de leite e rendimento de proteína em seis raças leiteiras. Os resultados indicaram que esse SNP está associado com aumento na produção de leite (*P*=0,02) e rendimento de proteína (*P*=0,06), sem alterar o rendimento de gordura do leite.

Schenkel et al. (2005) encontraram freqüências alélicas de 0,58 para o alelo C e de 0,42 para o T em uma composição de raças, com maior participação de raças *Bos taurus*. Neste estudo o SNP c.73C>T apresentou associação com rendimento de carne (*P*=0,038) e rendimento de gordura (*P*=0,013). Lusk et al. (2007) não encontraram associação do SNP c.73C>T com deposição de gordura, nem com curvas de crescimento em animais de um rebanho comercial. Também nenhuma associação significativa foi encontrada desse SNP com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim criados a pasto (SANTIAGO et al., 2008).

Stasio et al. (2007) reportaram associação do SNP c.73C>T com maior ganho médio diário, menor rendimento de carne e maior marmoreio, mas não houve associação deste SNP com gordura intramuscular ou adipócitos na raça Blonde d' Aquitaine. Corva et al. (2009) também encontraram associação deste SNP com rendimento de carne na raça Brangus.

Em um estudo recente, Souza et al. (2010) associaram os genótipos do SNP c.73C>T com peso ao nascimento (*P*=0,03) e espessura de toucinho (*P*=0,03) na raça Nelore. A freqüência alélica relatada foi de 0,88 para o alelo C e 0,12 para o T. Entretanto, Choudhary et al. (2005) relataram que somente o genótipo CC foi encontrado no SNP c.73C>T nas raças *Bos indicus* estudadas, em contrapartida os três genótipo (CC, CT e TT) estavam presente nos animais *Bos taurus* avaliados.

Outro polimorfismo, substituição de A/T foi descrito no exon 2 por Lagonigro et al. (2003), o qual causa a mudança do aminoácido de tirosina para fenilalanina. Esse SNP é conhecido como Tyr7Phe. Indivíduos com o genótipo AT tiveram média de 19 % a mais na ingestão alimentar quando comparados com indivíduos com genótipo AA (*P*=0,043). Schenkel et al. (2005) encontraram freqüências

alélicas de 0,96 para alelo A e de 0,04 para o T em raças *Bos taurus*. Esse SNP foi associado com gordura (*P*=0,010), grau de gordura (*P*=0,006) e carcaça magra (*P*=0,003).

Lien et al. (1997) estudando uma raça de bovino norueguesa relataram dois polimorfismos presentes no intron 2. O SNP na posição 1560 substitui um C/T e é conhecido como LEPHinfI. Outro na posição 1620 substitui um guanina (G) por uma adenina (A) é conhecido como LEPBsaAI. Choudhary et al. (2005) estudando o SNP LEPBsaAI em várias raças de *Bos indicus* (Hariana, Sahiwal, Gir e Nimari), *Bos taurus* (Jersey e Holandesa) e também o cruzamento *Bos taurus* x *Bos indicus* (½ Holandesa x ½ Hariana). Encontraram freqüências alélicas de 0,76 de G e 0,24 de A no cruzamento Holandesa x Hariana e na raça Jersey; 0,82 de G e 0,18 de A na raça Holandesa; 0,66 de G e 0,34 de A na raça Hariana; 0,72 de G e 0, 28 de A na raça Sahiwal; 0,75 de G e 0,25 de A na raça Gir e 0,71 de G e 0,29 de A na raça Nimari. Os autores não estudaram a associação destes SNPs com características reprodutivas ou produtivas. Entretanto, nenhuma relação foi encontrada por Almeida et al. (2003) entre o SNP LEPBsaAI com intervalo entre partos e peso ao primeiro parto em vacas Brangus.

Outro SNP no intron 2 foi reportado por Pomp et al. (1997). Esse SNP substitui um C/T, cria um sitio de restrição reconhecido pela enzima de restrição *Sau*3AI, ficando então conhecido como *LEPSau*3AI. Liefers et al. (2003) encontraram associação dos genótipos desse SNP com concentração plasmática de leptina entre os 30 e 20 dias antes do parto em animais da raça Holandesa. Em outro estudo de associação desse SNP com característica produtivas e reprodutivas, Liefers et al. (2002) reportaram que o *LEPSau*3AI (chamado de RFPL1 neste estudo) foi associado com ingestão de alimentos (*P*=0,095), produção de leite (*P*=0,024), rendimento de proteína (*P*=0,012) e rendimento de lactose (*P*=0,020), mas não apresentou nenhuma associação com as demais características avaliadas, entre elas, o início da atividade luteal pós-parto em vacas Holandesas.

Almeida at al. (2003) estudaram a associação do SNP *LEPSau*3AI com intervalo entre partos e peso ao primeiro parto. Encontraram freqüências alélicas de 0,63 para o alelo C e de 0,47 para o T. Reportaram que o SNP somente teve associação com a segunda característica. Porém, Passos et al. (2007) não encontrou

associação do SNP *LEPSau*3AI com expressão da leptina no tecido adiposo em Brangus. Similarmente nenhuma associação deste SNP foi encontrada por Kulig et al. (2009). Entretanto neste estudo a combinação genotípica dos SNPs Ala80Val (exon 3) e *LEPSau*3AI foi associada (*P*<0,05) com maior ganho médio de peso diário na raça Limousin.

Vários polimorfismos foram descritos no exon 3, entre eles a mutação missense C/T que causa a troca do aminoácido de alanina para valina. Esse SNP está localizado a 95 pares de base do início do exon 3 e é conhecido como A59V ou ainda por Ala80Val. Em um estudo de associação feito por Liefers et al. (2002), este SNP apresentou tendência de associação com porcentagem de lactose no leite (*P*=0,085) e não apresentou associação com as demais características analisadas, entre elas balanço de energia e primeira atividade luteal pós-parto. Os genótipos do SNP Ala80Val foram associado com concentração plasmática de leptina no final da gestação em animais da raça Holandesa em outro estudo feito por Liefers et al. (2003).

O polimorfismo Ala80Val afetou o peso aos 210 dias (*P*<0,01) e também o ganho médio de peso diário (*P*<0,05) na raça Limousin (KULIG et al., 2009). Porém, Almeida et al. (2003) e Lagonigro et al. (2003) não encontraram associação deste SNP com nenhuma das características fenotípicas analisadas. Contudo, quando Lagonigro et al. (2003) analisaram a combinação dos SNPs Tyr7Phe, c.73C>T e Ala80Val, os haplótipos desses SNPs foram associado com redução de gordura subcutânea (*P*=0,046) e aumentou gordura intramuscular (*P*<0,01).

2.5 Polimorfismos no promotor da leptina em bovinos

O promotor do gene da leptina de bovinos foi seqüenciado por Taniguchi, et al. (2002). Segundo Nelson et al. (2001), a região promotora de um gene regula o processo de transcrição do mRNA. É nesta região que a enzima RNA polimerase inicia o seu processo de ligação e é direcionada para as regiões codificadoras do gene. Por ser uma região importante na regulação da expressão gênica, polimorfismos encontrados nesta região podem alterar significativamente a expressão do gene.

Liefers et al. (2005), encontraram 20 polimorfismos no promotor do gene. Desses, 14 SNPs foram escolhidos para serem genotipados em vacas Holandesas e quase todos os SNPs genotipados apresentaram associação com concentração plasmática da leptina, principalmente no final da gestação. Sozinho o SNP -147 foi responsável por 10 % dessa variação. Neste mesmo estudo, é relatado o SNP -1457 que substitui um A/G, o qual apresentou freqüência alélica de 0,46 para G. Esse alelo influencia positivamente a primeira atividade luteal pós-parto (*P*=0,017) e peso vivo da vaca na primeira semana de lactação (*P*=0,027). Outro SNP, o -963 que substitui um C/T, foi associado com ingestão de matéria seca (*P*=0,03) e balanço energético (*P*=0,015). Tanto o SNP -1457 quanto o -963 foram associados com concentração plasmática de leptina no final da gestação.

Estudando uma substituição de C por G na posição -105 do promotor da leptina, Adamowicz et al. (2006) relataram que essa substituição afeta a expressão do gene no fígado bovino, sendo que o alelo C seria o responsável pela maior expressão do gene. Avaliando esse mesmo polimorfismo em vacas Holandesas, Liefers et al. (2005), reportaram que esse SNP foi responsável por 10,4 % da variação plasmática da leptina nestas vacas no final da gestação.

Três outros polimorfismos na região promotora do gene foram identificados por Nkrumah et al. (2005) em bovinos provenientes de rebanhos comerciais e experimentais, produtos de cruzamentos de diversas raças *Bos taurus*. Os SNPs 207 e 528 substituem um C/T, enquanto o SNP 1759 troca um C/G. Esses polimorfismos são conhecidos como UASMS1, UASMS2 e UASMS3, respectivamente. Os SNPs UASMS1 e UASMS3 apresentaram freqüências alélicas para T e G de 0,59 para o rebanho experimental e de 0,48 para o comercial, respectivamente. Esses SNPs foram associados com peso corporal final (*P*=0,04), ingestão de matéria seca (*P*=0,007) e espessura de gordura subcutânea medida com ultra-som (*P*=0,05). A freqüência do alelo T do UASMS2 foi de 0,21 no rebanho experimental e 0,20 no comercial e foi associado com maior concentração plasmática de leptina (*P*<0,01), maior ingestão de matéria seca (*P*=0,01), maior espessura de gordura subcutânea (P<0,01) e escore de marmoreio medido por ultra-som (*P*=0,01). Schenkel et al. (2005) estudando esses mesmo SNP em animais mestiços originados dos cruzamentos das raças Angus,

Limousin, Simental e Charolesa, reportaram freqüências alélicas para o UASMS1 e UASMS3 de 0,61 para o alelo T e G, respectivamente. Esses dois SNPs foram associados com rendimento de gordura (*P*=0,012). O UASMS2 apresentou freqüências alélicas de 0,26 para o T e não apresentou associação significativa com nenhuma das características avaliadas.

Lusk et al. (2007), estudaram curvas de crescimento e deposição de gordura em animais *Bos taurus* de um rebanho comercial, reportaram que o SNP UASMS2 foi associado com essas duas características, sendo que o alelo C foi favorável a melhorias no parâmetro de crescimento e o alelo T foi associado com deposição de gordura. Corva et al. (2009) estudando novilhos da raça Brangus encontraram freqüências alélicas de 0,70 para o alelo C e de 0,30 para o alelo T no SNP UASMS2. Este foi associado com área de olho de lombo, sendo que os animais com genótipo CT tiveram maior área de olho de lombo. Já os animais com genótipo CC eram mais pesados e suas carcaças apresentavam mais músculo que os demais genótipos.

Vinte cinco polimorfismos na região promotora do gene foram encontrados por Chung et al. (2008) em uma raça coreana. Segundo os autores, destes 25 polimorfismos, 11 não haviam sido reportados previamente (g.1508C>G, g.1540G>A, g.1545G>A, g.1551C>T, g.1746T>G, g.1798ins(G), g.1932del(T), g.1933del(T), g.1934del(T), g.1993C>T e g.2033C>T). Entretanto os polimorfismos g.1540G>A, g.1545G>A, g.1551C>T, g.1798ins(G) e g.2033C>T foram previamente descritos por Liefers et al. (2005), sendo que o g.1540G>A equivale ao SNP -1457 e o SNP g.2033C> ao -963. Dos 25 polimorfismos, somente os SNPs g.2418C>G e g.2423G>A foram escolhidos para serem genotipados na população avaliada. Ambos SNPs estudados foram associados com espessura de toucinho. Os animais com genótipo CG apresentaram maior espessura de toucinho quanto comparados com GG (*P*<0,015) para o SNP g.2418C>G. Para o SNP g.2423G>A, os bovinos heterozigotos GA também tiveram maior espessura de toucinho que aqueles com genótipos GG e AA (*P*<0,006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas de tecido

Neste estudo foram utilizados dois rebanhos. Portanto a descrição dos animais será dividida em rebanho 1 e rebanho 2.

3.1.1 Rebanho 1

Foi coletado tecido adiposo subcutâneo de 28 novilhas da raça Nelore, sendo 14 púberes e 14 pré-púberes, provenientes da Fazenda Figueira, localizada no município de Londrina/PR, pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Dentro de uma população de aproximadamente 6000 cabeças, foram separadas 65 novilhas de acordo com o peso, aproximadamente 300 kg, e idade em torno de 25 meses. Esses animais foram criados em regime de pasto, com suplementação mineral.

As novilhas foram submetidas à apalpação retal para verificar o estágio de desenvolvimento dos ovários e quanto à púbere (presença do corpo lúteo) e pré-púbere (ausência do corpo lúteo e ovários pequenos). Em seguida, uma amostra de tecido adiposo subcutâneo foi coletada de cada fêmea, através de biópsia na região de inserção da cauda. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas até o Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP onde ocorreram as extrações de RNA e DNA. Destas 65 novilhas, apenas 14 estavam púberes no momento da coleta do tecido. Assim optou-se por utilizar somente 28 novilhas, 14 pré-púberes e 14 púberes.

3.1.2 Rebanho 2

Aproximadamente 10 mL de sangue foram coletados da veia jugular de 96 novilhas da raça Nelore, sendo 48 com alta DEP para PP14 e 48 com baixa DEP para PP14. Essas novilhas eram provenientes de um rebanho na região noroeste do estado

de São Paulo e foram criadas sob regime exclusivo de pasto, apenas com suplementação mineral.

Tubos coletores contendo EDTA foram usados para a coleta de sangue. Após a coleta esses tubos foram refrigerados e enviados para o Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA/USP, onde ocorreu a extração de DNA. Somente os polimorfismos encontrados no exon 2 e partes do intron 1 e 2 do gene da leptina foram estudados nestas fêmeas.

3.2 Expressão gênica

3.2.1 Extração de RNA total, verificação da quantidade e integridade

Para a determinação da expressão gênica da leptina, apenas os animais do rebanho 1 foram estudados. O RNA total foi extraído das amostras de tecido adiposo, segundo o protocolo do reagente TRIZOL® (Invitrogen), adaptado de Chomczynshi e Sacchi (1987); 1,6 g de tecido adiposo foi homogeneizado com 6,0 mL de TRIZOL® e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, depois a mistura foi centrifugada por 35 minutos, 4500 rpm a 4 ºC. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio, sendo incubada novamente a temperatura ambiente por 3 minutos. Seguiu-se uma nova centrifugação a 10800 rpm por 15 minutos a 4 ºC. A fase aquosa foi recuperada em tubo novo. A este foram adicionados 600 μL de clorofórmio: butanol (4:1) e centrifugado a 10800 rpm por 15 minutos a 4 ºC novamente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 500 μL de isopropanol gelado seguindo-se incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação a 10800 rpm por 15 minutos a 4 ºC. O sobrenadante mais uma vez foi transferido a outro tubo novo e a este foi adicionado 1 mL de etanol 75 %, sendo procedida nova centrifugação a 8540 rpm por 5 minutos a 4 ºC. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μL de água-DEPC.

Após a extração, as amostras de RNA total foram aplicadas em gel de agarose 1 % para verificação da integridade do RNA extraído. A quantificação ocorreu por meio de espectrofotometria. Assim, as amostras foram diluídas (1:100) em água-

DEPC e foram submetidas a leitura da densidade óptica a 260 nm para avaliar a quantidade de RNA e a 280 nm para estimar a contaminação com proteínas.

3.2.2 Desenho dos iniciadores para expressão gênica

Foram desenhados dois pares de iniciadores (Tabela 1), com base nas sequências completas de mRNAs de *Bos taurus*, depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um para amplificação do gene alvo, a leptina, e outro para a amplificação do gene referência, a proteína ribossomal L19 (RPL19). O RPL19 foi utilizado como gene referência para normalizar a quantidade de cDNA presente no estudo da expressão da leptina e assim tentar diminuir os erros associados ao método.

Com o auxilio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) os iniciadores foram desenhados e em seguida avaliados com o programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Foram utilizadas partes do exon 2 e 3 do gene da leptina para o desenho do iniciador. Esse cuidado foi tomado para se ter a certeza que somente o mRNA seria amplificado. O RPL19 de *Bos taurus* possui apenas um exon, assim parte desse exon foi usado para o desenho do iniciador.

Tabela 1 - Seqüências de iniciadores desenhados para análise da expressão gênica, acesso *GenBank* e os tamanhos dos fragmentos gerados

Gene	**Seqüências dos Iniciadores (5'- 3')**	**Acesso *GenBank***	**Tamanho Fragmento**
Leptina	D - GACACCAAAACCCTCATCAA	NM_173928	100 pb
	R -TGAAGTCCAAACCAGTGACC		
RPL19	D - GAAATCGCCAATGCCAAC	NM_001040516	361 pb
	R - GAGCCTTGTCTGCCTTCA		

D = iniciador direto e R= iniciador reverso

3.2.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *Standart Reverse Transcription Protocol (Promega)*, seguindo as indicações do fabricante. Os cDNAs

foram sintetizados a partir de 1 μg de RNA total das amostras de tecido adiposo; 1 μL de oligonucleotídeo iniciador oligo dT (0,5 mg/ml) e água Mili-Q completando o volume para 5 μL. As amostras foram incubadas a 70 °C por 5 minutos e resfriadas em gelo por outros 5 minutos. Em seguida foi adicionado a reação 4 μL de *ImProm – II reaction buffer* 5X; 2,4 μL de $MgCl_2$ (25 mM); 1 μL de dNTP (10 mM); 0,5 μL de *Recombinant RNAsin* (40 u/μL); 1 μL da enzima *Reverse Transcriptase* e água Mili-Q completando o volume final de 20μL. A síntese do cDNA foi feita a 25 ºC por 5 minutos, 42 ºC por 60 minutos e posteriormente inativação da enzima a 70 ºC durante 15 minutos.

3.2.4 RT - PCR quantitativa

O gene da leptina foi avaliado quanto a sua expressão no tecido adiposo de novilhas pré-púberes e púberes pelo método da transcriptase reversa (RT) seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT - PCR quantitativa), utilizando o equipamento *LightCycler® 2.0 Carousel-based real time PCR System* (ROCHE).

A RT - PCR quantitativa baseia-se na detecção e quantificação de um fluorocromo (SYBR® Green), que é adicionado nas amostras antes do início da PCR. Esse fluoróforo se intercala a fita do cDNA que está sendo formado e ao sofrer excitação luminosa emite florescência. Com o acúmulo dos produtos da PCR, essa fluorescência aumenta e é possível ser detectada pelo equipamento. Assim quanto maior a expressão do gene, mais cedo a fluorescência será visualizada e menor o valor do ciclo de "*treshold*" (Ct), que é um ponto escolhido na fase linear da PCR onde a fluorescência será medida. Ao final da RT - PCR quantitativa uma curva de dissociação é obtida, onde é possível verificar a especificidade da amplificação pelo pico único formado.

Para as reações da RT - PCR quantitativa foram utilizados: 0,4 μL de dNTP (10 mM); 1 μL de iniciador direto e reverso (10 μM/μL) cada; 1,3 μL de $MgCl_2$ (50 mM) para leptina e 1 μL de $MgCl_2$ (50 mM) para RPL19; 0,25 μL de BSA (20 mg/ml), 0,3 μL da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (~ 2U), 4 μL de *Sybr* Mix (mix para 100 μL contém: 50 μL de tampão 10X; 12,50 μL de *Dimethyl sulfoxide*; 1 μL de *Sybrgreen*

10.000 X e 36,50 μL de água MIli-Q). Completou-se o volume para 19 μL com água Milli-Q. O mix foi adicionado nos capilares, seguido de 1 μL de cDNA (em torno de 5 ng) em cada reação.

