

EFEITO DE POLIMORFISMOS NO GENE LEP NA EXPRESSÃO
DA LEPTINA EM ADIPÓCITOS DE BOVINOS DE CORTE

DANIEL THOMPSEN PASSOS

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências.

Orientação: Tania de Azevedo Weimer

Porto Alegre

2006

A MINHA FAMÍLIA.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Realmente eu precisei. Obrigado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao laboratório de Diagnóstico Genético Molecular da ULBRA, SIMBIOS e sua equipe, por viabilizarem a utilização do equipamento para a Real-Time PCR.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Hospital Veterinário da ULBRA e na EMBRAPA-Pecuária Sul, Bagé.

Este projeto foi financiado pelo CNPq, FAPERGS e ULBRA.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	6
I.1. Pecuária bovina	7
I.2. Seleção animal	10
I.3. Leptina e equilíbrio energético em bovinos	13
I.4. Análise da expressão gênica	19
II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
III. ARTIGO: EFFECT OF POLYMORPHISMS LINKED TO LEP GENE ON ITS EXPRESSION ON ADIPOSE TISSUES IN BEEF CATTLE COWS	26
IV. DISCUSSÃO	49
V. RESUMO E CONCLUSÕES	57
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	62
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Pecuária bovina

Os bovinos são um dos maiores componentes da economia pastoril em todo mundo e sua evolução tem sofrido a influência humana por muitas gerações, com seleção de diversas características, conforme a necessidade e a importância econômica. O último relatório da FAO, estimou a população mundial bovina, em 2005, em 1,4 bilhões de animais, sendo que o Brasil, com uma população de 192 milhões de cabeças, representa o maior rebanho comercial do mundo (FAO, 2006), correspondendo a um bovino para cada habitante.

Atualmente, os principais tipos de bovinos criados em todo o mundo são os zebuínos (*Bos primigenius indicus*) e os taurinos (*Bos primigenius taurus*; INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, 2003), os primeiros de origem indiana e os outros procedentes da Europa, e devido a sua completa interfertilidade, devem ser considerados como variações geográficas de uma mesma espécie (EPSTEIN, 1971; EPSTEIN & MASON, 1984; PAYNE, 1991; LOFTUS et al., 1994).

Análises de polimorfismos nas regiões microssatélites e de seqüências do DNA mitocondrial (LOFTUS et al., 1994; MACHUGH et al., 1997) revelaram que os ancestrais dos zebuínos e taurinos divergiram algumas centenas de milhares

de anos atrás e, que resultam de, pelo menos, dois eventos independentes de domesticação.

As diferenças morfológicas e fisiológicas observadas entre os taurinos e zebuínos refletem não só, as mudanças ambientais onde estes animais se adaptaram, como as várias práticas seletivas aplicadas ao longo do tempo. Em princípio, os animais foram selecionados para a produção de leite e/ou carne, e posteriormente, para ausência de aspás, e cor de pelagem, resistência a doenças e docilidade. Atualmente, muitas raças de taurinos apresentam uma produção superior de carne e leite, enquanto que os zebuínos são capazes de sobreviverem melhor em climas secos e quentes (LENSTRA & BRADLEY, 1999).

Levantamentos apontam que a pecuária de corte é exercida, no Brasil, por cerca de 3 milhões de criadores, representando 27 % de toda força de trabalho envolvida na agropecuária, sem contabilizar as atividades afins, como frigoríficos, matadouros e indústrias de carne. Entretanto, ocorrem problemas em seus índices produtivos, o que leva os criadores a buscarem caminhos alternativos para a melhoria da produção, incluindo o uso de tecnologias para sua intensificação e diversificação (MORAES, 2002). Uma das possibilidades é a utilização de cruzamentos entre raças distintas que permitem a combinação de características favoráveis de diferentes genótipos, como precocidade, fertilidade, longevidade, adaptação a diferentes tipos de pastagens e resistência a ecto e endoparasitas (rusticidade).

Por exemplo, nas raças resultantes de cruzamentos entre zebuínos e taurinos, os primeiros contribuem com genes responsáveis por tolerância e

maior adaptabilidade às condições ambientais em regiões tropicais e os taurinos transmitem genes responsáveis por maior precocidade e eficiência produtiva (PEREIRA, 1997). No Brasil, são exemplos destas raças, o Canchim, resultante de cruzamentos controlados até a obtenção de um produto com composição teórica de $\frac{5}{8}$ Charolês (taurino) x $\frac{3}{8}$ InduBrasil (zebuíno, resultante do cruzamento entre Nelore, Guzerá e Gir), Pitangueiras ($\frac{5}{8}$ Red Poll Charolês x $\frac{3}{8}$ Guzerá) e Santa Gertrudis ($\frac{5}{8}$ Shorthorn x $\frac{3}{8}$ Brahman).

A EMPRAPA Pecuária Sul, com sede em Bagé/RS, usando como modelo a formação da raça Brangus (Departamento de Agricultura dos USA, USDA), desenvolveu a partir de 1945, uma raça sintética, denominada Brangus-lbagé, através do cruzamento controlado entre vacas Aberdeen Angus e touros Nelore, até a obtenção de animais com a proporção teórica de $\frac{3}{8}$ Nelore e $\frac{5}{8}$ Aberdeen Angus. O único processo seletivo aplicado foi baseado na morfologia fenotípica, sem qualquer preocupação com a obtenção de animais com maior fertilidade. Os indivíduos apresentam características de rusticidade e longevidade, com touros e vacas, mantidos em regime de criação extensiva, em campos nativos, conservando-se ativos e reprodutivamente aptos até idades avançadas, de 12 a 14 anos (OLIVEIRA et al., 1998). A EMBRAPA Pecuária Sul dispõe de um banco de dados com informações sobre o histórico reprodutivo de vida de todos os animais do rebanho.

Atualmente, a raça Brangus-lbagé encontra-se em grande expansão, tendo a Associação Brasileira de Criadores de Brangus (www.brangus.org.br/manual_brangus.pdf) destacado até 2002, o registro de mais de 40 mil animais, divididos entre 250 criadores nas regiões sul, sudeste e centro-oeste.

I.2. Seleção animal

A seleção genética clássica é baseada, em geral, no fenótipo individual, que em muitos casos, não é uma indicação precisa do genótipo. Isto se deve ao fato de que a variação genética depende da variação alélica em um grande número de locos e a expressão gênica destes locos é altamente afetada por fatores do meio ambiente. Neste caso, a variação da característica ou a variação genética é de natureza quantitativa, sendo os locos individuais que afetam a expressão, denominados QTLs (locos para característica quantitativa, GELDERMANN, 1975). Além disto, produtividade e adaptação consistem de muitos componentes e, freqüentemente, existem correlações genéticas negativas entre alguns destes fatores (por exemplo, quantidade de leite e teor de proteína ou gordura do leite). Isto diminui a resposta da seleção para cada um dos fatores envolvidos na manifestação do caractere (DE KONING & WELLER, 1994). Assim, a habilidade do melhorista em reconhecer animais que possuam, potencialmente, alelos ou combinação de alelos, que aumentem a produção, é muito limitada.

Com os avanços nas tecnologias do DNA, ferramentas biotecnológicas estão sendo utilizadas para auxiliar a seleção animal, oferecendo uma nova estratégia para a melhoria da produtividade e da qualidade dos rebanhos. Uma possibilidade é o estudo de marcadores moleculares, que pode fornecer subsídios para a detecção de genes candidatos, cujos produtos tenham efeito sobre a eficiência produtiva e assim, permitir a seleção precoce, antes mesmo da manifestação da característica de interesse, obtendo-se raças com maior

produção e melhor qualidade. Estes marcadores segregam de modo mendeliano, podendo ser protéicos (antígenos e isoenzimas) ou seqüências de DNA de genes conhecidos ou de fragmentos de seqüência com função desconhecida (DAVIS & DeNISE, 1998).

Os marcadores de DNA apresentam maiores níveis de polimorfismos que os protéicos, pois permitem a obtenção de dados de regiões não transcritas e a identificação de mutações silenciosas. Contam ainda, com a facilidade de manipulação e a maior estabilidade do DNA, transformando-os em material de eleição para comparações biológicas e também como marcadores para caracteres de produção. A utilização dos marcadores moleculares no melhoramento animal diminui os inconvenientes da seleção baseada em análises exclusivas de fenótipo, permite a identificação e caracterização genética de populações, raças e espécies, e possibilita estudos de genealogias e controle de filiação (MACHUGH, 1996).