O programa utilizado para a amplificação das amostras foi composto das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 ºC por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação: desnaturação a 95 ºC por 10 segundos, anelamento a 58 ºC por 10 segundos, extensão a 72 ºC por 15 segundos. Finalizando com o programa da curva de dissociação (75-95 ºC com aquecimento de 0,1 ºC por segundo e uma medição contínua de fluorescência) e um resfriamento a 40 ºC por 30 segundos.

3.2.5 Análise da expressão do gene da leptina

Para a determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores foram construídas curvas padrão de diluição em série com diferentes concentrações de um mix de cDNA. Com os resultados obtidos, um gráfico de Ct versus o $\log_{10}$ das concentrações das diluições foi gerado. Uma regressão linear com os resultados obtidos foi feita para determinar o coeficiente angular da reta (*slope*). O *slope* foi usado no cálculo da eficiência de amplificação através da fórmula descrita por Rasmussen (2001):

$$\textbf{Eficiência (E)} = 10^{(-1/slope)} \qquad (1)$$

Para determinar a expressão relativa entre os grupos púbere e pré-púbere, à metodologia descrita por Pffafl (2001) foi utilizada:

$$R = \frac{E_{\text{gene leptina}}^{(\text{Ct leptina:púbere} - \text{Ct leptina:pré-púbere})}}{E_{\text{gene RPL19}}^{(\text{Ct RPL19:púbere} - \text{Ct RPL19:pré-púbere})}} \qquad (2)$$

Em que,

R = expressão relativa;

E = eficiência de amplificação do iniciador;

Ct = ciclo de "*treshold*".

3.2.6 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas, foram utilizados os valores individuais de Ct obtidos com a leptina normalizados pelos valores obtidos com o Ct do gene referência (RPL19), resultando nos valores de ΔCts individuais de cada amostra, sendo estes últimos utilizados na análise.

O método da máxima verossimilhança restrita (REML) foi empregado para o cálculo da análise da variância. O peso e a idade das novilhas foram incluídos no modelo como covariáveis, mas não houve diferença significativa entre as idades das fêmeas, sendo essa retirada do modelo. As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos. O modelo linear utilizado é descrito a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + \beta_1(W_{ij} + \overline{W}) + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

Em que,

$Y_{ij} =$ Valor ΔCt observado;

$\mu =$ Constante inerente a todas as observações;

$P_i =$ Efeito fixo puberdade;

$\beta_1 =$ Coeficiente de regressão linear da característica em relação ao peso do animal a mensuração, incluído no modelo como covariável;

$W_{ij} =$ Peso animal a mensuração;

$\overline{W} =$ Média do peso animal a mensuração;

$\varepsilon_{ij} =$ Efeito aleatório residual, assumindo média 0 e variância σ^2_e.

3.3 Polimorfismo

3.3.1 Extração de DNA, verificação da quantidade e integridade

O DNA do rebanho 1 foi extraído do tecido adiposo por digestão com *proteinase K*, que é uma enzima proteolítica não específica, e solução SDS, um detergente iônico que dissolve membranas celulares. Foram usados 200 mg de tecido adiposo de cada novilha. Acrescentou-se 500 μL de tampão de lise celular (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2 % SDS, pH 8,0) e 15 μL de *proteinase K* (20mg/ml) ao tecido, em seguida a mistura foi incubada *overnight* em banho seco à 55 ºC. Ocorreu a precipitação da proteína adicionando-se 200 μL de acetato de amônio (7,5 M). Após as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 500 μL de isopropanol absoluto, centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, descartado o sobrenadante. Nesta fase o DNA é precipitado. Depois duas lavagens com 500 μL com etanol 70 % cada, com novas centrifugações de 5 minutos a 14000 rpm em cada lavagem. O *pellet* foi seco em temperatura ambiente e suspenso em 100 μL de água Mili-Q.

A extração do DNA dos animais do rebanho 2 ocorreu a partir de sangue periférico, conforme Sambrook e Russel (2001). Ao tecido foi acrescentado uma solução de lise (12 mM de Tris-HCl, pH 8,2; 0,32 M de Sacarose; 5 mM de EDTA e 1 % de Triton 100 X), depois os glóbulos brancos peletizados resultantes foram digeridos com *proteinase K* (0,5 mg/ml) por 3 horas a 55 ºC. Em seguida, as proteínas foram precipitadas com NaCl 5 M e o sobrenadante recuperado. Seguiram-se três lavagens com etanol absoluto. O *pellet* foi seco em temperatura ambiente e suspenso em 100 μL de água ultrapura.

Após a extração, as amostras de DNA total foram aplicadas em gel de agarose 1 % para verificação da sua integridade. A quantificação ocorreu por meio de espectrofotometria. Assim, as amostras foram diluídas (1:100) e foram submetidas a leitura da densidade óptica a 260 nm para avaliar a quantidade de DNA e a 280 nm para estimar a contaminação com proteínas. Em seguida o DNA de todas as amostras foi diluído para 20 ng/μl, com o DNA nesta concentração fez-se a PCR.

3.3.2 Desenho dos iniciadores para detecção de polimorfismos

A construção dos iniciadores foi realizada com base na seqüência completa do gene e do promotor da leptina de *Bos taurus* depositada no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Com auxilio dos programas Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) esses iniciadores foram construídos e avaliados, sendo que o primeiro programa foi usado para a construção e o segundo para avaliação da qualidade dos iniciadores.

Foram desenhados 3 pares de iniciadores para a amplificação do gene da leptina, os iniciadores nomeados de EX2, IN2 e EX3. Além desses, outros três foram sintetizados para amplificar regiões no promotor do gene da leptina: o PLEP1, PLEP2 e também o iniciador PLEP3, descrito por Liefers et al. (2005) (Tabela 2).

Tabela 2 - Seqüências de iniciadores desenhados para detecção de polimorfismo e os tamanhos das regiões flanqueadas

Iniciador	**Sequências dos Iniciadores (5'- 3')**	**Acesso *GenBank***	**Tamanho Fragmento**
EX2*	D - GGGATACAGGGGGAGTTTTT	NC_007302	715 pb
	R - GAGGGAGGAGAGTGAGAAGG		
IN2	D - GTGTCTCTTGGGGCATTTTT	NC_007302	784 pb
	R – GGGCACTCTGGGTCTATTGT		
EX3	D - TTGGGGTGGAAGAGTTGG	NC_007302	852 pb
	R - GAGGAGCGAGAGAGAAATGG		
PLEP1	D - CAGCAGGCAGGATGTTTAGTC	AB070368	675 pb
	R - TCACAAGACCATTACCACACA		
PLEP2	D - GGGGCTATCAATGTGGGATA	AB070368	605 pb
	R - CTGCCCGCCCCTCTTATAG		
PLEP3	D - CTTACCCCTCCACACCATCATCAA	AB070368	523 pb
	R - GAGCCGGGCACTTACCT		

* Os animais do rebanho 2 somente foram amplificados com esse iniciador; # iniciador descrito por Liefers et al. (2005); D= iniciador direto, R= iniciador reverso.

3.3.3 PCR e purificação do produto amplificado

Os iniciadores foram otimizados por reação de PCR para se estabelecer as condições ideais de amplificação para cada gene. A reação padrão estabelecida continha: 3 μL de DNA (20 ng/μL); 2,5 μL tampão de reação (10 X); 1 μL de dNTP (10 mM); 0,5 μL de cada iniciador direto e reverso (10 μM/μL), 1,0 μL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,3 μL da enzima *Taq* DNA polimerase (~2u) e água Mili-Q completando para um volume final de 25 μL. O programa utilizado seguiu os seguintes ciclos: desnaturação inicial à 95 ºC por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 95 ºC por 45 segundos, temperatura de anelamento à 60 ºC por 30 segundos, extensão à 72 ºC por 1 minuto. Finalizando com extensão final a 72 ºC por 5 minutos. As especificidades dos produtos amplificados foram verificadas em gel de agarose 1 %.

O produto da PCR gerado foi purificado conforme descrito por Silva et al. (2008) para a retirada dos iniciadores restantes e resíduos de dNTP, sendo assim, ao produto da PCR foi adicionado 50 μL de isopropanol 65 %, centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante. Acrescentado 50 μL etanol 70 % e centrifugado novamente a 13000 rpm por 5 minutos, descartado novamente o sobrenadante. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente por cerca de 1 hora. O DNA foi ressuspendido em 20 μL de água Mili-Q. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % juntamente com o padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) para verificar a concentração e qualidade de DNA existente em cada amostra.

3.3.4 Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando: 2 μL de *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kits* (*GE Healthcare*); 200 ng de DNA; 3 μL de Tampão *Save Money* (200 mM de Tris pH 9 e 0,5 mM $MgCl_2$); 0,5 μL dos iniciadores direto e reverso (10 μM/μL) da região a ser analisada. O programa utilizado para a reação de seqüenciamento compreendeu as seguintes fases: desnaturação a 95 ºC por 20 segundos, anelamento a 60 ºC por 15 segundos e extensão a 57 ºC por 1 minuto, totalizando 25 ciclos.

3.3.5 Purificação da reação de seqüenciamento

Para a purificação da reação de seqüenciamento foram adicionados 2 μl de acetato de sódio/EDTA (1,5 M NaAc e 259 mM EDTA), homogeneizado bem, pois EDTA tem baixa solubilidade em álcool, podendo ocorrer precipitação. Acrescentou-se 60 μl de etanol absoluto e homogeneizado novamente. Depois a reação foi centrifugada por 45 minutos, 4000 rpm a 4 ºC. O sobrenadante foi removido por inversão e foram adicionados 150 μl de etanol 70 % seguindo-se de nova centrifugação por 15 minutos, 4000 rpm a 4 ºC.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente protegido da luz e suspendido em 10 μl de formamida deionizada (Hi-Di^{TM} formamide *Applied Biosystems*). As amostras foram desnaturadas a 95 ºC por 5 minutos, resfriadas em gelo por 5 minutos e aplicadas no seqüenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

3.3.6 Determinação das seqüências

Para a detecção de polimorfismos, os cromatrogramas obtidos a partir do seqüenciamento foram analisados e montadas com o pacote de programas *Phred/Phrap/Consed* (GORDON et al., 1998; EWING e GREEN, 1998). Esses programas reconhecem os dados dos cromatrogramas e identificam a seqüência de DNA, conferem a cada nucleotídeo analisado um valor, sendo que, quanto maior esse valor, menor é a probabilidade de ter ocorrido erro na identificação do nucleotídeo. Posteriormente as seqüências são organizadas e alinhadas, possibilitando assim a visualização da seqüência gerada e conseqüentemente os polimorfismos presentes.

3.3.7 Clonagem

As análises das seqüências dos fragmentos amplificados pelo iniciador PLEP1 no promotor do gene da leptina, mostraram uma possível inserção de bases em

cinco animais. Para comprovar essa suspeita foi realizada uma clonagem com essas cinco amostras do rebanho 1.

Após a amplificação das amostras com o iniciador PLEP1, conforme descrita no item 3.3.3, foi feito um mix do produto obtido na reação da PCR usando 1 μl de cada amostra. O *kit InsTAclone*^{TM} *PCR Cloning* (Fermentas) foi utilizado para clonar as seqüências. Na ligação foi usado: 3 μl do vetor pTZ57R (55 ng/μl); 6 μl tampão (5X); 1 μl de T4 DNA ligase (5u/μl); 1 μl do mix da PCR e água livre de nucleases para completar volume de 30 μl. A reação foi mantida 1 hora a temperatura ambiente.

O *kit TransdormAid*^{TM} *Bacterial Transformation* (Fermentas) foi empregado na preparação de bactérias competentes. Com esse fim, 150 μl de bactérias foram adicionados em 1,5 ml de meio *c-medium*, e incubados por 20 minutos, a 37 ºC, com agitação constante em incubadora refrigerada. Em seguida 250 μl da solução A foi misturado com a 250 μl da solução B (soluções presentes no kit), formando a solução de transformação (T). Depois de 20 minutos na incubadora a solução de bactérias foi centrifugada durante 1 minuto, 12000 rpm a 10 ºC, descartado o sobrenadante e acrescentado 300 μl da solução T ao pellet formado. Incubado no gelo por 5 minutos e seguindo nova centrifugação por 1 minuto a 12000 rpm a 10 ºC, descartado sobrenadante e adicionado 120 μl da solução T, incubado no gelo por 5 minutos. Em seguida adicionado 2,5 μl da ligação em um tubo novo e deixado no gelo por 2 minutos. A esse tudo foi acrescentado 55 μl da solução T com as bactérias e deixado mais 5 minutos no gelo. A solução foi inoculada em placa de Petri contendo LB Agar, ampicilina (100 mg/ml) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-galactosídeo) 2% e incubada em estufa a 37 ºC overnight.

As colônias que continham o incerto foram inoculadas em meio *Circle Grow* contendo ampicilina (100 mg/ml) e incubadas por 12 horas, a 37 ºC com agitação constante. As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 7 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado 100 μl da solução I (Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM) gelada. O *pellet* foi ressuspendido com ajuda do homogeinizador, seguindo-se a adição de 200 μl da solução II (SDS 1 % e NaOH 0,2 M), incubado em gelo por 5 minutos, acrescentado 150 μl da solução III (3 M acetato de potássio e ácido fórmico

1,8 M) gelada, incubado em gelo por 7 minutos, seguido nova centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos a 4 ºC. A fase aquosa foi transferida para um novo tudo e adicionado 270 μl de isopropanol, misturado por inversão e centrifugado por 15000 rpm por 7 minutos a 4 ºC. Descartado o sobrenadante e acrescentado 250 μl de etanol 70%. Centrifugado por 15000 rpm por 2 minutos a 4 ºC descartado novamente o sobrenadante e deixado secar durante uma hora em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspendido em 30 μl de água Mili-Q com RNAse (10 mg/ml).

Posteriormente amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % juntamente com o padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) para verificar a qualidade e a concentração de DNA plasmidial existente em cada amostra. Cerca de 200 ng de DNA plasmidial foram seqüenciados utilizando 0,5 μL dos iniciadores M13 direto e reverso, conforme descrito no item 3.3.4. Após o seqüenciamento as reações foram purificadas, aplicadas no seqüenciador automático e analisadas de acordo com os itens 3.3.5 e 3.3.6, respectivamente.

3.3.8 Estimativas das DEPs para PP14

As estimativas das DEPs para PP14 das 96 fêmeas do rebanho 2 foram obtidas conforme o descrito por Eller et al. (2002), usando modelos mistos e utilizando a metodologia da máxima verossimilhança restrita (REML) sob modelo animal para a obtenção dos valores BLUP (*best linear unbiased prediction* ou melhor preditor linear não-viezado) e posterior obtenção das DEPs.

3.3.9 Determinação das freqüências alélicas, genotípicas, estimação da heterozigose e conteúdo de informação polimórfica

As freqüências alélicas e genotípicas foram determinadas para cada loco utilizando o procedimento FREQ (SAS, 2006). Para estimar o nível de heterozigose (HET), também conhecido como heterozigosidade observada, de cada um dos polimorfismos, utilizamos o programa *Cervus* v.3.0 (MARSHALL et al., 1998). Entende-se como heterozigose a proporção de heterozigotos dentro de uma população.

O conteúdo da informação polimórfica (PIC) é a probabilidade de um genótipo qualquer de uma progênie deduzir o genótipo parental (REGITANO; COUTINHO, 2001). O PIC pode variar de 0 a 1 e pode ser classificado como pouco informativo, quando PIC for menor que 0,25, razoavelmente informativo quando for maior de 0,25 e menor que 0,50 e altamente informativo quando for maior de 0,50 (BOTSTEIN et al., 1980). O valor de PIC para cada polimorfismo foi calculado utilizando-se o programa *Cervus* v.3.0 (MARSHALL et al., 1998).

3.3.10 Análise estatística

Para relacionar o efeito dos genótipos identificados com a pré-puberdade ou puberdade (será chamada de puberdade) e a expressão do gene da leptina, expressa por valores de ΔCt, no rebanho 1, foram realizadas análises de variância.

A característica puberdade tem resposta binária podendo assumir as condições de pré-púberes (0) e púberes (1), que é peculiar a uma distribuição binomial. O modelo utilizado para associação dos genótipos com a puberdade foi a metodologia dos modelos lineares generalizados considerando uma distribuição Binomial com função de ligação logit, de acordo com Nelder e Wedderburn (1972). Os genótipos foram considerados como efeito fixo. O peso e a idade foram introduzidos no modelo como covariáveis, entretanto, não houve diferença significativa entre as idades das fêmeas, sendo essa característica retirada do modelo.

A distribuição dos valores da expressão do gene (ΔCt) pode ser descrita por uma distribuição normal, neste caso utilizou-se o método de máxima verossimilhança restrita (REML) com modelo que considerou os genótipos como efeito fixo. O peso e a idade foram introduzidos no modelo como covariáveis, entretanto, não houve diferença significativa entre as idades das fêmeas, sendo essa característica retirada do modelo. O modelo matemático utilizado nas análises do rebanho 1 é descrito a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \beta_1(W_{ij} + \bar{W}) + \varepsilon_{ij} \quad (4)$$

em que,

$Y_{ij} =$ Puberdade ou valores de ΔCt observados;

$\mu =$ Constante inerente a todas as observações;

$G_i =$ Efeito fixo genótipo;

$\beta_1 =$ Coeficiente de regressão linear da característica em relação ao peso do vivo à mensuração;

$W_{ij} =$ Peso vivo à mensuração;

$\bar{W} =$ Média do peso vivo à mensuração;

$\varepsilon_{ij} =$ Efeito aleatório residual, assumindo média 0 e variância σ^2_e.

Para associação dos genótipos encontrados com a DEP para PP14 no rebanho 2 foi utilizado o método de máxima verossimilhança restrita (REML). Os genótipos foram considerados como efeito fixo, conforme modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

em que,

$Y_{ij} =$ Valores de DEP para PP14 observados;

$\mu =$ Constante inerente a todas as observações;

$G_i =$ Efeito fixo genótipo;

$\varepsilon_{ij} =$ Efeito aleatório residual, assumindo média 0 e variância σ^2_e.

3.3.11 Construção e análise de haplótipos

O programa PHASE v.2.1 (STEPHENS et al., 2001, 2003), disponível em (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>) foi utilizado para construção dos haplótipos. Foram feitos dois grupos de construções, uma para o rebanho 1 e outra para o rebanho 2, utilizando-se os respectivos polimorfismos encontrados em cada rebanho.

A associação entre as combinações genotípicas dos polimorfismos (combinação dos genótipos) obtidas, e as características puberdade e expressão gênica do rebanho 1 foram analisadas da mesma forma como a análise dos genótipos. Entretanto nesta análise consideraram-se como efeito fixo as combinações genotípicas, conforme o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \beta_1(W_{ij} + \bar{W}) + \varepsilon_{ij} \quad (6)$$

em que,

$Y_{ij} =$ Puberdade ou valores de ΔCt observados;

$\mu =$ Constante inerente a todas as observações;

$G_i =$ Efeito fixo combinações genotípicas;

$\beta_1 =$ Coeficiente de regressão linear da característica em relação ao peso vivo à mensuração;

$W_{ij} =$ Peso animal à mensuração;

$\bar{W} =$ Média do peso animal à mensuração;

$\varepsilon_{ij} =$ Efeito aleatório residual, assumindo média 0 e variância σ^2_e.