As primeiras aplicações de marcadores moleculares, na produção animal, envolveram a identificação de características condicionadas por um loco principal, pela facilidade de detecção (NEIMANN-SORENSEN & ROBERTSON, 1961). Para características quantitativas, quando marcadores moleculares são mapeados e ligados a genes de interesse, podem ser usados por melhoristas como ferramentas auxiliares de seleção em uma metodologia conhecida como Seleção Assistida por Marcadores, MAS. A utilização da MAS, permite a eliminação de genótipos desfavoráveis em uma única geração, reduzindo os custos dos testes de progênie, facilitando os esquemas de acasalamento, maximizando os efeitos heteróticos e possibilitando a identificação de efeitos

transgressivos em raças sintéticas. A MAS é particularmente útil para a seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração e para a seleção de indivíduos, que embora não exibam o traço em questão, o influenciam (como por exemplo, o efeito do genótipo de touros na produção leiteira de sua prole do sexo feminino). Permite ainda a seleção de animais jovens, antes do desenvolvimento dos caracteres reprodutivos (WEIMER, 2003).

Na produção animal, as decisões sobre as características a serem selecionadas devem ser baseadas nos aspectos econômicos, para que o produto genético possa ser usado comercialmente e, assim, o procedimento de seleção, certamente será uma combinação da seleção assistida por marcadores envolvendo diferentes QTLs que possam afetar uma mesma característica (SPELMAN & BOVENHUIS, 1998).

Dentre os diversos marcadores moleculares, dois tipos têm tido ampla utilização, os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) e os microssatélites, ou STRs (repetições curtas em "tandem"). Os primeiros são variações de seqüências de DNA que ocorrem quando um nucleotídeo é alterado na seqüência genômica. Existem em grande quantidade e, normalmente, consistem de dois alelos que se diferenciam por um par de bases. Essa diferença pode ser detectada através de amplificação por PCR e o uso de uma enzima de restrição específica, no caso da mutação criar ou eliminar um sítio para esta enzima, ou pela introdução de um sítio de restrição forçado, através do seqüenciamento e pela técnica de microarranjos.

Os STRs são pequenas seqüências não codificadoras, de 1 a 6 pares de bases, repetidas em "tandem" e cujo polimorfismo resulta do número variável de

elementos repetitivos, normalmente inferiores a 100 repetições (TAUTZ, 1993). Por apresentarem alto polimorfismo, codominância, facilidade de detecção e de identificação dos genótipos e alelos, por PCR, e por ocorrerem com grande frequência ao longo do genoma da maioria dos organismos eucarióticos, tem sido usado extensivamente para caracterização de raças, estudos de evolução e filogenias, mapeamento genético, e no auxílio de programas de melhoramento.

Os STRs podem localizar-se em diferentes regiões genômicas (exons, introns, 5' UTR, 3' UTR) atuando na organização da cromatina, na regulação da atividade gênica, no mecanismo de recombinação, na replicação do DNA, no controle do ciclo celular e no reparo de bases mal pareadas (LI et al., 2004) e de acordo com COMINGS (1998), aqueles em regiões promotoras favorecem a conformação DNA-Z, possibilitando o acesso de fatores de transcrição.

I.3. Leptina e equilíbrio energético em bovinos

Em vertebrados, especialmente entre mamíferos, a habilidade em armazenar grandes quantidades de energia na forma de tecido adiposo permite a sobrevivência durante períodos prolongados de falta de alimento. Para manter seu estoque de energia sem sofrer contínuas alterações em sua morfologia, um animal precisa ter um balanço entre o acúmulo e o gasto energético (FRIEDMAN, 1997).