Para associação das combinações genotípicas com a DEP para PP14 no rebanho 2 foram analisadas da mesma forma como a análise dos genótipos. Entretanto nesta análise consideraram-se como efeito fixo as combinações genotípicas, conforme o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij} \quad (7)$$

em que,

$Y_{ij} =$ Valores de DEP para PP14 observados;

$\mu =$ Constante inerente a todas as observações;

$G_i =$ Efeito fixo combinações genotípicas;

ε_{ij} = Efeito aleatório residual, assumindo média 0 e variância σ^2_e.

Uma segunda análise foi feita para ambos os rebanhos para estimar o efeito de substituição de haplótipos (combinação de alelos), como desvio do haplótipo de maior freqüência. O efeito de substituição foi estimado em função do número de combinações genotípicas (0,1 ou 2) de cada haplótipo. Ressalta-se que a probabilidade do efeito ser ou não significativo é resultante do desvio do haplótipo mais freqüente.

3.3.12 Reconstrução gênica

Para verificar uma possível presença de haplótipo de *Bos taurus* nos rebanhos Nelore estudados, decidiu-se estudar a reconstrução gênica das fêmeas deste estudo. Assim, os haplótipos gerados com a amplificação do gene da leptina pelo iniciador EX2 nas fêmeas deste estudo e as seqüências desta mesma região de *Bos taurus* (raça Hereford) com deposito no *GenBank* acesso NC_007302, e de *Bos indicus* (raça Sahiwal) acesso EU313203 foram utilizados para gerar a árvore gênica.

O programa PAUP, desenvolvido por David Swofford (Faculty of Florida State University (FSU) – School of Computational Sciences and Information Technology – CSIT, encontrado em <http://paup.csit.fsu.edu/>, foi utilizado para a construção da árvore gênica, utilizando o método UPGMA (agrupamento de pares não ponderados baseados na média aritmética).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão gênica

4.1.1 Avaliação da qualidade do RNA total

A eletroforese em gel de agarose 1 % permitiu verificar a integridade e qualidade do RNA total extraído, por meio da avaliação das bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S) (Figura 3), essas bandas devem estar integras e visíveis, sem a presença de “rastros” no gel. Após a verificação da qualidade do RNA total e quantificação em espectrofotômetro, procedeu-se a síntese do cDNA empregado na análise de expressão gênica.

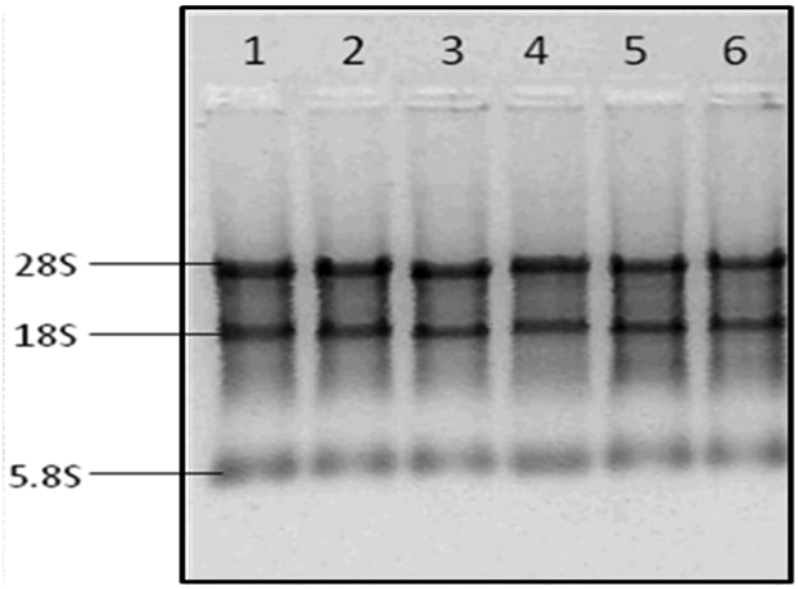

Figura 3 - Gel de agarose 1 % para visualização da integridade do RNA total. As canaletas 1 a 6 correspondem ao RNA total extraído do tecido adiposo

4.1.2 RT – PCR quantitativa

A RT – PCR quantitativa foi realizada com cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de amostra de tecido adiposo das novilhas do rebanho 1.

Uma condição importante para a PCR quantitativa é especificidade da amplificação do gene de interesse. Para garantir que apenas um produto estava sendo amplificada, a curva de dissociação foi analisada (Figura 4). Pode-se verificar que as amostras amplificadas desnaturaram nas mesmas temperaturas, 83 ºC para leptina e 88 ºC para o RPL19. Também apresentaram um único pico, não ocorrendo, portanto amplificações inespecíficas e nem a formação de dímeros de iniciadores (Figura 4).

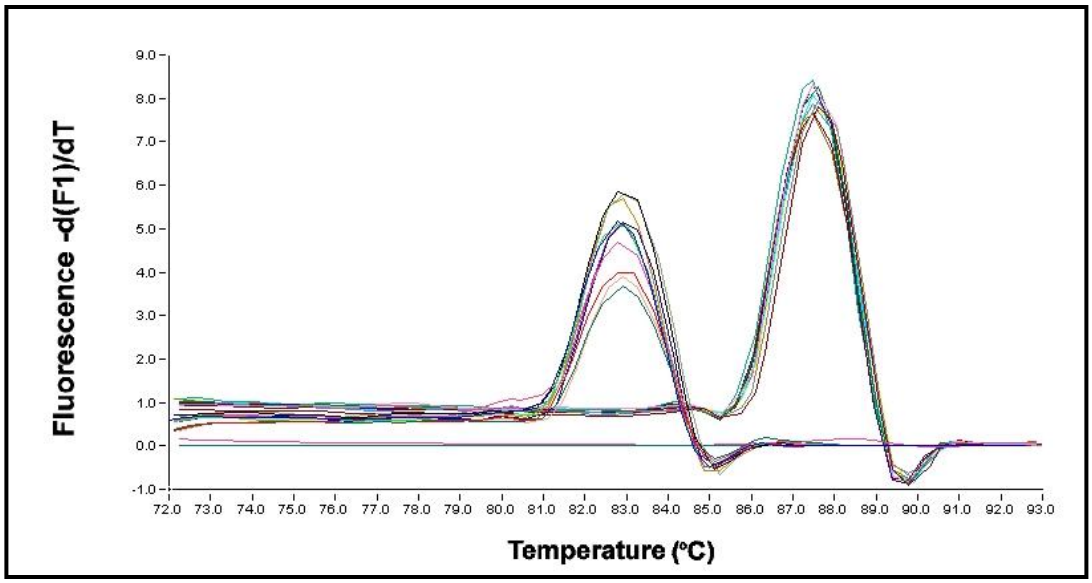

Figura 4 - Curva de dissociação das 28 amostras amplificadas para o gene da leptina e RPL19. O eixo Y apresenta a fluorescência e o eixo X apresenta à temperatura de dissociação dos genes. Cada linha representa uma amostra

4.1.3 Análise da expressão do gene da leptina

As curvas de diluição foram realizadas para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores. Com os resultados obtidos a partir das curvas de diluição (Figura 5) e utilizando a fórmula descrita por Rasmussen (2001) foi possível determinar os valores da eficiência de amplificação dos iniciadores, que foram de 1,9 para a leptina e 2,0 para o RPL19.

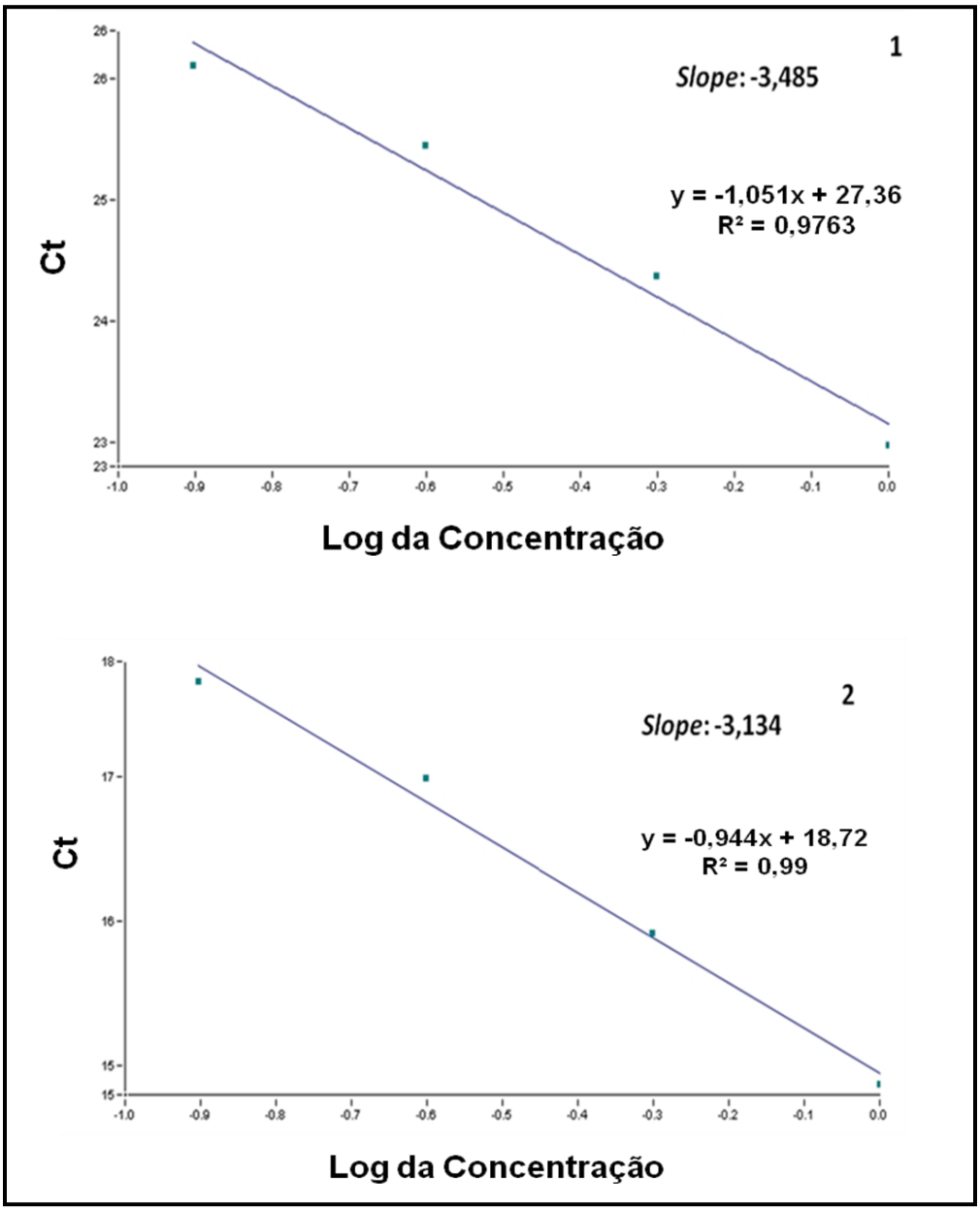

Figura 5 - Curva de diluição e valores de *slope* gerados na RT-PCR quantitativa. Leptina (1) e RPL19 (2)

As médias de Ct encontrados para a leptina com os tratamentos pré-púbere e púbere foi de 30,27 e 28,93 (Tabela 3), respectivamente. Os valores de Ct para o RPL19 entre os tratamentos, puberdade e pré-púberes, apresentaram baixa variação e não foram influenciados pelo tratamento, o que é esperado para um gene referência. Vandesompele et al. (2002) afirmam que o gene referência não deve variar

entre os tratamentos ou mesmo dentro do tratamento. A técnica de RT - PCR quantitativa é muito sensível e pequenas diferenças na quantidade de tecidos usada na extração de RNA, erros na quantificação e até mesmo quantidade ou qualidade de RNA usada na RT podem gerar resultados enganosos (VANDESOMPELE et al., 2002; HUGGETT et al., 2005; NOLAN et al., 2006).

Após a normalização da expressão da leptina pela expressão do gene referência RPL19, observou-se que a expressão da leptina foi detectada em média 1,4 ciclos antes nas novilhas púberes. A diferença na expressão relativa dos genes foi calculada utilizando a metodologia descrita por Pffafl (2001). Verificou-se que o gene da leptina foi 2,1 vezes mais expresso no tecido adiposo de novilhas que estavam na puberdade em relação às pré-púberes.

As médias dos valores de ΔCt foram de 11,92 e 10,52, respectivamente para pré-púbere e púbere. Utilizando os valores de ΔCt foi possível visualizar um efeito de tratamento na expressão da leptina no tecido adiposo das novilhas (*P*= 0,0337) (Tabela 3). O peso dos animais foi incluído no modelo como covariável e foi significativo a *P* < 0,06.

Tabela 3 - Médias dos valores de Ct e ΔCt obtidos para a leptina e RPL19

Tratamento	**Média Ct Leptina**	**Média Ct RPL19**	**Média ΔCt[1]**	**Valor *P***
Pré-púberes	30,27	18,29	11,92 (0,4378)	0,0337
Púberes	28,93	18,45	10,52 (0,4378)	

[1]Entre parênteses: erro padrão da média.

Os resultados deste estudo indicam maior expressão do gene da leptina no tecido adiposo subcutâneo das novilhas que estavam na puberdade quando comparado com as novilhas pré-púberes, sugerindo que a leptina exerça efeito sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário e conseqüentemente sobre a reprodução em bovinos. Esses resultados estão de acordo com os de Vaiciunas et al. (2008), que estudaram a expressão do mRNA da leptina em diferentes tecidos adiposos em novilhas Nelore pré-púberes e púberes, e também encontraram maior expressão do mRNA no tecidos adiposos das novilhas púberes.

O início da puberdade é caracterizado por uma maior freqüência e amplitude dos pulsos de GnRH, o que estimula um aumento nos pulsos de LH e sua posterior secreção (WILLIAMS et al., 2002; ZIEBA et al., 2005; REECE, 2006). Este início sofre influencia de vários fatores, entre eles estão à idade, peso e alimentação (REECE, 2006; ZIEBA et al., 2005). A idade à primeira ovulação de novilha zebu criada a pasto ocorre em média entre os 22 e 36 meses e com peso médio em torno de 300-350 kg (PEREIRA 2000; SOUZA et al., 1995). A média de idade das novilhas utilizadas neste estudo era de 25 meses, todas eram do mesmo grupo contemporâneo, nascidas entre os meses de outubro-novembro de 2004, possuíam pesos semelhantes, em torno de 300 kg e recebiam a mesma dieta. Assim pode-se inferir que neste estudo, esses fatores não exerceram influência sobre o fato de algumas novilhas entrarem na puberdade antes que outras.

A administração exógena de leptina para ratos inférteis foi capaz de restaurar a função dos órgãos reprodutivos e reverter à infertilidade (CHEHAB et al., 1996). Em ratos normais, o tratamento com leptina acelerou a abertura vaginal, maturação dos tecidos reprodutivos e o início do ciclo estral (CHEHAB et al., 1997; AHIMA et al., 1997). Porém em novilhas pré-púberes bem nutridas, a administração de altos níveis de leptina recombinante foi incapaz de acelerar o início da puberdade (MACIEL et al., 2004a) ou mesmo aumentar a secreção de LH pela hipófise (ZIEBA et al., 2004; MACIEL et al., 2004a).

Os resultados de Zieba et al., 2004 e Maciel et al., 2004a foram obtidos utilizando novilhas F1 do cruzamento de Hereford x Brahman, essa diferença na subespécie utilizada, aliada ao fato que esses animais estavam bem nutridos podem ter contribuído para os resultados desses autores. Pois em novilhas sob restrição alimentar, a administração de leptina exógena preveniu a redução das freqüências dos pulsos de GnRH e LH pela hipotálamo e hipófise, respectivamente, além de aumentar os níveis desses hormônios (MACIEL et al., 2004b).

Em países do hemisfério norte, geralmente após o desmame, a bezerra é confinada, o que difere do sistema de criação brasileiro onde os animais são criados a pasto e durante o período crítico do seu crescimento sofrem os efeitos da seca. Essas discrepâncias nos sistemas de criação podem justificar os resultados encontrados no

presente estudo, em que a maior expressão do mRNA de leptina foi um dos fatores para o inicio da puberdade. Novilha Nelore com maior expressão do mRNA da leptina no tecido adiposo subcutâneo entram na puberdade antes que aquelas com menores expressão.

4.2 Polimorfismos

4.2.1 Avaliação da qualidade do DNA total

Para se identificar polimorfismos no gene da leptina e verificar a associação desses polimorfismos com a puberdade e a expressão do gene da leptina nas novilhas do rebanho 1 e também com os valores de alta e baixa DEP para PP14 no rebanho 2 o DNA animal foi extraído.

No rebanho 1, o DNA foi extraído de 27 novilhas. Pois durante a extração de RNA usou-se todo o tecido disponível de uma das amostras. Utilizando-se então 14 fêmeas no grupo pré-púbere e 13 no grupo de púberes para a detecção de polimorfismos. Já para o rebanho 2 foram utilizadas 48 novilhas para o grupo de alta DEP para PP14 e 48 para o grupo de baixa DEP para PP14.

Após a extração, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % para verificar a integridade do DNA extraído (Figura 6). A concentração foi determinada por espectofotometria e as amostras foram diluídas para 20 ng/µL.

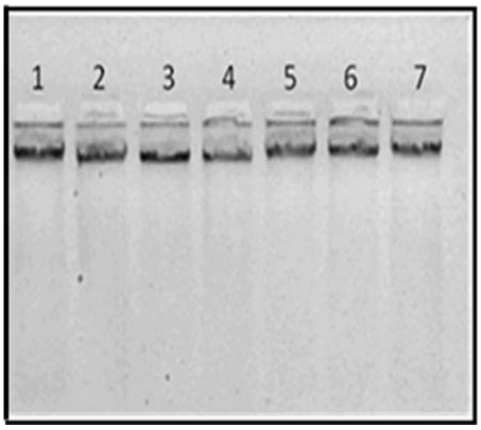

Figura 6 - Gel de agarose 1 % para visualização da integridade do DNA. As canaletas 1 a 7 correspondem ao DNA extraído

4.2.2 Desenho de iniciadores

Foram desenhados 3 pares de iniciadores para amplificar o gene da leptina. O primeiro, denominado EX2, flanqueia o final do intron 1, todo exon 2 e o início do intron 2, compreendendo uma região de 715 pb. O segundo, denominado IN2, está localizado no intron 2, flanqueando uma região de 784 pb. O terceiro flanqueia o final do intron 2 e parte do exon 3, tendo 852 pb (Figura 7).

Para a escolha das regiões a serem amplificadas deu-se preferência pela região codificadora do gene, assim todo o exon 2 e a parte codificadora do exon 3 foram estudadas. O intron 2 foi escolhido por estar separando o exon 2 e 3 e na literatura já estar descrito que SNPs encontrados nesta região teriam associação com características econômicas em animais de raças taurinas (LIEFERS et al., 2002, 2003; ALMEIDA et al., 2003; KULIG et al., 2009).

Outros 2 iniciadores foram desenhados para amplificar partes no promotor do gene, denominados PLEP1, PLEP2. O PLEP1 flanqueia uma região de 675 pb, o PLEP2 flanqueia uma região no final do promotor de 605 pares de base. Um terceiro iniciador, o PLEP3, foi selecionado do trabalho descrito por Liefers et al. (2005), e amplifica uma região de 523 pb (Figura 7). Essas regiões do promotor foram escolhidas baseados em relatos de Liefers et al. (2005), que estudando essas regiões do promotor

encontrou cerca de 20 polimorfismos, sendo que 14 destes estariam associados com a concentração plasmática da leptina no final da gestação de vacas Holandesas.

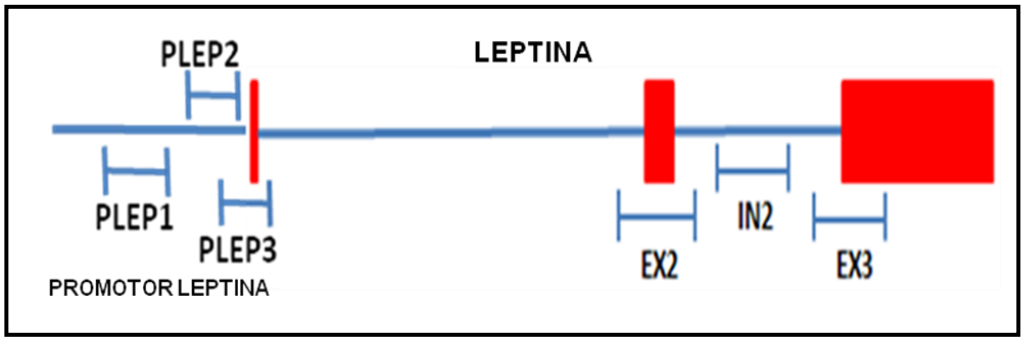

Figura 7 - Representação gene da leptina. As caixas vermelhas representam os três exons; a linha em azul representa os dois introns e também o promotor; os seguimentos em azul representam das regiões flanqueadas pelos iniciadores. A figura não esta desenhada na escala

4.2.3 Amplificação por PCR

As condições de amplificação do promotor e do gene da leptina pelos iniciadores EX2, IN2, EX3 e PLEP1 são as mesmas, conforme descrito no item 3.3.3. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1 % para visualização do tamanho, especificidade da amplificação e a integridade dos fragmentos amplificados (Figura 8).

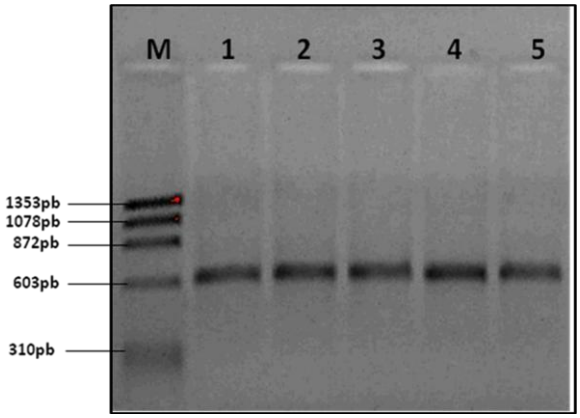

Figura 8 - Gel de agarose 1 % para visualização do fragmento amplificado pelo iniciador PLEP1. As canaletas 1 a 5 correspondem aos fragmentos gerados e o M ao marcador molecular Phi-X174 RF DNA/*Hae III* (*Invitrogen*)

O promotor de um gene é uma importante região na regulação da expressão gênica. Em bovinos, sítios reguladores como o TATA, Sp1 e C/EBF estão localizados no promotor do gene da leptina a cerca de 200 pares de base *upstream* do início do gene (TANIGUCHI et al., 2002). Liefers et al. (2005) e Adamowicz et al. (2006) relataram polimorfismos na parte final do promotor que influenciam a expressão gênica em diferentes estágios fisiológicos.

Duas tentativas de amplificação da região final do promotor da leptina foram feitas usando dois iniciadores diferentes: o PLEP2 e o PLEP3, este último retirado da literatura. Diferentes concentrações de $MgCl_2$ e temperaturas de anelamento que variavam de 45 a 65 ºC foram testadas, entretanto nenhum dos dois iniciadores gerou bandas específicas ou com o tamanho de fragmento esperado (Figuras 9 e 10). Isso pode ter ocorrido devido à formação de dímeros de *primers* e/ou diferença na temperatura de amplificação dos iniciadores.

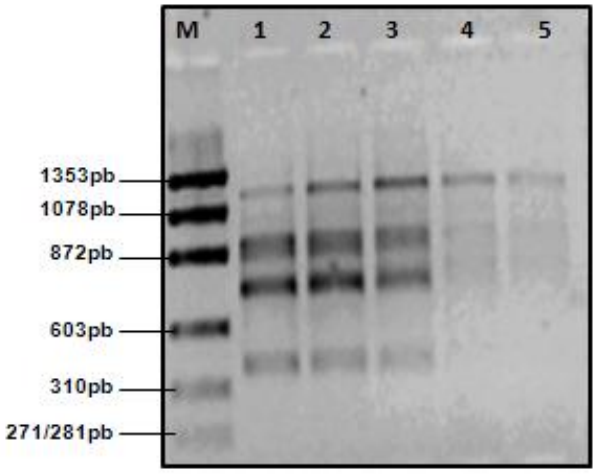

Figura 9 - Gel de agarose 1 % para visualização do fragmento amplificado pelo iniciador PLEP2. As canaletas 1 a 5 correspondem aos fragmentos gerados, o tamanho esperado era de 605 pb. O M é marcador molecular Phi-X174 RF DNA/*Hae III* (*Invitrogen*)

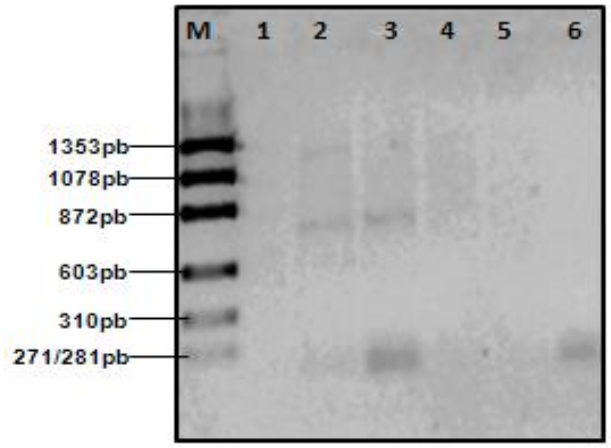

Figura 10 - Gel de agarose 1 % para visualização do fragmento amplificado pelo iniciador PLEP3. As canaletas 1 a 6 correspondem aos fragmentos gerados, o tamanho esperado era de 523 pb. O M é marcador molecular Phi-X174 RF DNA/*Hae III* (*Invitrogen*)

4.2.4 Purificação do produto da PCR

Após amplificação, os produtos da PCR foram purificados. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % para verificação da concentração final dos produtos purificados. Essa concentração é estimada pela intensidade das bandas formadas em comparação com um DNA padrão de tamanho e concentração conhecida. Utilizou-se como referência o marcador *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*). A Figura 11 corresponde ao gel do produto purificado.

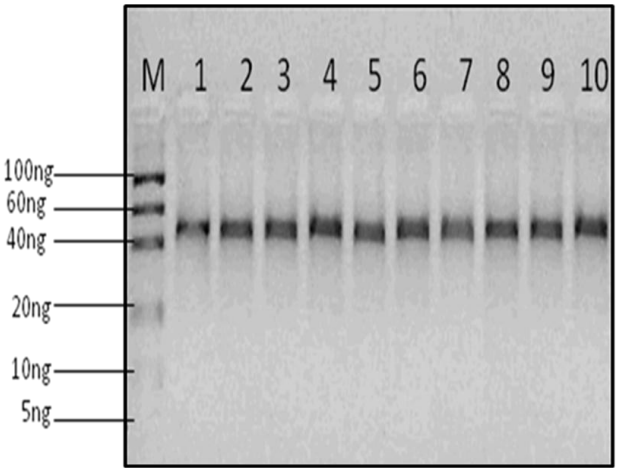

Figura 11 - Gel de agarose 1 % dos produtos da PCR purificados, iniciador IN2. As canaletas 1 a 10 correspondem às amostras e o M ao marcador *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*)

A purificação das amostras é um importante passo, pois ela remove iniciadores e dNTPs não incorporados, além de sais que possam estar presentes nas amostras. Caso esse passo não seja feito podem ocorrer interferências nas reações de seqüenciamento e assim diminuir a especificidade da reação.

4.2.5 Seqüenciamento, purificação e determinação das seqüências

Para a detecção de polimorfismos foram realizadas duas reações de seqüenciamento para todas as amostras, uma utilizando o iniciador direto e outra o reverso. Após a purificação da reação de seqüenciamento, esta foi aplicada no seqüenciador automático *ABI 3100 Applied Biosystems.*

O programa *Phred/Phrap/Consed* (Gordon et al., 1998; Ewing e Green, 1998) foi usado para montar e analisar as seqüências obtidas. A presença de dois picos sobrepostos no eletroferograma foi interpretada como um polimorfismo (heterozigoto). Na Figura 12 é observado o eletroferograma obtido e também os genótipos encontrados para o SNP g.11.805C>T. A nomenclatura utilizada para identificar os polimorfismos foi baseado nas recomendações para a descrição de variantes de seqüência descritas no site da *Human Genome Variation Society* (HGVS), disponível em <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html>.

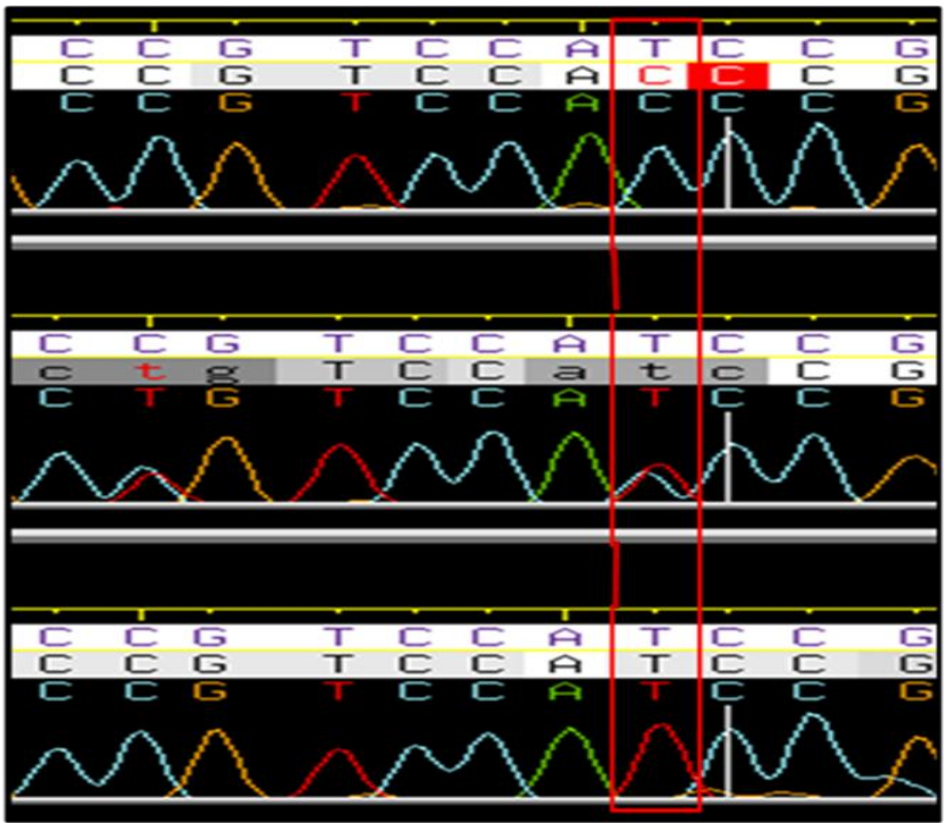

Figura 12 - Eletroferograma obtido no seqüenciamento. No detalhe os três genótipos (CC, CT e TT) correspondentes ao SNP encontrado na posição g.11805C>T

4.2.6 Detecção de polimorfismos no promotor e gene da leptina

Foram identificados 37 polimorfismos nas regiões analisadas do promotor e no gene da leptina. Destes 37 polimorfismos, 7 encontram-se no promotor do gene e os outros 30 foram localizados no gene. Uma deleção/ inserção de três pares de bases (GTT) na posição 1932 e dois novos polimorfismos (posição 1555 e 1661) foram encontrados no promotor do gene da leptina. Posições supracitadas referentes a *GenBank* acesso AB070368 (Tabela 4).

Dos 30 SNPs encontrados no gene, 23 SNPs estão em introns e outros 7 em exons. Dezessete novos polimorfismos foram encontrados no gene da leptina. Um desses novos polimorfismos (posição 12146) foi localizado no exon 2, todos os demais 16 foram encontrados em região de introns (11799, 11805, 11927, 11977, 12032, 12034, 12287, 12942, 13020, 13102, 13114, 13285, 13292, 13325, 13369, 13897). Os SNPs

identificados nos exons nas posições 12146, 14248, 14251, 14263 e 14347 substituem a terceira posição no códon, o que não altera a seqüência do aminoácido. Em contrapartida, o SNP 12168, encontrado no exon 2, substitui C/T na primeira posição no códon, o que altera o aminoácido de arginina para cisteína. Outro SNP localizado no exon 3, na posição 14091, altera C/T na segunda posição no códon, o que resulta na substituição da alanina para valina. A localização dos SNPs supracitados são em relação à seqüência do gene da leptina depositada no *GenBank* de acesso NC_007302 (Tabela 4).

Tabela 4 - Polimorfismos identificados no promotor e no gene da leptina

(Continua)

Gene	Polimorfismo[1]	Seqüência	Variação	Proteína	Ref ID NCBI[2]
Promotor	1540	TTA**A**CTG[34]	A/G	_	_
	1545	TGC**A**GCA[34]	A/G	_	_
	1555	GGG**A**CCC	A/G	_	_
	1661	TTA**T**GAA	T/C	_	_
	1932	TTA**GTT**GTT[4]	del/GTT	_	_
	2033	CTT**C**AAT[34]	C/T	_	_
	2095	TTT**A**AAA[3]	A/T	_	rs29004468
Intron 1	11799	CGC**C**GTC	C/T	_	_
	11805	CCA**C**CCG	C/T	_	_
	11927	ATT**G**TCT	G/A	_	_
	11966	TCT**C**GTT	C/T	_	rs29004484
	11977	TCC**G**CAT	G/A	_	_
	11989	GAC**G**TGG	G/C	_	rs29004485
	12032	GAT**C**GAC	C/T	_	_
	12034	TCG**A**CGA	A/G	_	_
Exon 2	12146	GTC**T**TAC	T/C	51Ser>Ser	_
	12168	ATC**C**GCA	C/T	25 Arg>Cys	rs29004488
Intron 2	12287	GGG**G**GAC	G/A	_	_
	12827	AAA**G**TGG	G/A	_	rs29004499
	12942	TGT**T**ATT	T/C	_	_
	13020	ACC**G**TCT	G/A	_	_

Tabela 4 - Polimorfismos identificados no promotor e no gene da leptina

(Conclusão)

Gene	Polimorfismo[1]	Seqüência	Variação	Proteína	Ref ID NCBI[2]
Intron 2	13048	AGA**C**CTT	C/T	_	rs29004501
	13102	GTC**T**TCA	T/G	_	_
	13114	TCT**T**CAT	T/C	_	_
	13252	TGC**G**TGG	G/T	_	rs29004502
	13275	CCA**C**ATC	C/T	_	rs29004503
	13285	TGA**C**CAC	C/T	_	_
	13292	TCT**A**TAT	A/G	_	_
	13325	AGA**G**CAG	G/A	_	_
	13369	AGT**G**TCT	G/A	_	_
	13848	CAC**G**TGG[5]	G/A	_	_
	13897	GGA**G**GAA	G/A	_	_
Exon 3	14091	TGG**C**GAT	C/T	80 Ala>Val	rs29004508
	14248	GGG**C**GTT	C/T	132 Gly>Gly	rs29004509
	14251	CGT**T**GTC	T/C	133 Val>Val	rs29004510
	14263	AGC**T**TCC	T/C	137 Ala>Ala	rs29004511
	14347	TCC**C**GGG	C/T	165 Pro>Pro	rs29004512

[1]Posição do polimorfismos no promotor é em relação à seqüência do *GenBank* acesso AB070368 e da leptina a seqüência do *GenBank* acesso NC_007302; [2]Referente SNP Cluster Report no NCBI; [3]Liefers et al. (2005); [4]Chung et al. (2008); [5]Lien et al. (1997).

O número de animais encontrados por genótipos e as freqüências genotípicas dos polimorfismos identificados no rebanho 1 são apresentados nos anexos A e B. As freqüências alélicas encontradas foram semelhantes em ambos os grupos no rebanho 1, exceto o SNP g.11805C>T, identificado no intron 1, que apresentou freqüências alélicas diferentes entre os grupos. O alelo T deste SNP teve uma freqüência de 14,29 % entre as pré-púberes e de 23,08 % entre as púberes (Tabela 5). Praticamente todos os SNPs identificados no rebanho 1 encontravam-se fixados nesta população, com exceção dos SNPs g.11805C>T e do c.12168C>T, identificado exon 2, os quais tiveram freqüências alélicas entre seus alelos maiores que 15%. Os polimorfismos encontrados no promotor e no gene da leptina e as freqüências alélicas de cada tratamento no rebanho 1 são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Freqüências alélicas dos polimorfismos encontrados no promotor e no gene da leptina no rebanho 1 em ambos os tratamentos

(Continua)

Gene	Posição[1]	Variação	Freqüência Pré-púbere	Freqüência Púbere
Promotor	g.1540A>G	A/G	96,43%A:3,57%G	92,31%A:7,69%G
	g.1545A>G	A/G	96,43%A:3,57%G	92,31%A:7,69%G
	g.1555A>G	A/G	89,29%A:10,71%G	92,31%A:7,69%G
	g.1661T>C	T/C	92,86%T:7,14%C	96,15%T:3,85%C
	g.1932del/ins(GTT)	del/GTT	89,29%del:10,71%GTT	92,31%del:7,69%GTT
	g.2033C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	92,31%C:7,69%T
	g.2095A>T	A/T	89,29%A:10,71%T	92,31%A:7,69%T
Intron 1	g.11799C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	84,62%C:15,38%T
	g.11805C>T	C/T	85,71%C:14,29%T	76,92%C:23,08%T
	g.11927G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	84,62%G:15,38%A
	g.11966C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	92,31%C:7,69%T
	g.11977G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	84,62%G:15,38%A
	g.11989G>C	G/C	89,29%G:10,71%C	92,31%G:7,69%C
	g.12032C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	84,62%C:15,38%T
	g.12034A>G	A/G	89,29%A:10,71%G	84,62%A:15,38%G
Exon 2	c.12146T>C	T/C	89,29%T:10,71%C	84,62%T:15,38%C
	c.12168C>T	C/T	78,57%C:21,43%T	76,92%C:23,08%T
Intron 2	g.12287G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	84,62%G:15,38%A
	g.12827G>A	G/A	96,43%G:3,57%A	92,31%G:7,69%A
	g.12942T>C	T/C	89,29%T:10,71%C	88,46%T:11,54%C
	g.13020G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	88,46%G:11,54%A
	g.13048C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	96,15%C:3,85%T
	g.13102T>G	T/G	96,43%T:3,57%G	92,31%T:7,69%G
	g.13114T>C	T/C	89,29%T:10,71%C	88,46%T:11,54%C
	g.13252G>T	G/T	85,71%G:14,29%T	88,46%G:11,54%T
	g.13275C>T	C/T	85,71%C:14,29%T	88,46%C:11,54%T
	g.13285C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	88,46%C:11,54%T
	g.13292A>G	A/G	89,29%A:10,71%G	88,46%A:11,54%G
	g.13325G>A	G/A	96,43%G:3,57%A	92,31%G:7,69%A

Tabela 5 - Freqüências alélicas dos polimorfismos encontrados no promotor e no gene da leptina no rebanho 1 em ambos os tratamentos

(Conclusão)

Gene	Posição[1]	Variação	Freqüência Pré-púbere	Freqüência Púbere
Intron 2	g.13369G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	88,46%G:11,54%A
	g.13848G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	88,46%G:11,54%A
	g.13897G>A	G/A	89,29%G:10,71%A	88,46%G:11,54%A
Exon 3	c.14091C>T	C/T	96,43%C:3,57%T	96,15%C:3,85%T
	c.14248C>T	C/T	85,71%C:14,29%T	88,46%C:11,54%T
	c.14251T>C	T/C	89,29%T:10,71%C	88,46%T:11,54%C
	c.14263T>C	T/C	89,29%T:10,71%C	88,46%T:11,54%C
	c.14347C>T	C/T	89,29%C:10,71%T	88,46%C:11,54%T

[1]Posição do polimorfismos no promotor é em relação à seqüência do *GenBank* acesso AB070368 e da leptina a seqüência do *GenBank* acesso NC_007302.