Em bovinos, a constituição física do animal pode ser estimada pelo escore de condição corporal, que classifica, visualmente, os indivíduos de acordo com a quantidade de músculos e reservas de gordura, num determinado

momento. Mesmo sendo uma medida subjetiva, reflete o estado nutricional do animal, melhor até que o próprio peso, já que dois animais de mesmo peso, mas de tamanhos distintos apresentam diferentes condições físicas. Adicionalmente, esta medida é de grande utilidade na avaliação dos animais, no campo, pois independe da utilização de equipamentos. Existem diversos escores de condição corporal, com escalas variando de 5 a 10 classes; independente do sistema, o escore mais baixo caracteriza os animais mais magros e os subsequentes referem-se a aumentos gradativos de cobertura de gordura, até os animais obesos (JAUME & MORAES, 2002).

A Leptina é uma proteína de 167 aminoácidos, produzida pelos adipócitos e detectada por receptores especiais no cérebro, que, em resposta, levam o hipotálamo a sinalizar a saciedade e aumentar o metabolismo para queimar mais gordura, atuando como hormônio no controle da ingestão alimentar (AUWERX & STAELS, 1998; BARSH et al., 2000). É o produto do gene *obese*, descoberto no genoma de camundongos, por técnicas de clonagem posicional (ZHANG et al., 1994). Apresenta 3 exons e 2 introns, sendo que o primeiro exon não é traduzido na proteína funcional, de 16 kDa (HE et al., 1995; DE LA BROUSSE et al., 1996).

Em bovinos, o gene (*LEP*), localizado no cromossomo 4 (BTA 4q32; PFISTER-GENSKOW et al., 1996) é composto de 4067 pares de bases (TANIGUCHI et al., 2002; Genbank, nº de acesso U50365), sendo a organização exon-intron conservada e equivalente à de humanos e camundongos, ocupando cerca de 18,9 Kb do genoma (FIGURA 1).

A proteína apresenta 67 % de homologia entre as espécies humana, canina, suína, murina e bovina (ZHANG et al., 1997), sendo que a comparação de uma seqüência de 30 aminoácidos da leptina bovina com a humana e a murina, indicaram um alto grau de conservação, atingindo, nesta região específica, 100 % de homologia (JI et al., 1998).

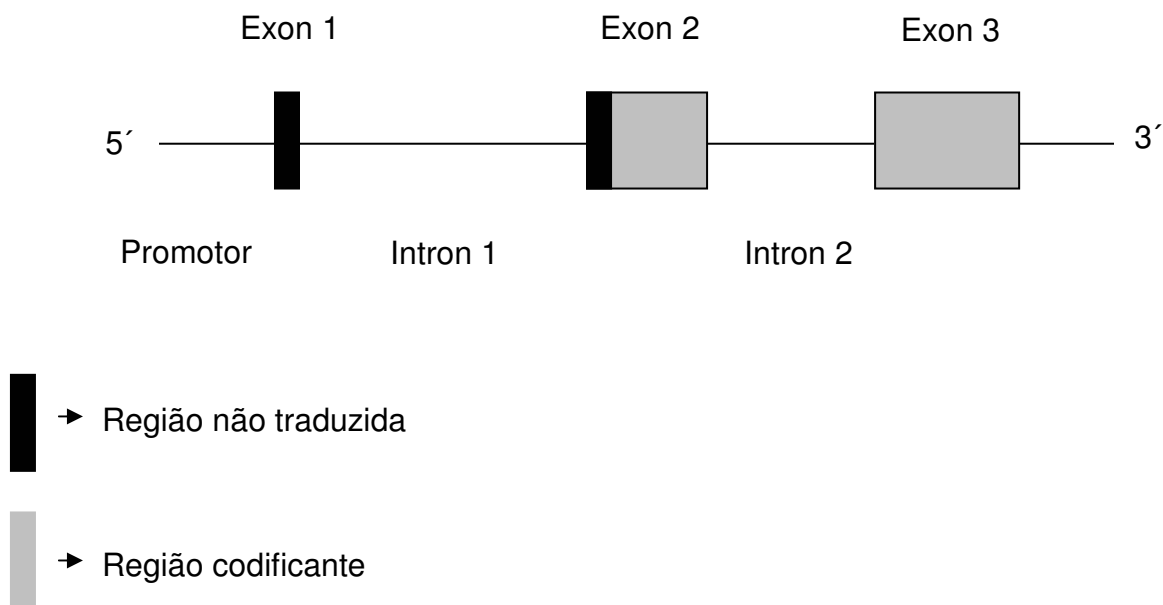


FIGURA 1. Organização Molecular do Gene da Leptina.