No rebanho 2, somente os polimorfismos encontrados na região amplificada pelo iniciador EX2 foram estudados. Inicialmente a proposta deste estudo era estudar somente o rebanho 1. Entretanto, decidiu-se acrescentar outros animais ao estudo e assim testar uma possível associação de polimorfismos no gene da leptina com a precocidade sexual em Nelore. Devido a falta de tempo para estudar todos os polimorfismos encontrados previamente, no rebanho 2 decidiu-se estudar somente aqueles encontrados na região do gene amplificada pelo iniciador EX2. Essa decisão foi tomada, pelo fato de que a maioria dos polimorfismos encontrados anteriormente estava praticamente fixados no rebanho 1, com exceção dos SNPs g.11805C>T e c.12168C>T.

Os mesmos polimorfismos encontrados no rebanho 2 foram identificados no rebanho 1 na região flanqueada pelo iniciador EX2. Assim como no rebanho 1, no rebanho 2, a maioria dos SNPs encontrados estavam praticamente fixados (Tabela 6). Somente os SNPs g.11805C>T e o c.12168C>T, respectivamente para os tratamentos de alta e baixa DEP para PP14, apresentaram freqüências maiores de 10 % entre seus alelos em um dos grupos (Tabela 6). O número de animais encontrado por genótipo e as freqüências genotípicas encontradas para esse rebanho estão descrita no anexo C.

Tabela 6 - Freqüências alélicas dos polimorfismos encontrados no gene da leptina na região amplificada pelo iniciador EX2 nas fêmeas do rebanho 2

Gene	Posição[1]	Variação	Freqüência Baixa PP14	Freqüência Alta PP14
Intron 1	g.11799C>T	C/T	95,83%C:4,17%T	94,79%C:5,21%T
	g.11805C>T	C/T	91,67%C:8,33%T	89,58%C:10,42%T
	g.11927G>A	G/A	95,83%G:4,17%A	94,79%G:5,21%A
	g.11966C>T	C/T	92,71%C:7,29%T	98,96%C:1,04%T
	g.11977G>A	G/A	95,83%G:4,17%A	94,79%G:5,21%A
	g.11989G>C	G/C	92,71%G:7,29%C	98,96%G:1,04%C
	g.12032C>T	C/T	95,83%C:4,17%T	94,79%C:5,21%T
	g.12034A>G	A/G	95,83%A:4,17%G	94,79%A:5,21%G
Exon 2	c.12146T>C	T/C	95,83%T:4,17%C	94,79%T:5,21%C
	c.12168C>T	C/T	88,54%C:11,46%T	93,75%C:6,25%T
Intron 2	g.12287G>A	G/A	95,83%G:4,17%A	94,79%G:5,21%A

[1]A posição dos SNPs é em relação à seqüência do *GenBank* acesso NC_007302; [2]A freqüência alélica apresentada é do nucleotídeo consenso.

Os valores de heterozigosidade, de maneira geral, foram baixos tanto para o rebanho 1 como para o 2. Somente os SNPs g.11805C>T e o c.12168C>T apresentaram valores um pouco mais alto que os demais para heterozigosidade no rebanho 1. No rebanho 2, praticamente todos os SNPs apresentaram valores extremamente baixos para heterozigose (Tabela 7). É interessante observar que os resultados obtidos para o rebanho 2 apontam que essa população encontra-se com uma baixa freqüência de indivíduos heterozigotos.

De modo geral, as estimativas do conteúdo polimórfico (PIC) demonstram que os polimorfismos encontrados no rebanho 1 e 2 são pouco informativos para a dedução do genótipo parental. De acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), somente os SNPs g.11805C>T e o c.12168C>T mostraram-se razoavelmente informativos no rebanho 1 (Tabela 7).

Tabela 7 - Estimativas de heterozigosidade (HET) e conteúdo de informação polimórfica (PIC)

Polimorfismo	HET	PIC	HET	PIC
	Rebanho 1		Rebanho 2	
g.1540A>G	0,111	0,099	-	-
g.1545A>G	0,111	0,099	-	-
g.1555A>G	0,185	0,154	-	-
g.1661T>C	0,111	0,099	-	-
g.1932del/ins(GTT)	0,185	0,154	-	-
g.2033C>T	0,185	0,154	-	-
g.2095A>T	0,185	0,154	-	-
g.11799C>T	0,185	0,200	0,094	0,085
g.11805C>T	0,296	0,256	0,167	0,155
g.11927G>A	0,185	0,200	0,094	0,085
g.11966C>T	0,185	0,154	0,042	0,077
g.11977G>A	0,185	0,200	0,094	0,085
g.11989G>C	0,185	0,154	0,042	0,077
g.12032C>T	0,185	0,200	0,094	0,085
g.12034A>G	0,185	0,200	0,094	0,085
c.12146T>C	0,185	0,200	0,094	0,085
c.12168C>T	0,222	0,286	0,135	0,148
g.12287G>A	0,185	0,200	0,094	0,085
g.12827G>A	0,111	0,099	-	-
g.12942T>C	0,222	0,178	-	-
g.13020G>A	0,222	0,178	-	-
g.13048C>T	0,148	0,128	-	-
g.13102T>G	0,111	0,099	-	-
g.13114T>C	0,222	0,178	-	-
g.13252G>T	0,259	0,200	-	-
g.13275C>T	0,259	0,200	-	-
g.13285C>T	0,222	0,178	-	-
g.13292A>G	0,222	0,178	-	-
g.13325G>A	0,111	0,099	-	-
g.13369G>A	0,222	0,178	-	-
g.13848G>A	0,222	0,178	-	-
g.13897G>A	0,222	0,178	-	-
c.14091C>T	0,074	0,069	-	-
c.14248C>T	0,259	0,200	-	-
c.14251T>C	0,222	0,178	-	-
c.14263T>C	0,222	0,178	-	-
c.14347C>T	0,222	0,178	-	-

4.2.7 Dados fenotípicos para DEP para PP14

A média de valor para o grupo de alta DEP para PP14 foi de +28,34, sendo que o menor valor observado foi de +26,73 e o maior foi de +30,98. O valor médio do grupo de baixa DEP para PP14 foi de -8,73, o menor valor observado foi de -14,02 e o maior foi de -5,34.

4.2.8 Análise dos polimorfismos

Testes de associação entre os polimorfismos encontrados e a puberdade e expressão da leptina no rebanho 1 e entre os polimorfismos e os valores de alta e baixa DEP para PP14 no rebanho 2 foram realizados. Nenhum associação ($P \geq 0,05$) entre os polimorfismos e as características estudadas foi encontrada (Tabela 8). Na análise realizada para o rebanho 1, o peso dos animais foi incluído no modelo como covariável, e foi significativo a ($P<0,05$) quando os polimorfismos foram associados com a expressão do gene da leptina (ΔCt), não sendo significativo na análise da puberdade (PUB).

Tabela 8 - Valores das probabilidades associadas ao efeito do polimorfismo sobre as características estudadas no rebanho 1 e 2

Efeito	Rebanho 1		Rebanho 2
Polimorfismo	PUB (valor *P*)	ΔCt (valor *P*)	DEP PP14 (valor *P*)
g.1540A>G	0,5158	0,7293	-
g.1545A>G	0,5158	0,7293	-
g.1555A>G	0,6986	0,4516	-
g.1661T>C	0,6147	0,6472	-
g.1932del/ins(GTT)	0,6986	0,4516	-
g.2033C>T	0,6986	0,4516	-
g.2095A>T	0,6986	0,4516	-
g.11799C>T	0,9493	0,5512	0,6316
g.11805C>T	0,9669	0,2109	0,5907
g.11927G>A	0,9493	0,5512	0,6316
g.11966C>T	0,6986	0,4516	0,2108
g.11977G>A	0,9493	0,5512	0,6316
g.11989G>C	0,6986	0,4516	0,2108
g.12032C>T	0,9493	0,5512	0,6316
g.12034A>G	0,9493	0,5512	0,6316
c.12146T>C	0,9493	0,5512	0,6316
c.12168C>T	0,5834	0,3248	0,4128
g.12287G>A	0,5158	0,7293	0,6316
g.12827G>A	0,9324	0,2699	-
g.12942T>C	0,9324	0,2699	-
g.13020G>A	0,3509	0,4332	-
g.13048C>T	0,5039	0,2442	-
g.13102T>G	0,9324	0,2699	-
g.13114T>C	0,7763	0,8311	-
g.13252G>T	0,7763	0,8311	-
g.13275C>T	0,7763	0,8311	-
g.13285C>T	0,9324	0,2699	-
g.13292A>G	0,9324	0,2699	-
g.13325G>A	0,5039	0,2442	-
g.13369G>A	0,9324	0,2699	-
g.13848G>A	0,9324	0,2699	-
g.13897G>A	0,9324	0,2699	-
c.14091C>T	0,9934	0,7521	-
c.14248C>T	0,7433	0,4986	-
c.14251T>C	0,9324	0,2699	-
c.14263T>C	0,9324	0,2699	-
c.14347C>T	0,9324	0,2699	-

Vários polimorfismos têm sido descritos no gene e no promotor do gene da leptina nos últimos anos (POMP et al., 1997; LIEN et al., 1997; KONFORTOV et al., 1999; LIEFERS et al., 2005). Grande parte destes estudos é de associação dos polimorfismos com características de carcaça, como deposição de gordura subcutânea e intramuscular ou ainda com ganho médio de peso diário (SCHENKEL et al., 2005; NKRUMAH et al., 2006; KULIG et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Este estudo é uma caracterização inicial na raça Nelore. Os resultados apresentados são os primeiros sobre a associação de polimorfismos no promotor e no gene da leptina com a puberdade, expressão do gene no tecido adiposo subcutâneo de novilhas e valores de alta e baixa DEP para PP14 em Nelore.

Trinta e sete polimorfismos foram identificados. Nenhum relato foi encontrado na literatura para 19 destes, o que sugere que esse seja o primeiro estudo a reportar esses polimorfismos. Na seqüência de 675 pb amplificada no promotor do gene da leptina no rebanho 1, encontrou-se 7 polimorfismos, destes, 6 eram SNPs e um uma deleção/inserção de 3 bases. Em média foram identificados um polimorfismos a cada 96,4 bp. Liefers et al. (2005), encontraram 20 SNPs em uma região de 1600 pb no promotor do gene da leptina, um SNP a cada 80 pb. Uma média parecida foi encontrada por Chung et al. (2008), que relataram um SNP a cada 81,5 pb no promotor do gene da leptina.

De um modo geral, as freqüências alélicas encontradas neste estudo divergem das freqüências relatadas na literatura consultada. Silva (2008), estudando o SNP g.1540A>G (equivalente ao SNP -1457) em Nelore relatou freqüência alélica de 0,77 para o alelo A e de 0,23 para o alelo G. Em vacas Holandesas, Liefers et al. (2005), encontraram freqüências alélicas de 0,54 para o alelo A e de 0,46 para o G. Tanto nos relatos da literatura como no presente estudo houve maior freqüência do alelo A (Tabela 5), entretanto a freqüência deste alelo foi bem superior na raça Nelore quando comparada com a freqüência descrita na raça Holandesa.

Em Nelore, o alelo A foi associado com aumento da espessura de gordura subcutânea, animais com genótipos AA e AG tiveram maior espessura que animais portadores do GG (SILVA, 2008). Em vacas Holandesas, o genótipo AG foi favorável ao aumento da concentração plasmática de leptina no final da gestação. Esse genótipo

também apresentou influência positiva na primeira atividade luteal pós-parto e no peso vivo da vaca na primeira semana de lactação (LIEFERS et al., 2005). No presente estudo somente 3 novilhas apresentavam o genótipo AG, todas as demais eram AA (Anexo A). Essa baixa freqüência do alelo G na população pode ter contribuído para que nenhum efeito fosse encontrado.

Na seqüência *GenBank* acesso AB070368 do promotor do gene da leptina de bovinos *Bos taurus* (raça não divulgada), depositada por Taniguchi et al. (2002), existe uma deleção de um G na posição 1798. Essa deleção não foi encontrada nas novilhas Nelore deste estudo, o que concorda com Liefers et al. (2005) e com Chung et al. (2008), que também não encontraram essa deleção na seqüência de bovinos Holandeses e nem na seqüência da raça coreana Hanwoo (*Bos taurus*), respectivamente. O que sugere que essa deleção possa ser específica do (s) animal (s) utilizadas no estudo de Taniguchi et al. (2002).

No presente estudo, foi encontrada a inserção das bases GTT em 5 animais, 3 pré-púberes e 2 púberes (Anexo A). Chung et al. (2008) seqüenciaram o promotor do gene da raça coreana Hanwoo (*Bos taurus*) e relataram a deleção de três pares de base, os SNPs g.1932del(G), g.1933del(T) e g.1934del(T) (equivalente ao g.1932ins/del(GTT) do presente estudo). Essa deleção não foi encontrada por Liefers et al. (2005) na raça Holandesa e nem por Taniguchi et al. (2002) nos animais *Bos taurus* estudados (raça não divulgada). A freqüência alélicas e genotípicas encontrada para estes SNPs não foram divulgada no trabalho de Chung et al. (2008) e os autores também não estudaram a associação destes SNPs com nenhuma característica. Além do relato de Chung et al. (2008) e da seqüência de acesso DQ202319, depositada por esses autores no *GenBank*, nenhum outro relato sobre essa deleção foi encontrado na literatura, ou mesmo nas demais seqüências do promotor depositadas no *GenBank*.

Liefers et al. (2005) estudaram o SNP g.2033C>T (equivalente ao SNP -963, também conhecido por C963T) e relataram freqüências alélicas de 0,87 para C e de 0,33 para o T na raça Holandesa. Na raça Nelore, Silva (2008) encontrou freqüências de 0,98 para o alelo C e de 0,02 para o T, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde a freqüência do alelo C foi bem superior ao T (Tabela 5). Na raça Holandesa, o alelo T foi associado com maior ingestão de matéria

seca, balanço energético positivo e concentração plasmática da leptina no final da gestação. Esse alelo também foi associado negativamente com primeira atividade luteal pós-parto em vacas Holandesas (LIEFERS et al., 2005). Silva (2008) relatou que o alelo T foi favorável ao aumento da área de olho de lombo em Nelore. No presente estudo nenhuma associação foi encontrada entre esse SNP e a puberdade ou expressão do gene da leptina, isso pode ter ocorrido devido à quantidade reduzida de animais utilizados, o que acarretou poucos animais com o alelo menos freqüente, o alelo T. Nenhum animal era homozigoto TT, somente 5 animais possuíam o genótipo CT, todos os outros eram homozigotos CC (Anexo A). Esses 5 animais que tinham o genótipo CT, eram os mesmo que possuíam a inserção das bases GTT na posição 1932 do promotor.

Os SNPs g.1545A>G e o g.2095A>T, foram primeiramente relados por Liefers et al. (2005). O SNP g.1545A>G também foi encontrado no estudo de Chung et al. (2008), entretanto as freqüências alélicas em ambos os estudos não foram divulgadas. Nenhum relato foi encontrado na literatura para os SNPs g.1555A>G e g.1661T>C, o que sugere seja esse o primeiro estudo a reportar esses dois SNPs no promotor da leptina.

No gene da leptina foram identificados 30 polimorfismos de uma única base (SNP) na seqüência de 2.352 pb no rebanho 1, em média 1 SNP a cada 78,4 pb. Na região estudada do rebanho 2 foi encontrado 1 SNP a cada 65 pb. Konfortov et al. (1999), encontraram 1 SNP a cada 89 pb em uma região de 1788 pb.

No intron 1, foram identificados 8 SNPs (Tabela 4). O SNP g.11805C>T, foi um dos dois SNPs que apresentaram a distribuição alélica mais equilibrada entre seus alelos, tanto no rebanho 1 como no rebanho 2. Porém nenhum relato foi encontrado na literatura sobre este SNP. Contudo, nenhuma associação deste SNP foi encontrada com as características estudadas (Tabela 8).

Konfortov et al. (1999), estudaram as freqüências alélicas dos SNPs g.11966C>T e g.11989G>C (equivalente aos SNPs 264 e 287, respectivamente) em *Bos indicus* e *Bos taurus* e seus cruzamentos. Neste estudo, as freqüências alélicas encontradas foram de 0,59 para o alelo C e G e de 0,41 para o T e C, respectivamente para os SNPs g.11966C>T e g.11989G>C. Na raça Holandesa, Liefers et al. (2003)

relataram freqüências de 0,67 C e de 0,33 T, e de 0,60 G e 0,40 C, respectivamente para os SNPs g.11966C>T e g.11989G>C. Lagonigro et al. (2003) encontraram freqüências alélicas de 0,65 C e 0,35 T para o SNP g.11966C>T e de 0,65 G e de 0,35 C para o SNP g.11989G>C, em F1 do cruzamento entre Charolesa x Holandesa. No presente estudo houve uma alta freqüência dos alelos C e G, respectivamente para os SNPs g.11966C>T e g.11989G>C na raça Nelore, o que difere dos resultados encontrados na literatura, onde é relatada distribuição alélica mais equilibrada entre os alelos dos dois SNPs. No rebanho 1, somente 5 animais apresentaram o genótipo CT e GC (Anexo B), os mesmo 5 que apresentaram a inserção das bases GTT no polimorfismo g.1932del/ins(GTT). No rebanho 2, a maior freqüência dos alelos T e C respectivamente para os SNPs g.11966C>T e g.11989G>C, foi encontrado nas fêmeas com baixa DEP para PP14 (Tabela 6).

No exon 2 foram identificados dois polimorfismos, o SNP c.12146T>C e o c.12168C>T em ambos os rebanhos. O SNP c.12146T>C, identificado neste estudo, não causa alteração do aminoácido e encontrava-se praticamente fixado nas duas populações estudas.

O SNP c.12168C>T, (equivalente ao c.73C>T, também conhecido por marcador E2FB) troca um C/T o que altera o aminoácido de arginina para cisteína. Konfortov et al. (1999) estudaram as freqüências alélicas desse SNP em raças zebuína, taurinas e em seus cruzamentos e relataram freqüências alélicas de 0,59 para C e de 0,41 para T. Lagonigro et al. (2003) identificaram freqüências alélicas de 0,65 para C e de 0,35 para T em F1 do cruzamento de Charolês x Holandês. No estudo com as raças britânicas (Angus e Hereford) e com continentais (Charolês e Simental), Buchanan et al. (2002) relataram freqüências alélicas de 0,42 C e de 0,58 T para Angus; 0,45 C e 0,55 T para Hereford; 0,66 C e 0,34 T para Charolesa e 0,68 C e 0,32 T para Simental. Em bovinos cruzados de raças britânicas e continentais, sem nenhuma participação de animais *Bos indicus,* Kononoff et al. (2005) encontraram freqüências alélicas de 0,5 para C e T. Schenkel et al. (2005) estudaram esse SNP em raças compostas, com maior contribuição das raças Angus, Charolês, Simental e Limousin e identificaram freqüências alélicas de 0,58 para o alelo C e de 0,42 para o alelo T. Freqüências semelhantes as citadas anteriormente foram encontrados por Almeida et al. (2007), que

relataram freqüências de 0,42 e 0,63 para o alelo C na raça Angus e Charolesa, respectivamente.

Buchanan et al. (2003) estudaram o SNP c.12168C>T em seis raças leiteiras e relataram freqüências alélicas de 0,38 C e de 0,62 T na raça Ayrshire; 0,54 C e 0,46 T na Holandesa; 0,55 C e 0,45 na Pardo Suíça; 0,89 C e 0,11 T na Canadienne; 0,94 C e 0,11 T na Guernsey e 0,47 C e 0,53 T na Jersey. Em outro estudo com a raça Holandesa foram encontradas freqüências de 0,67 para o alelo C e de 0,33 para o T (LIEFERS et al. 2003). Na raça Canchim, Santiago et al. (2008) relataram uma alta freqüência do alelo T, que foi de 0,84. Corva et al. (2009) encontraram freqüências alélicas de 0,7 para C e 0,3 para T em Brangus.

Estudando diversas raças zebuínas puras, Choudhary et al. (2005) encontraram somente o genótipo CC do SNP c.12168C>T nestes animais. Porém, na raça Nelore, a principal raça zebuína brasileira, Silva et al. (2008) encontrou freqüências alélicas de 0,94 para o alelo C e 0,06 para o T. Recentemente Souza et al. (2010) relataram freqüências alélicas de 0,88 para o alelo C e de 0,12 para o T na população de bovinos Nelores estudados. Assim como os relatos de Silva et al. (2008) e de Souza et al. (2010), no presente estudo com a raça Nelore a mutação C/T estava presente, tanto no rebanho 1 como no 2. Entretanto o alelo T se apresentou em uma freqüência muito baixa em ambos os rebanho (Tabelas 5 e 6) quando comparados com os resultados obtidos em raças européias.

Buchanan et al. (2002) verificaram que o alelo T foi relacionado com maior expressão do mRNA da leptina no tecido adiposo e também com maior gordura na carcaça. Buchanan et al. (2003) sugerem que os genótipos do SNP c.12168C>T da leptina podem desempenhar um papel importante na regulação da produção de leite e rendimento de proteína em vacas leiteiras. Os resultados obtidos por Buchanan et al. (2003) indicaram que o genótipo TT nestes animais está associado com aumento na produção de leite e rendimento de proteína. Entretanto, o alelo C foi associado com maior concentração de leptina no final da gestação e nos primeiros 5 dias de lactação em vacas Holandesas (LIEFERS et al., 2003), o que sugere que os efeitos deste SNP sejam influenciados pelo estado fisiológico animal.

Schenkel et al. (2005) relataram a associação deste SNP com rendimento de carne e rendimento de gordura. Os animais com alelo C apresentavam menos gordura e carcaças mais magras que animais com alelo T. Resultados semelhantes aos relatados por Corva et al. (2009), onde os animais com genótipo CT tiveram maior rendimento de carne que aqueles com o genótipo TT. Na raça Nelore, Silva (2008) não encontrou efeito do SNP com as características avaliadas. Entretanto, Souza et al. (2010) associaram os genótipos do SNP c.12168C>T com peso ao nascimento e espessura de toucinho, sendo que os animais com genótipo CC tiveram maior peso ao nascimento e os heterozigotos apresentaram menor espessura de toucinho que os demais genótipos. Contudo, outro estudo envolvendo o SNP c.12168C>T com espessura de gordura não encontrou associação deste SNP com a característica estudada na raça Canchim (SANTIAGO et al., 2008), resultados semelhantes aos de Lusk et al. (2007) que também não encontraram efeito desse SNP com deposição de gordura e nem com curvas de crescimento em bovinos cruzados de um rebanho comercial. Esse SNP também não teve efeito com a média de ganho de peso diário e desempenho reprodutivo em vacas Aberdeen Angus e Charolesa (ALMEIDA et al., 2007).

De acordo com os relatos encontrados na literatura, o alelo T parece ser favorável para as características de deposição de gordura e desfavorável para rendimento de carcaça, sendo o alelo C favorável para essa última. É interessante salientar que o alelo T é encontrado com maior freqüência nas raças taurinas e o alelo C nas raças zebuínas. Raças taurinas são caracterizadas por acumularem gordura e atingir a maturidade antes que raças zebuínas. Apesar do SNP c.12168C>T ter sido um dos dois polimorfismos que apresentaram as freqüências alélicas mais equilibradas entre os demais, nenhuma associação foi encontrado entre esse SNP e as características estudadas no rebanho 1 e no rebanho 2. É provável que a quantidade reduzida de bovinos utilizados tanto no rebanho 1 como no 2, aliado a baixa freqüência do alelo T (Tabela 5 e 6), nestas populações, tenha mascarado os resultados.

No intron 2, identificou-se 15 polimorfismos, todos os polimorfismos encontrados nesta região apresentavam-se praticamente fixados (Tabela 5 e 6). Deste 15 polimorfismos identificado, 10 não haviam sido reportados anteriormente. Segundo

Choudhary et al. (2005) embora variações nas regiões intrônicas não mudem a seqüência do aminoácido, polimorfismos em introns podem desempenhar um papel significativo, pois nestas regiões ocorrem a ligação de proteínas reguladoras durante a transcrição, o que mostra a importância de se buscar por polimorfismos em introns. Contudo, poucos relatos foram encontrados na literatura sobre os polimorfismos presentes no intron 2 da leptina, dos 15 identificados somente encontraram-se referências para 3.

Konfortov et al. (1999) estudaram a freqüência alélica do SNP g.12827G>A em raças taurinas e zebuínas e em seus cruzamento, e relataram freqüência de 0,95 para G e de 0,05 para A. Neste estudo, o alelo A também apresentou uma baixa freqüência, tanto no tratamento das pré-púbere como no púbere (Tabela 5).

O SNP g.13048C>T identificado no intron 2 (conhecido como LEP*Sau*3AI) também foi estudado por Konfortov et al. (1999). As freqüências alélicas encontradas foram de 0,75 para C e de 0,25 para T. Pomp et al. (1997) estudaram esse SNP em várias raças taurinas e em uma zebuína e o alelo C estava em maior freqüência na maioria delas. Apenas na raça Hereford em que foram encontradas freqüências alélicas de 0,5 para C e T, e na raça Brangus, onde foram identificados 0,6 de C e 0,4 de T, a distribuição alélica se apresentou mais equilibrada.

No estudo de Almeida et al. (2003) com a raça Brangus encontrou-se freqüências semelhantes aos de Pomp et al. (1997) para essa raça. Porém, Passos et al. (2007) também estudando a raça Brangus, identificaram freqüências alélicas de 0,91 para o C. Liefers et al. (2002, 2003) encontraram freqüências de 0,90 para C na raça Holandesa. Na raça Limousin, as freqüências foram de 0,81 para o C (KULIG et al., 2007). No presente estudo as freqüências alélicas foram similares aos de Liefers et al. (2002, 2003) e Passos et al. (2007), o alelo C se mostrou bem mais freqüente que o alelo T na raça Nelore (Tabela 5), e apenas 4 novilhas possuíam o genótipo CT. Todas as demais eram CC (Anexo B).

O genótipo CT do SNP g.13048C>T foi associado com maior concentração plasmática de leptina entre os dias 30 e 20 antes do parto na raça Holandesa (LIEFERS et al., 2003). Esse genótipo também foi associado favoravelmente

com maior produção de leite e conseqüentemente com maior produção de proteína e lactose. Entretanto, as porcentagens de proteína e lactose foram iguais entre os genótipos. As fêmeas com o genótipo CT também tiveram maior ingestão de alimentos e maior peso vivo nos primeiros 15 dias de lactação quando comparado com o genótipo CC na raça Holandesa (LIEFERS et al., 2002). Na raça Brangus novilhas com o genótipo CT apresentaram maior peso vivo ao primeiro parto. Contudo, este genótipo também foi associado com maior intervalo entre partos. Fêmeas com o genótipo CT pariram cerca de 80 dias depois que os demais genótipos (ALMEIDA et al., 2003). Nenhuma associação deste SNP com a puberdade e nem com a expressão da leptina no tecido adiposo subcutâneo no rebanho 1 foi encontrada no presente estudo, o que está de acordo com o relato de Passos et al. (2007) que também não encontraram associação do SNP com expressão da leptina no tecido adiposo em Brangus.

Chaudhary et al. (2005) em estudos realizados com o SNP g.13848G>A (equivalente ao SNP LEPBsaAI) em várias raças *Bos taurus* e *Bos indicus* e também no cruzamento Holandesa x Hariana, encontraram freqüências alélicas do alelo G de 0,76 na raça Jersey e no cruzamento Holandesa x Hariana, 0,82 para Holandesa, 0,66 na raça Hariana, 0,72 na raça Sahiwal, 0,75 na raça Gir e 0,71 na raça Nimari. Esse SNP primeiramente foi identificado por Lien et al. (1997) em uma raça de bovino norueguesa. Porém, neste estudo, as freqüências alélicas encontradas não foram divulgadas. Almeida et al. (2003) encontraram freqüências alélica de 0,58 de G e 0,42 de A na raça Brangus. Na raça Nelore, Souza et al. (2010) encontraram freqüências de 0,5 para o alelo G e A. As freqüências alélicas encontradas para a raça Nelore no presente estudo foram de 0,89 G para o grupo pré-púbere e de 0,88 G para o grupo de púberes o que divergem dos resultados obtidos por Souza et al. (2010) também com Nelore, o que sugere que possa haver uma força de seleção no rebanho 1 que esteja favorecendo o alelo G.

Esse polimorfismo foi associado com peso aos 210 dias na raça Nelore. O alelo A possui um efeito aditivo para essas características, pois animais com genótipo AA possuíam maior peso aos 210 dias e uma tendência de maior peso aos 550 dias e, conseqüentemente, maior peso vivo, quando comparado aos animais com genótipo AG e GG (SOUZA et al., 2010). Entretanto nenhuma relação foi encontrada entre os

genótipos do SNP g.13848G>A com intervalo entre partos e peso ao primeiro parto em vacas Brangus (ALMEIDA et al., 2003). No presente estudo nenhuma associação foi encontrada entre o SNP e as características puberdade e expressão gênica na raça Nelore. Isso pode ter ocorrido devido a baixa freqüência encontrada para o alelo A (Tabela 5).

Identificou-se 5 polimorfismos no exon 3, todos já haviam sido reportados anteriormente. O SNP c.14091C>T (conhecido por Ala80Val ou A59V), altera C/T o que resulta na substituição da alanina para valina. Entretanto a alanina e valina são aminoácidos com características semelhantes, ambos do grupo R não polares alifáticos, o que representa uma substituição conservada (BUCHAMAN et al., 2002).

Em estudos com o SNP c.14091C>T, Lagonigro et al. (2003) relataram freqüências de 0,54 para o C e de 0,46 para o T no F1 do cruzamento das raças Charolesa x Holandesa. Nkrumah et al. (2006) relataram freqüências de 0,25 para C e de 0,75 para T na raça Angus, Charolesa e seus cruzamentos. Na raça Holandesa Liefers et al. (2002, 2003) encontraram freqüências alélicas de 0,75 para o alelo C e de 0,25 para o T. Freqüências semelhantes ao da raça Holandesa foram relatadas na raça Limousin (KULIG et al., 2009). Almeida et al. (2003) encontraram freqüências alélicas de 0,85 para C e de 0,15 para T na raça Brangus. Estudando esse SNP na raça Nelore, Silva (2008) encontrou freqüências de 0,99 para C e de 0,01 para T, resultados semelhantes aos encontrados nas fêmeas Nelores estudadas no rebanho 1 neste trabalho, que apresentaram uma freqüência baixíssima do alelo T quando comparado com o C (Tabela 5), em ambos os grupos. Das 27 fêmeas estudadas, somente duas possuíam o genótipo CT. Todas as demais eram homozigotas CC (Anexo B). Esses resultados demonstram uma menor variabilidade do SNP c.14091C>T na raça Nelore quando comparados com animais taurinos.

O alelo T foi associado com maior porcentagem de lactose no leite (P<0,085) (LIEFERS et al., 2002), com maior concentração plasmática de leptina no final da gestação (LIEFERS et al., 2003). Kulig et al. (2009) relataram que bezerros Limousin com genótipo TT apresentaram maior peso aos 210 dias e também maior média de ganho de peso diário do que aqueles com genótipo CC. Nkrumah et al. (2006) também encontraram maior média de ganho de peso diários em animais que possuíam

o alelo T. Além disso, esse alelo foi associado com maior concentração plasmática de leptina, maior área de olho de lombo e gordura subcutânea. Entretanto, na raça Nelore não foi encontrada associação do SNP c.14091C>T com área de olho de lombo, nem com gordura subcutânea (SILVA, 2008). No entanto em Nelore, o alelo C foi favorável ao ganho de peso da desmama até os 18 meses (SILVA, 2008), diferindo dos resultados encontrados por Kulig et al. (2009) na raça Limousin e por NKrumah et al. (2006) na raça Angus, Charolesa e seus cruzamentos. É interessante salientar que na literatura consultada, o alelo T foi bem mais freqüente em animais taurinos que zebuínos. *Bos taurus* são caracterizados por acumular gordura e apresentar a puberdade mais precocemente que *Bos indicus*.

Outros 4 SNPs (c.14248C>T, c.14251T>C, c.14263T>C e c.14347C>T) foram identificados no Exon 3. Entretanto nenhum causa uma mutação missense (Tabela 4). Esses SNPs foram encontrados por Buchanan et al. (2002) em Angus, Charolesa e Hereford, e por Corva et al. (2009) em Brangus, porém nestes estudos não foi divulgado as freqüências alélicas, nem genotípicas encontradas e também não houve estudo de associação dos polimorfismos com nenhuma característica. Konfortov et al. (1999) estudaram as freqüências alélicas desses SNPs em *Bos indicus* e *Bos taurus* e seus cruzamentos. As freqüências alélicas relatadas foram de 0,75 C e de 0,25 T para o SNP c.14248C>T; 0,68 T e de 0,32 C para os SNPs c.14251T>C e c.14263T>C e de 0,68 para C e 0,32 T para o SNP c.14347C>T. Na raça Nelore, as freqüências dos alelos C, T, T e C, respectivamente para os SNPs c.14248C>T, c.14251T>C, c.14263T>C e c.14347C>T, foram bem superiores as dos alelos T, C, C e T (Tabela 5), o que difere dos resultados de Konfortov et al. (1999).

4.3 Combinações genotípicas e de haplótipos

Para a construção dos haplótipos do rebanho 1, os 37 polimorfismos encontrados nesta população foram utilizados e seguem a seguinte ordem: g.1540A>G; g.1545A>G; g.1555A>G; g.1661T>C; g.1932ins/del(GTT); g.2033C>T; g.2095A>T; g.11799C>T; g.11805C>T; g.11927G>A; g.11966C>T; g.11977G>A; g.11989G>C; g.12032C>T; g.12034A>G; c.12146T>C; c.12168C>T; g.12287G>A; g.12827G>A;

g.12942T>C; g.13020G>A; g.13048C>T; g.13102T>G; g.13114T>C; g.13252G>T; g.13275C>T; g.13285C>T; g.13292A>G; g.13325G>A; g.13369G>A; g.13848G>A; g.13897G>A; c.14091C>T; c.14248C>T; c.14251T>C; c.14263T>C; c.14347C>T. Para facilitar a entrada dos dados genotípicos dos animais no programa PHASE, os alelos do polimorfismo g.1932ins/del(GTT) foram nomeados de D e I, respectivamente para alelo deleção e alelo inserção.

Na construção dos haplótipos do rebanho 2, também todos os SNPs encontrados nesta população foram utilizados, na ordem que se segue: g.11799C>T; g.11805C>T; g.11927G>A; g.11966C>T; g.11977G>A; g.11989G>C; g.12032C>T; g.12034A>G; c.12146T>C; c.12168C>T; g.12287G>A.

Com o objetivo de facilitar o entendimento, o estudo será dividido em combinação genotípica (combinação dos genótipos) e haplótipos (combinação dos alelos).

4.3.1 Combinações genotípicas

As combinações genotípicas no rebanho 1 apresentaram 12 variações, enquanto que no rebanho 2 houve 6 variações. As freqüências das combinações genotípicas e a quantidade de animais por combinação dos rebanhos 1 e do rebanho 2 são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Freqüências das combinações genotípicas do rebanho 1 e 2

Rebanho 1			Rebanho 2		
Combinação	**Freq (%) [1]**	**N**	**Combinação**	**Freq (%) [1]**	**N**
Hap1xHap1	37,04	10	Hap1xHap1	76,04	73
Hap1xHap2	3,70	1	Hap1xHap2	4,17	4
Hap1xHap4	7,41	2	Hap1xHap3	7,30	7
Hap1xHap5	7,41	2	Hap1xHap4	9,37	9
Hap1xHap6	7,41	2	Hap2xHap2	2,08	2
Hap1xHap7	11,11	3	Hap3xHap3	1,04	1
Hap1xHap8	3,70	1			
Hap2xHap4	3,70	1			
Hap3xHap5	3,70	1			
Hap5xHap7	7,41	2			
Hap5xHap10	3,70	1			
Hap6xHap9	3,70	1			

[1] Freqüência das combinações genotípicas

As análises estatísticas não evidenciaram associação ($P \geq 0,05$) das combinações genotípicas do rebanho 1 com a puberdade, nem com a expressão da leptina. O peso foi usado como covariável e também não foi significativo (Tabela 10). Semelhantemente nenhuma associação foi encontrado entre os valores da DEP para PP14 com as combinações genotípicas no rebanho 2 (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise da associação da combinação genotípica com as características estudadas no rebanho 1 e 2

Efeito	PUB (valor *P*)	ΔCt (valor *P*)	DEP PP14 (valor *P*)
Rebanho 1			
Hap*Hap	0,9999	0,4853	
Peso	0,2419	0,2486	
Rebanho 2			
Hap*Hap			0,4942

Hap*Hap: combinação genotípica.