Os mecanismos responsáveis pelo metabolismo de lipídios, suas relações com o balanço energético juntamente com a atuação da leptina, vêm sendo estudados em detalhes em roedores, humanos e ruminantes, tendo-se verificado que a leptina e seus receptores apresentam importantes papéis em diversos estados metabólicos. A leptina atua diminuindo a produção de insulina

e de glicocorticóides, estimulando a secreção dos hormônio de crescimento, tireóideos e catecolaminas (moléculas que aumentam a produção de glicose, estimulam a glicogenólise hepática e inibem a glicogênio-sintetase), causando tanto acréscimo no gasto de energia pelos tecidos e na mobilização de lipídios das células adiposas, quanto decréscimo na lipogênese dos adipócitos e hepatócitos (BUCHANAN et al., 2002; CHILLIARD et al., 2005).

Domínios de ligação de importantes fatores de transcrição vêm sendo identificados em regiões promotoras no gene da leptina, tanto em humanos, como em roedores e ruminantes, incluindo um determinante da diferenciação de adipócito (HWANG et al., 1996; MILLER et al., 1996; HOLLENBERG et al., 1997; KIM et al., 1998; TANIGUCHI et al., 2002). Mutações sítio dirigidas em uma região “enhancer” a 5’ do gene LEP demonstraram sua participação na regulação da expressão gênica (HWANG et al., 1996; MASON et al., 1998; TANIGUCHI et al., 2002).

A leptina parece também exercer influência no desempenho reprodutivo. Este papel poderia ser indireto, por controlar o ganho de peso, já que um peso mínimo é essencial para o início da atividade reprodutiva e para o retorno do ciclo estral após o parto, mas receptores de leptina têm sido descritos no ovário, placenta e testículo, sugerindo um papel mais direto desta proteína na atividade reprodutiva (SPICER, 2001).

O receptor de leptina é uma proteína da subfamília de citocinas classe I (VAISSE et al., 1996), uma glicoproteína apresentando seis diferentes isoformas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf), que são encontradas em

diferentes tecidos animais, como cérebro, tecido adiposo, placenta, hipotálamo e gônadas (TARTAGLIA, 1997).

O gene do receptor da leptina (LEPR), em bovinos, foi mapeado no cromossomo BTA 3q33 (PFISTER-GENSKOW et al., 1997), apresentando uma homologia de 84 e 78 % com as seqüências de nucleotídeos de humanos e camundongos, respectivamente (TARTAGLIA et al., 1995; CHEN et al., 1996). Estudos de mutações neste gene, em ratos e camundongos, indicaram alterações no padrão de “splicing” (LEE et al., 1996), redução na afinidade por leptina e na capacidade de transdução de sinal (YAMASHITA et al., 1997; SILVA et al., 2002). CLEMENT et al. (1998) encontraram um polimorfismo no exon 16 do gene do receptor da leptina, em humanos, que resulta em uma proteína truncada, faltando os domínios transmembrana e intracelular, sendo este polimorfismo associado com obesidade e disfunção da hipófise. No entanto, nem todos os polimorfismos no gene LEPR mostraram associação com obesidade e diabetes, nesta espécie (CONSIDINE et al., 1996; ECHWALD et al., 1997; GOTODA et al., 1997).

As várias propriedades fisiológicas da leptina e o fato de poder afetar o conteúdo de gordura na carcaça de bovinos, apóiam os genes da leptina e de seu receptor, como fortes candidatos para o estudo de polimorfismos ou mutações que possam monitorar o desempenho produtivo, nesta espécie (LIEFERS, 2004).

De fato, vários marcadores moleculares no gene LEP ou de seu receptor ou a eles ligados têm sido descritos como associados a uma maior eficiência produtiva em bovinos (LIEFERS, 2004).

No gene LEPR, em bovinos leiteiros, foi identificada uma mutação T → C no exon 20, causando uma substituição de aminoácidos no resíduo 945 (T945M). Esta alteração poderia levar a mudança estrutural no domínio intracelular da Ob-R, e, conseqüentemente, alterar a rota de transdução de sinal, já que animais com genótipos CC apresentaram uma concentração de leptina, no final da gestação, mais elevada do que animais com genótipos CT, mas não durante a lactação; não há no entanto, registro de efeito desta mutação no ganho de peso (LIEFERS et al., 2004). A análise de 3 STRs (BM7225; BMS694; BMS2145) no gene LEPR, não parecem afetar o ganho de peso, em vacas de corte, no pós-parto (ALMEIDA, 2003).