Liefers et al. (2005), estudando a combinação genotípica de vários polimorfismos encontrados no promotor do gene da leptina, encontrou efeito dessas combinações com concentração plasmática de leptina no final da gestação de vacas Holandesas. A combinação genotípica dos SNPs -105 e -197 (nomenclatura fornecida pelos autores, polimorfismos não estudados no presente estudo) identificados no promotor e o SNP c.14091C>T presente no exon 3 da leptina explicaram 13,5 % da variação da concentração plasmática da leptina no final da gestação. Outras combinações genotípicas estudadas também explicaram grande parte da variação na leptina. Os SNPs -147, -197 e -282 (polimorfismos não estudados no presente estudo) identificados no promotor explicaram 14,3 % da variação na concentração plasmática da leptina. As vacas com as combinações CT/AA/GT e CC/AC/GG tiveram alta concentração, enquanto que as com as combinações CT/AA/GG e TT/AA/GG apresentaram baixa concentração da leptina no final da gestação quando comparado com a média encontrada (LIEFERS et al., 2005).

A região do promotor onde foi descrito a maioria desses SNPs é muito próxima às regiões onde estão localizados os sítios reguladores TATA, Sp1 e C/EBF (TANIGUCHI et al., 2002) e alterações de nucleotídeos nesta região podem causar diferenças na expressão do gene da leptina (NELSON et al., 2001). Duas tentativas de amplificação nesta região foram feita neste estudo, mas infelizmente em nenhuma delas foi obtido o sucesso.

A combinação genotípica CT/CT dos SNPs g.13048C>T e c.14091C>T foi associada com maior ganho médio de peso diário que as combinações CC/CC e CC/CT

na raça Limousin, contudo nenhum efeito foi encontrada entre as características estudadas e esses SNPs quando analisados individualmente (KULIG et al., 2007).

No presente estudo nenhum efeito foi encontrado entre as combinações genotípicas e as características estudadas, assim como também não foi encontrado efeito individual de nenhum dos genótipos dos polimorfismos. Tanto no rebanho 1 como no rebanho 2, ocorreu uma alta freqüência das combinações genotípicas hap1xhap1 (Tabela 9), em relação às demais combinações estudadas. No rebanho 1, os 37 polimorfismos identificados foram utilizados para a construção genotípica e a alta quantidade de polimorfismo aliado ao pequeno número de bovinos estudados neste rebanho gerou um baixo número de novilhas por combinação. A metade das 12 combinações tinha apenas uma novilha (Tabela 9). Algo parecido ocorreu no rebanho 2. Das 96 fêmeas estudadas, 76 tinham a combinação hap1xhap1. Esse baixo número de bovinos por combinação pode ter contribuído para os resultados obtidos.

4.3.1 Haplótipos

No rebanho 1, foram identificadas 10 combinações de haplótipos, enquanto que no rebanho 2 houve 4 haplótipos. O haplótipo 1 mostrou-se em alta freqüência em ambos os rebanhos. No rebanho 2, 86 % das fêmeas possuíam pelo menos 1 cópia do haplótipo 1. As freqüências e o desvio padrão encontrado na construção dos haplótipos são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Freqüências dos haplótipos no rebanho 1 e 2

Haplótipo	Freq. (%) rebanho 1	Freq.(%) rebanho 2
Rebanho1		
1. AAATDCACCGCGGCATCGGTGCTTGCCAGGGGCCTTC	57,41	
2. AAATDCACCGCGGCATCGGTGCTTGCCAGGGGTCTTC	3,70	
3. AAATDCACCGCGGCATCGGTGTTTTTCAGGGGCCTTC	1,85	
4. AAATDCACTGCGGCATCGGTGCGTTTCAAGGGCCTTC	5,56	
5. AAATDCATTACAGTGCTAGCACTCGCTGGAAACTCCT	11,11	
6. AAACDCACCGCGGCATCGGTGTTTTTCAGGGGCCTTC	5,56	
7. AAGTITTCCGTGCCATTGGTGCTTGCCAGGGGCCTTC	9,26	
8. GGATDCACCGCGGCATCGATGCTTGCCAGGGGCCTTC	1,85	
9. GGATDCACCGCGGCATCGATGCTTGCCAGGGGCTTTC	1,85	
10. GGATDCATTACAGTGCTAATGCTTGCCAGGGGCCTTC	1,85	
Rebanho 2		
1. CCGCGGCATCG		86,46
2. CCGTGCCATTG		4,17
3. CTGCGGCATCG		4,69
4. TTACAGTGCTA		4,69

A substituição do haplótipo 1, o mais freqüente, pelos demais haplótipos encontrados na população do rebanho 1, não indicou nenhum efeito significativo ($P \geq 0,05$) de substituição de haplótipo com a puberdade ou expressão gênica nas novilhas estudadas (Tabela 12).

No rebanho 2, a substituição do haplótipo 1 pelo haplótipo 2, revelou uma associação sugestiva ($P=0,0923$) (Tabela 12), sugerindo que essa substituição possa estar contribuindo para a variação da DEP para PP14 nesta população. O haplótipo 2 tem efeito de -9,51 a DEP para PP14 em relação ao haplótipo 1, ou seja, às fêmeas com o haplótipo 2 tiveram em média -9,51 % nos valores de suas DEPs quando comparados as fêmeas com o haplótipo 1.

Tabela 12 - Resultado da análise do efeito de substituição dos haplótipos sobre as características estudadas no rebanho 1 e 2

Haplótipo	Puberdade (valor *P*)	ΔCt (valor *P*)	DEP PP14 (valor *P*)
Rebanho 1			
2. AAATDCACCGCGGCATCGGTGCTTGCCAGGGGTCTTC	0,7912	0,7605	
3. AAATDCACCGCGGCATCGGTGTTTTTCAGGGGCCTTC	0,9715	0,3042	
4. AAATDCACTGCGGCATCGGTGCGTTTCAAGGGCCTTC	0,5574	0,1192	
5. AAATDCATTACAGTGCTAGCACTCGCTGGAAACTCCT	0,8425	0,1256	
6. AAACDCACCGCGGCATCGGTGTTTTTCAGGGGCCTTC	0,9834	0,5914	
7. AAGTITTCCGTGCCATTGGTGCTTGCCAGGGGCCTTC	0,6711	0,5454	
8. GGATDCACCGCGGCATCGATGCTTGCCAGGGGCCTTC	0,9720	0,1678	
9. GGATDCACCGCGGCATCGATGCTTGCCAGGGGCTTTC	0,9720	0,4914	
10. GGATDCATTACAGTGCTAATGCTTGCCAGGGGCCTTC	0,9726	0,9103	
Peso	0,9251	0,1099	
Rebanho2			
2. CCGTGCCATTG			0,0923
3. CTGCGGCATCG			0,8237
4. TTACAGTGCTA			0,7137

P - probabilidade em relação ao desvio do haplótipo de maior freqüência de cada rebanho.

Schenkel et al. (2005), relataram que a combinação CCTT, respectivamente para os SNPs UAMS1, UASMS2 (ambos no promotor), Tyr7Phe (não estudados no presente no presente estudo) e c.12168C>T (localizados no exon 2), foi significativamente diferente das três combinações de haplótipos mais freqüentes para as características gordura, grau de gordura e carcaça magra. A substituição dos três haplótipo mais freqüentes pelo CCTT diminuiu significativamente a gordura e o grau de gordura em animais mestiços, de cruzamento de raças *Bos taurus*.

Lagonigro et al. (2003) analisaram a combinação dos SNPs Tyr7Phe (exon 2, não estudado no presente estudo), c.12168C>T e c.14091C>T. O haplótipo ACC foi associado com 19 % da redução de gordura subcutânea, enquanto que o haplótipo TCC aumentou 30 % da gordura intramuscular. Contudo quando analisados separadamente esses SNPs não apresentaram associação com características relacionadas com a gordura.

No rebanho 1 nenhum efeito foi encontrado na análise de substituição dos haplótipos com as características estudadas nesta população. O pequeno número de animais envolvidos neste estudo gerou um baixo número de haplótipos menos freqüentes em relação ao haplótipo de maior freqüência (o haplótipo 1). Provavelmente esse tamanho amostral reduzido, aliado a alta freqüência dos alelos desfavoráveis, de acordo com a literatura consultada, contribuiu para os resultados encontrados no rebanho 1.

No rebanho 2, a análise revelou um efeito sugestivo (*P*=0,0923) de substituição do haplótipo 1 (CCGCGGCATCG) pelo haplótipo 2 (CCGTGCCATTG). O alelo T do SNP c.12168C>T está presente na construção do haplótipo 2, enquanto o C, na construção do haplótipo 1. Considerando o fato de que animais com o alelo T para o SNP c.12168C>T apresentam maior acúmulo de gordura segundo a literatura consultada (BUCHANAN et al., 2002; SCHENKEL et al., 2005; SOUZA et al., 2010) e sendo a quantidade de adipócito no corpo um indicativo de maturidade sexual (KINDER et al., 1987; BUCHANAN et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002), esses resultados estão em desacordos com os da literatura. Isso pode ter ocorrido por algum efeito de epistasia entre os polimorfismos estudados e outros polimorfismos não estudados no gene da leptina e/ou em outro gene que também exerça influência sobre a puberdade em Nelore. Também deve ser levado em consideração que a alta freqüência do haplótipo 1, em relação aos demais, pode ter contribuído para os resultados encontrados.

4. 4 Reconstrução gênica

A relação gênica encontrada entre os haplótipos das fêmeas Nelores (*Bos indicus*) estudas e os haplótipos de animais *Bos taurus* (Hereford) e *Bos indicus* (Sahiwal) depositadas no *GenBank* pode ser observada no gráfico de similaridade (Figura 13).

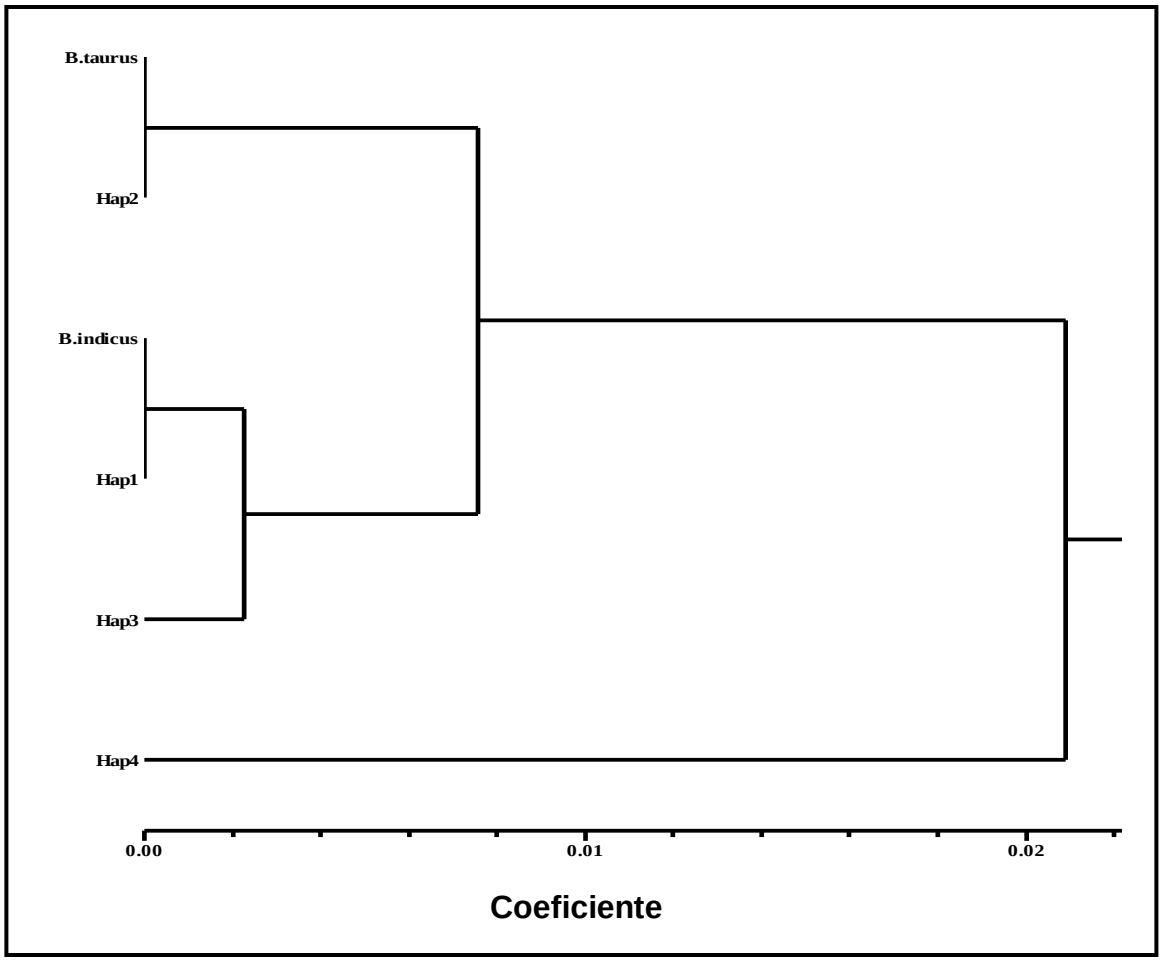

Figura 13 - Gráfico de similaridade, representando a relação gênica entre a seqüências dos haplótipos encontrados nos animais do rebanho 1 e 2 na região amplificada pelo iniciador EX2 e a seqüências de *Bos taurus* e *Bos indicus* desta mesma região depositadas no *GenBank*

O haplótipo 1 está presente em cerca de 72 % das novilhas do rebanho 1 e em 86 % da fêmeas do rebanho 2. Esse haplótipo foi idêntico ao da seqüência da raça indiana Sahiwal (*Bos indicus*), o que já era esperado, pois sendo a raça Nelore também *Bos indicus*, a maior parte da contribuição genética seria desta subespécie. O haplótipo 2 é 100 % idêntico ao da seqüência de *Bos taurus* (raça Hereford). Este haplótipo está presente em 9% dos animais do rebanho 1 e em 4 % dos animais do rebanho 2. O haplótipo 3 foi encontrado em cerca de 5 % nas fêmeas tanto no rebanho 1 como no 2. A maior contribuição para a formação deste haplótipo foi de *Bos indicus*, como é visualizado na árvore gênica (Figura 13). Entretanto, na formação do haplótipo 3, houve também a contribuição de *Bos taurus*, mas em menor quantidade quando comparando com a contribuição originada de *Bos indicus*. Para o haplótipo 4 também

houve uma contribuição genética tanto de *Bos taurus* como de *Bos indicus*. Mas no caso deste haplótipo, as contribuições das duas subespécies foram praticamente iguais na sua formação.

Três dos 11 SNPs utilizados na formação dos haplótipos estudados na reconstrução gênica já haviam sido relatados anteriormente, são eles g.11966C>T, g.11989G>C e c.12168C>T (KONFORTOV et al., 1999). É interessante salientar que os alelos T e C, respectivamente para os SNPs g.11989G>C e g.11989C>T aparecem em maior freqüência em animais da subespécie *Bos taurus* (KONFORTOV et al., 1999; LIEFERS et al., 2003; LAGONIGRO et al., 2003), sendo esses dois alelos encontrados tanto na seqüência de Hereford, depositada no *GenBank*, como também no haplótipo 2. Os demais haplótipos deste estudo possuíam os alelos C e G (g.11989G>C e g.11989C>T, respectivamente), assim como a seqüência da raça Sahiwal.

Choudhary et al. (2005) estudando o polimorfismos c.12168C>T, em animais *Bos indicus*, entre eles a raça Sahiwal, relataram que 100 % dos animais estudados possuíam somente o genótipo CC. Entretanto os três genótipo (CC, CT e TT) estavam presente nos animais *Bos taurus* estudados por esses autores. No presente estudo com animais Nelores (*Bos indicus*), a mutação estava presente. Os haplótipos 1 e 3 possuem o alelo C para essa mutação, sendo esses os mais próximos da seqüência da raça Sahiwal (*Bos indicus*), enquanto os haplótipos 2 e 4 possuem o alelo T, que aparece com maior freqüência em animais taurinos que zebuínos (BUCHANAN et al., 2002; SCHENKEL et al., 2005). Esses resultados estão de acordo com o que foi descrito por Meirelles et al. (1999) que estudando o DNA mitocondrial de três raças zebuínas nacionais, reportaram que grande parte do rebanho zebu brasileiro é formado do cruzamento absorvente de fêmeas taurinas com machos zebuínos.

5 CONCLUSÕES

- O gene da leptina foi 2,1 vezes mais expresso nas novilhas que estavam na puberdade, sugerindo que esse gene possa estar influenciando a entrada desses animais na puberdade.
- 37 polimorfismos foram identificados no promotor e gene da leptina, destes, 19 não haviam sido reportados anteriormente. Entretanto, a maioria dos polimorfismos identificados apresentou-se praticamente fixado na raça Nelore e nenhum dos genótipos encontrados foi associado com a puberdade, expressão do gene ou com a DEP para PP14. Somente os SNPs g.11805C>T e c.12168C>T, diferentemente dos demais, apresentaram uma distribuição alélica mais equilibrada entre seus alelos. Assim, os seus efeitos merecem serem investigados com maior número de animais e em outras populações.
- Nos dois rebanhos de Nelore estudados foi encontrado um haplótipo característico de *Bos taurus*, indicando que possivelmente a população zebuína brasileira foi formada do cruzamento entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.
- Diferentemente do esperado, o haplótipo 2, de origem taurina, parece contribuir negativamente para a DEP PP14.

REFERÊNCIAS

ADAMOWICZ, T.; FLISIKOWSKI, K.; STARZYNSKI, R.; ZWIERCHOWSKI, L.; SWITONSKI, M. Mutation in the Sp1 motif of the bovine leptin gene affects its expression. **Mammalian Genome**, New York, v. 17, p. 77-82, 2006.

AHIMA, R.S.; DUSHAY, J.; FLIER, S.N.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J.S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **The Journal of Clinical Investigation,** New Haven, v. 99, n. 3, p. 391-395, 1997.

AHMED, M.L.; ONG, K.K.; MORRELL, D.J.; COX, L.; DRAYER, N.; PERRY, L.; PREECE, M.A.; DUNGER, D.B. Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 84, n. 3, p. 899-905, 1999.

ALMEIDA, S.E.M.; ALMEIDA, E.A.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 120, p. 106-113, 2003.

ALMEIDA, S E.M.; ALMEIDA, E.A.; TERRA, G.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; WEIMER, T.A. Association between molecular markers liked to the leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 206-211, 2007.

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G L. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor 1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 127-133, 2000.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLUZZI, M.N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M.J. The stomach is a source of leptin. **Nature**, London, v. 394, p. 790-793, 1998.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WILKEMAN-SIM, D.C.; SCHMUTZ, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 34, n. 1, p. 105-116, 2002.

BUCHANAN, F.C.; VAN KESSEL, A.G.; WALDNER, C.; CHRISTENSEN, D.A.; LAARVELD, B.; SCHMUTZ, S.M. Hot topic: An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 3164-3166, 2003.

CASTRACANE, V.D.; KRAEMER, R.R.; FRANKER, M.A.; KRAEMER, G.R.; GIMPEL, T. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 70, p. 472- 477, 1998.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; Lu, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics**, New York, v. 12, n. 3, p. 318-320, 1996.

CHEHAB, F.F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M.E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, Washington, v. 275, n. 5296, p. 88-90, 1997.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v.162, p.156 - 159, 1987.

CHOUDHARY, V.; KUMAR, P.; BHATTACHARYA, T.K.; BHUSHAN, B.; SHARMA, A. DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 740-742, 2005.

CHUNG, E.R.; SHIN, S.C.; SHIN, K.H.; CHUNG, K.Y. SNP discovery in the leptin promoter gene and association with meat quality and carcass traits in Korean cattle. **Asian – Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 21, n. 12, p. 1681-1689, 2008.

CLAYTON, P.E.; TRUEMAN, J.A. Leptin and puberty. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 83, n. 1, p. 1-4, 2000.

CLAYTON, P.E.; GILL, M.S; HALL, C.M.; TILLMANN, V.; WHATMORE, A.J.; PRICE, D.A. Serum leptin through childhood and adolescence. **Clinical Endocrinology,** Oxford, v. 46, n. 6 p. 727-733, 1997.

COLEMAN, D.L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, New York, v. 9, p. 294–298, 1973.

CORVA, P.M.; MACEDO, G.V.F.; SORIA, L.A.; MAZZUCCO, J.P.; MOTTER, M.; VILLARREAL, E.L.; SCHOR, A.; MEZZADRA, C.A.; MELUCCI, L.M.; MIQUEL, M.C. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 105-116, 2009.

DOYON, C.; DROUIN, G.; TRUDEAU, V.L.; MOON, T.W. Molecular evolution of leptin. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 124, n. 2, p.188-98, 2001.

DRYDEN, S.; WILLIAN, G. The role of hypothalamic peptides in the control of energy balance and body weight. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 3, p. 51-58, 1996.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.; FERRAZ, J.B.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H.N.; EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 951-954, 2002.

ERICKSON, J.C.; HOLLOPETER, G.; PALMITER, R.D. Attenuation of the obesity syndrome of o*b/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**, Washington, v. 274, n. 5293, p. 1704-1707, 1996.

ESCOBAR-MORREALE, H. F.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. **Endocrinology**, Springfield, v. 138, p. 4485-4488, 1997.

EWING, B; GREEN, P. Base - calling of automated sequencer traces using phred.II, Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186 -194, 1998.

FAROOQI, I.S.; JEBB, S.A.; LANGMACK, G.; LAWRENCE, E.; CHEETHAM, C.H.; PRENTICE, A.M.; HUGHES, I.A.; McCAMISH, M.A.; O'RAHILLY, S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, n. 12, p. 879-884, 1999.

FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P. Seleção de *Bos indicus* para precocidade sexual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 167-171, 2007.

FINN, P.D.; CUNNINGHAM, M.J.; PAU, K.Y.F.; SPIES, H.G.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. **Endocrinology**, Baltimore, v. 139, n. 11, p. 4652-4662, 1998.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec 2010:** anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Argos, 2010. 360 p.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195 - 202, 1998.

GRUNFELD, C.; ZHAO, C.; FULLER, J.; POLLACK, A.; MOSER, A.; FRIEDMAN, J.; FEINGOLD, K.R. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **Journal of clinical investigation**, New York, v. 97, p. 2152-2157, 1996.

HASSINK, S.G.; DE LANCEY, E.; SHESLOW, D.V.; SMITH-KIRWIN, S.M.; O'CONNER, D.M.; CONSIDINI, R.V.; OPENTANOVA, I.; DOSTAL, K.; SPEAR, M.L.; LEEF, K.; ASH, M.; SPITZER, A.R.; FUNANAGE, V.L. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? **Pediatrics**, Springfield, v. 100, p. 1-6, 1997.

HERVEY, G. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. **Journal of Physiology**, Stanford, v.145, p.336-352, 1959.

HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.1405-1420, 1998.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real - time RT - PCR normalization; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, Hampshire, v. 6, n. 4, p. 279 - 284, 2005.

JIN, L.; ZHANG, S.; BURGUERA, B.G.; COUCE, M.E.; OSAMURA, R.Y.; KULIG, E.; LLOYD, R.V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 141, p. 333-339, 2000.

KINDER, J.E.; DAY, M.L.; KITTOCK, R.J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 34, p. 167-186, 1987.

KONFORTOV, B.A.; LICENCE, V.E.; MILLER, J.R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, New York, v. 10, p. 1142-1145, 1999.

KONONOFF, P. J.; DEOBALD, H. M.; STEWART, E. L.; LAYCOCK, A. D.; MARQUESS, F. L. S. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 927-932, 2005.

KULIG, H.; KMIEC, M. Association between leptin gene polymorphisms and growth traits in Limousin cattle. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 45, n. 6, p. 738-741, 2009.

KUMAR, B.; FRANCIS, S.M., SUTTIE, J.M., THOMPSON, M.P. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Tarrytown, v. 120, p. 543-548, 1998.

LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J.A.; WILLIAMS, J.L. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, p. 371-374, 2003.

LI, H; MATHENY, M.; SCARPACE, P.J. Beta 3-adrenergic mediated suppression of leptin gene expression in rat. **American Journal of Phisiology**, Washington, v. 272, p. 1031-1036, 1997.

LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1633–1638, 2002.

LIEFERS, S.C; VEERKAMP, R.F.; TE PAS, M.F.W.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; VAN DER LANDE, T. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Animal Genetics**, Oxford, v. 35, p. 138-141, 2004.

LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W; VEERKAMP, R.F.; CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; GERRITSEN, R.; VAN DER LENDE, T. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. **Mammalian Genome**, New York, v. 14, p. 657-663, 2003.

LIEFERS, S.C.; VEERKEMP, R.F; TE PAS, M.F.W.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; PLATJE, M.; VAN DER LENDE, T. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. **Animal Genetics**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 111-8, 2005.

LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D.I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, Oxford, v. 28, p. 245, 1997.

LUSK, J.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 1865-1872, 2007.

MÁCAJOVÁ, M.; LAMOSOVÁ, D.; ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 51, p. 157-166, 2004.

MACIEL, M.N.; ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.H.; NEVES, J.P.; WILLIAMS, G.L. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 2930-2936, 2004a.

_____. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, p. 804-812, 2004b.

MANTZOROS, C.S.; FLIER, J.S; ROGOL, A.D. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 82, n. 4, p. 1066-1070, 1997.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.

McDONALD, J.K. Role of neuropeptide Y in reproductive function. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 611, p. 258-272, 1990.

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the american zebu really Bos indicus? **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 4, p. 543-546, 1999.

MERCER, J.G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L.M.; LAWRENCE, C.B.; HANNAH, L.T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 387, p. 113-116, 1996.

MEYER, C.; ROBSON, D.; RACKOVSKY, N.; NADKARNI, V.; GERICH, J.; Role of the kidney in human leptin metabolism. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 273, p. 903-907, 1997.

MORASH, B.; LI, A.; MURPHY, P.R.; WILKINSON, M.; UR, E. Leptin gene expression in the brain and pituitary glands. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 12, p. 5995-5998, 1999.

NEIL, J.D.; WASSARMAN, P. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2006. 1721 p.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W. Generalize linear models. **Journal Research Statistic Science**, Bangladesh, v. 135, p. 370-384, 1972.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: Prentice Hall, 2005. 998 p.

NKRUMAH, J.D.; LI, C.; YU, J.; HANSEN, C.; KEISLER, D.H.; MOORE, S.S. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 20-28, 2005.

NKRUMAH, J.D.; LI, C.; KEISLER, D.H.; SHERMAN, E.L.; WANG, Z.; MURDOCH, B.M.; MOORE, S.S. Polymorphisms in the leptin gene and there associations with performance, feed efficiency, and carcass merit of beef cattle. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Anais eletrônicos**… Belo Horizonte: GALP, 2006. Disponível em: <http://www.wcgalp8.org.br/wcgalp8/articles/paper/22_421-1205.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2010.

NOGUEIRA, G.P. **Puberdade em novilhas Nelore**. 2003. 89 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, 2003.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real - time RT - PCR. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 3, p. 1559 - 1582, 2006.

PASSOS, D.T.; HEPP, D.; MORAES, J.C.; WEIMER, T.A. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. **Journal of Animal Breeding Genetics**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 157-162, 2007.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 703-708, 2002.

PEREIRA, J.C.C. Contribuição genética do zebu na pecuária bovina do Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 205, p. 30-38, 2000.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real – time RT – PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C.; BARENDE, W. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 1427, 1997.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid Cycle real time PCR:** methods and applications. Heidelberg: Springer, 2001. p. 21-34.

REECE, W.O. **Dukes**: fisiologia dos animais domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001. 215 p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 694 p.

SANTIAGO, A.A. **O Nelore**: origem, formação e evolução do rebanho. São Paulo: Editora dos Criadores, 1983. 451 p.

_____. **O zebu na Índia, no Brasil e no mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 774 p.

SANTIAGO, A.C.; VENERONI, G.B.; MEIRELLES, S.L.; OLIVEIRA, H.N.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A. A espessura de gordura subcutânea independe do genótipo de leptina em bovinos da raça Canchim criados a pasto. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7., 2008, São Carlos. **Anais eletrônicos...** São Carlos: SBMA, 2008. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CPPSE-2009/18124>. Acesso em: 31 maio 2010.

SCHENKEL, F.S.; MILLER, S.P.; YE, X.; MOORE, S.S.; NKRUMAH, J.D.; LI, C.; YU, J.; MANDELL, I.B.; WILTON, J.W.; WILLIAMS, J.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 2009-2020, 2005.

SILVA, J.A.V.; MELIS, M.H.V.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Estimação de parâmetros genéticos para probabilidade de prenhez aos 14 meses e altura na garupa em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1141-1146, 2003.

SILVA, N.A.; VILLELA, P.M.; BOSCHIERO, C.; ANDRADE, J.L.F.; COUTINHO, L.L. Método alternativo de purificação de produto de PCR para seqüenciamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. Resumo 409.

SILVA, R.C.G. **Estudo de caracterização e associação de marcadores moleculares relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

SMITH, J.L.; SHEFFIELD, L.G. Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells. **Domestic Animal Endorinology**, Stoneham, v. 22, n. 3, p. 145-154, 2002.

SOARES, M.A.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; EUCLYDES, R.F.; LOPES, P.S.; PEIXOTO, J.O.; GUIMARÃES, M.F.M.; WENCESLAU, A.A.; PIRES, A.V. Novos polimorfismos no gene da obesidade em raças divergentes de suínos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 401-407, 2006.

SOUZA, E.M.; MILAGRES, J.C.; SILVA, M.A.; REGAZZI, A.J.; CASTRO, A.G.C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 24, p. 926–935, 1995.

SOUZA, F.R.P.; MERCADANTE, M.E.Z.; FONSECA, L.F.S.; FERREIRA, I.C.; REGATIERI, D.; AYRES, R.; TONHATI, H.; SILVA, S.L.; RAZOOK, A.G.; ALBUQUERQUE, L.G. Assessment of DGAT1 and LEP gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 435-441, 2010.

SPICER, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 21, p. 251-270, 2001.

STASIO, L. D.I.; BRUGIAPAGLIA, A.; GALLONI, M.; DESTEFANIS, G.; LISA, C. Effect of the leptin c.73T>C mutation on carcass traits in beef cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 38, p. 315-317, 2007.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 73, n. 5, p. 1162-1169, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.68, p. 978-989, 2001.

TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T.; SASAKI Y. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 53, p. 131-135, 2002.

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L.L.; MEIRELLES, F.V.; PIRES, A.V.; SILVA, L.F.P. Leptin and hypothalamic gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 3, p. 657-664, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT- PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2002.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; ROSSETI, L. A nutrient-sensing pathways regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, London, v. 393, p. 684-688, 1998.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 23, p. 339-349, 2002.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, London; v. 372, p. 425-432, 1994.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; MACIEL, M.N.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaing, v. 71, p. 804-812, 2004.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, p. 166-185, 2005.

ANEXOS

Anexo A - Freqüências genotípicas dos polimorfismos encontrados no promotor do gene da leptina nas novilhas do rebanho 1

	Pré-púbere			Púbere		
Posição	**Genótipo**	**N[1]**	**Freq. % Genotípica**	**Genótipo**	**N[1]**	**Freq. % Genotípica**
g.1540A>G	AA	13	92,86	AA	11	84,62
	AG	1	7,14	AG	2	15,38
	GG	-	-	GG	-	-
g.1545A>G	AA	13	92,86	AA	11	84,62
	AG	1	7,14	AG	2	15,38
	GG	-	-	GG	-	-
g.1555A>G	AA	11	78,57	AA	11	84,62
	AG	3	21,43	AG	2	15,38
	GG	-	-	GG	-	-
g.1661T>C	TT	12	85,71	TT	12	92,31
	TC	2	14,29	TC	1	7,69
	CC	-	-	CC	-	-
g.1934del(GTT)	del/del	11	78,57	Del/Del	11	84,62
	del/GTT	3	21,43	GTT/Del	2	15,38
	GTT/GTT	-	-	GTT/GTT	-	-
g.2033C>T	CC	11	78,57	CC	11	84,62
	CT	3	21,43	CT	2	15,38
	TT	-	-	TT	-	-
g.2095A>T	AA	11	78,57	AA	11	84,62
	AT	3	21,43	AT	2	15,38
	TT	-	-	TT	-	-

[1]Número de animais encontrados por genótipo.

Anexo B - Freqüências genotípicas dos polimorfismos encontrados no gene da leptina nas novilhas do rebanho 1

(continua)

Posição	Pré-púbere			Púbere		
	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica
			Intron 1			
g.11799C>T	CC	11	78,57	CC	10	76,92
	CT	3	21,43	CT	2	15,38
	TT	-	-	TT	1	7,69
g.11805C>T	CC	10	71,43	CC	8	61,54
	CT	4	28,57	CT	4	30,77
	TT	-	-	TT	1	7,69
g.11927G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	2	15,38
	AA	-	-	AA	1	7,69
g.11966C>T	CC	11	78,57	CC	11	84,62
	CT	3	21,43	CT	2	15,38
	TT	-	-	TT	-	-
g.11977G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	2	15,38
	AA	-	-	AA	1	7,69
g.11989G>C	GG	11	78,57	GG	11	84,62
	GC	3	21,43	GC	2	15,38
	CC	-	-	CC	-	-
g.12032C>T	CC	11	78,57	CC	10	76,92
	CT	3	21,43	CT	2	15,38
	TT	-	-	TT	1	7,69
g.12034A>G	AA	11	78,57	AA	10	76,92
	AG	3	21,43	AG	2	15,38
	GG	-	-	GG	1	7,69
			Exon 2			
12.146	TT	11	78,57	TT	10	76,92
	TC	3	21,43	TC	2	15,38
	CC	-	-	CC	1	7,69
12.168	CC	10	71,43	CC	8	61,54
	CT	2	14,29	CT	4	30,77
	TT	2	14,29	TT	1	7,69

Anexo B - Freqüências genotípicas dos polimorfismos encontrados no gene da leptina nas novilhas do rebanho 1

(continuação)

Pré-púbere				Púbere		
Posição	**Genótipo**	**N[1]**	**Freq. % Genotípica**	**Genótipo**	**N[1]**	**Freq. % Genotípica**
			Intron 2			
g.12287G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	2	15,38
	AA	-	-	AA	1	7,69
g.12827G>A	GG	13	92,86	GG	11	84,62
	GA	1	7,14	GA	2	15,38
	AA	-	-	AA	-	-
g.12942T>C	TT	11	78,57	TT	10	76,92
	TC	3	21,43	TC	3	23,08
	CC	-	-	CC	-	-
g.13020G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	3	23,08
	AA	-	-	AA	-	-
g.13048C>T	CC	11	78,57	CC	12	92,31
	CT	3	21,43	CT	1	7,69
	TT	-	-	TT	-	-
g.13102T>G	TT	13	92,86	TT	11	84,62
	TG	1	7,14	TG	2	15,38
	GG	-	-	GG	-	-
g.13114T>C	TT	11	78,57	TT	10	76,92
	TC	3	21,43	TC	3	23,08
	CC	-	-	CC	-	-
g.13252G>T	GG	10	71,43	GG	10	76,92
	GT	4	28,57	GT	3	23,08
	TT	-	-	TT	-	-
g.13275C>T	CC	10	71,43	CC	10	76,92
	CT	4	28,57	CT	3	23,08
	TT	-	-	TT	-	-
g.13285C>T	CC	11	78,57	CC	10	76,92
	CT	3	21,43	CT	3	23,08
	TT	-	-	TT	-	-
g.13292A>G	AA	11	78,57	AA	10	76,92
	AG	3	21,43	AG	3	23,08
	GG	-	-	GG	-	-
g.13325G>A	GG	13	92,86	GG	11	84,62
	GA	1	7,14	GA	2	15,38
	AA	-	-	AA	-	-

Anexo B - Freqüências genotípicas dos polimorfismos encontrados no gene da leptina nas novilhas do rebanho 1

(conclusão)

Posição	Pré-púbere			Púbere		
	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica
			Intron 2			
g.13369G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	3	23,08
	AA	-	-	AA	-	-
g.13848G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	3	23,08
	AA	-	-	AA	-	-
g.13897G>A	GG	11	78,57	GG	10	76,92
	GA	3	21,43	GA	3	23,08
	AA	-	-	AA	-	-
			Exon 3			
c.14091C>T	CC	13	92,86	CC	12	92,31
	CT	1	7,14	CT	1	7,69
	TT	-	-	TT	-	-
c.14248C>T	CC	10	71,43	CC	10	76,92
	CT	4	28,57	CT	3	23,08
	TT	-	-	TT	-	-
c.14251T>C	TT	11	78,57	TT	10	76,92
	TC	3	21,43	TC	3	23,08
	CC	-	-	CC	-	-
c.14263T>C	TT	11	78,57	TT	10	76,92
	TC	3	21,43	TC	3	23,08
	CC	-	-	CC	-	-
c.14347C>T	CC	11	78,57	CC	10	76,92
	CT	3	21,43	CT	3	23,08
	TT	-	-	TT	-	-

[1]Número de animais encontrados por genótipo.

Anexo C - Freqüências genotípicas dos polimorfismos encontrados no gene da leptina na região amplificada pelo iniciador EX2 nas fêmeas do rebanho 2

Posição	Alta PP14			Baixa PP14		
	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica	Genótipo	N[1]	Freq. % Genotípica
			Intron 1			
g.11799C>T	CC	43	89,58	CC	44	91,67
	CT	5	10,42	CT	4	8,33
	TT	-	-	TT	-	-
g.11805C>T	CC	39	81,25	CC	40	83,33
	CT	8	16,67	CT	8	16,67
	TT	1	2,08	TT	-	-
g.11927G>A	GG	43	89,58	GG	44	91,67
	GA	5	10,42	GA	4	8,33
	AA	-	-	AA	-	-
g.11966C>T	CC	47	97,92	CC	43	89,58
	CT	1	2,08	CT	3	6,25
	TT	-	-	TT	2	4,17
g.11977G>A	GG	43	89,58	GG	44	91,67
	GA	5	10,42	GA	4	8,33
	AA	-	-	AA	-	-
g.11989G>C	GG	47	97,92	GG	43	89,58
	GC	1	2,08	GC	3	6,25
	CC	-	-	CC	2	4,17
g.12032C>T	CC	43	89,58	CC	44	91,67
	CT	5	10,42	CT	4	8,33
	TT	-	-	TT	-	-
g.12034A>G	AA	43	89,58	AA	44	91,67
	AG	5	10,42	AG	4	8,33
	GG	-	-	GG	-	-
			Exon 2			
c.12146T>C	TT	43	89,58	TT	44	91,67
	TC	5	10,42	TC	4	8,33
	CC	-	-	CC	-	-
c.12168C>T	CC	42	87,50	CC	39	81,25
	CT	6	12,50	CT	7	14,58
	TT	-	-	TT	2	4,17
			Intron 2			
g.12287G>A	GG	43	89,58	GG	44	91,67
	GA	5	10,42	GA	4	8,33
	AA	-	-	AA	-	-

[1]Número de animais encontrados por genótipo.