No gene LEP, BUCHANAN et al. (2002), observaram, no exon 2, um SNP caracterizado por uma transição C → T, na 1ª base do 25º códon. Esta mutação pontual, leva uma mudança de aminoácido, Arg → Cys e estaria associada a um acúmulo de gordura na carcaça, nas raças Aberdeen-Angus, Charolês, Hereford e Simmental.

LIEFERS et al. (2005) identificaram, por seqüenciamento, 20 SNPs na região promotora do gene LEP de bovinos da raça Holandesa. Quatorze destes, apresentaram associação com a concentração de leptina circulante em animais no terço final da gestação, além de influenciar parâmetros relacionados com a fertilidade, o balanço energético e rendimento protéico.

No Rio Grande do Sul, ALMEIDA et al. (2003), investigaram na raça sintética Brangus-Ibagé, 4 SNPs (LEP_{HphI}; LEP_{Bsal}; LEP_{Sau3AI}"AB"; LEP_{Sau3AI}"12") e 5 STRs (BM6315; IDVGA51; BMS1074; RM088; BM1500) no gene LEP, ou sintênico a ele, avaliando a possível associação entre estes

marcadores e performance reprodutiva e ALMEIDA et al. (2006), avaliaram o efeito desses polimorfismos no ganho de peso, no pós-parto, em bovinos das raças Aberdeen Angus e Charolês. Foi verificado que dois marcadores no gene LEP (alelos *IDVGA51*181* e *LEPSau3A1*2*) estão associados a um aumento no intervalo entre partos de 79 e 81 dias, respectivamente (ALMEIDA et al., 2003) e que os alelos *BMS1074*151* e *BM1500*135*, localizados próximos ao gene da leptina, estão relacionados ao ganho de peso médio em bovinos da raça Charolês e Aberdeen Angus (ALMEIDA et al., 2006).

I.4. Análise da expressão gênica

Os níveis de síntese e liberação da leptina para a circulação, estão condicionados à proporção de gordura corporal, sendo, principalmente um reflexo dos depósitos de triacilgliceróis e do balanço energético metabólico no animal (CHILLIARD et al., 2005).

EHRHARDT et al. (2000), detectaram que vacas leiteiras, em final de lactação e sob uma dieta hipercalórica, apresentam níveis de leptina circulante relacionados linearmente com a condição corporal do animal; no entanto, em outras espécies de ruminantes, os níveis de leptina plasmática dependem mais do tamanho do adipócito do que da condição corporal (DELAVAUD et al., 2002).

Os níveis de proteína circulante podem ser detectados de diferentes formas. Dentre elas, a dosagem por radioimunoensaio convencional (RIA), descrito para o estudo em humanos (MA et al., 1996), e um aperfeiçoamento, elaborado por DELAVAUD et al. (2000), para análise dos níveis de leptina

plasmática circulante em ruminantes, que é, atualmente, muito utilizado em diferentes espécies animais.

A expressão do gene LEP pode ser detectada através da dosagem do mRNA tissular por uma variedade de métodos como, “Northern blot”, hibridização in situ, ensaios com cDNA, microarranjos e transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase, RT-PCR (JI et al., 1998; AMSTALDEN et al., 2000; CHILLIARD et al., 2001; YONEKURA et al., 2002).

Este último é extremamente poderoso para quantificar a expressão de genes, porque além de possibilitar, através da análise de diferentes tecidos, a determinação do órgão específico envolvido na expressão e o número relativo de cópias do gene que está sendo expresso, permite ainda, a detecção de quantidades muito baixas de mRNA (MURPHY et al., 1990).

Uma variante desta técnica, o RT-PCR em tempo real, permite a quantificação absoluta ou relativa do gene, sendo uma metodologia bastante sensível e precisa. O gene alvo é amplificado simultaneamente com um gene constitutivo (por exemplo, β -actina, rRNA 18S e β_2 -microglobulina), para minimizar os efeitos de diferenças amostrais. O sistema baseia-se, na degradação de uma sonda fluorescente, pela atividade 5' \rightarrow 3' exonucleásica da *Taq* DNA polimerase. Este processo ocorre em cada ciclo, não interferindo com o acúmulo exponencial dos produtos de amplificação. Os resultados são fornecidos em CT (threshold cycle) que corresponde ao ciclo da PCR no qual a emissão fluorescente atinge um valor limite que é baseado no background de fluorescência do sistema e é definido pelo pesquisador, podendo estar entre a linha de base e o platô de amplificação (HEID et al., 1996; GIULIETTI et al.,

2001). Para efeitos de correção o valor pode ser expresso na razão obtido pelo CT do gene alvo dividido pelo CT do gene constitutivo (SCHOOOF et al., 2004). A quantificação absoluta determina o número exato de cópias do gene de interesse, por comparação com um controle cujo número de cópias de mRNA do gene alvo é conhecido, enquanto que a quantificação relativa, baseia-se nas mudanças na expressão do gene, relativas a um grupo referência, que pode ser um controle não tratado ou amostras em um tempo zero (WANG & BROWN, 1999; WINER et al., 1999).

Análises quantitativas da expressão do gene LEP têm sido realizadas em amostras de tecidos de ruminantes com o objetivo de conhecer as relações entre sua expressão e o ganho de peso ou aumento da fertilidade (YONEKURA et al., 2002; REN, et al., 2002; CHELIKANI et al., 2003; CHILLIARD et al., 2005), tendo-se observado que variações nos níveis de mRNA de leptina em tecido adiposo e em glândula mamária de ruminantes, decorrem de diferenças genéticas, fisiológicas e de fatores ambientais e nutricionais (CHILLIARD et al., 2001).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As várias funções da leptina e os resultados positivos de associação entre marcadores moleculares ligados ao gene LEP e caracteres produtivos sugerem que o emprego destes polimorfismos poderia permitir a seleção precoce de animais com maior potencial para ganho de peso ou para melhor desempenho reprodutivo.

ALMEIDA et al. (2003), verificaram que o STR IDVGA51 (alelo *IDVGA51*181*) e o SNP LEP*Sau3A1* (alelo *LEPSau3A1*2*) estão associados a um aumento no intervalo entre partos de 79 e 81 dias, respectivamente, na raça sintética Brangus-Ibagé. Além disso, ALMEIDA et al. (2006), verificaram que os STRs BMS1074 e BM1500 afetam o ganho de peso, em bovinos das raças Aberdeen Angus e Charolês, no pós-parto: os alelos *BMS1074*151* e *BM1500*135* reduzem e aumentam, respectivamente, o ganho de peso diário.

Para uma aplicação mais ampla desses achados é extremamente importante avaliar as causas dessas associações. Uma possibilidade seria que os indivíduos portadores de diferentes genótipos apresentassem níveis distintos de expressão de leptina.

Assim, este trabalho foi desenvolvido com os objetivos:

Geral:

Avaliar a expressão do gene LEP em adipócitos de tecido omental e subcutâneo, cirurgicamente obtidos, de bovinos da raça Brangus-Ibagé, com genótipos para marcadores moleculares, previamente identificados como associados positiva ou negativamente a diferenças em desempenho reprodutivo e ganho de peso.

Específicos:

1. Verificar as distribuições genótípicas e alélicas dos marcadores IDVGA51, BMS1074, BM1500 e LEP*Sau3A1*, em uma amostra de 137 bovinos da raça Brangus-Ibagé, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Pecuária Sul, Bagé-RS).

2. Com base nos genótipos observados, separar os animais em quatro grupos, formados cada um por portadores de apenas um dos alelos previamente associados ao desempenho produtivo (*IDVGA51*181*, *LEP*Sau3A1**2*, *BMS1074*151* ou *BM1500*135*) e um grupo controle constituído por animais sem nenhum destes alelos.

3. Avaliar os animais, criados em campo nativo, com pastagem natural, quanto à sua condição corporal.

4. Realizar procedimento cirúrgico, para obtenção de amostras de tecido adiposo subcutâneo e omental.

5. Dosar os níveis de mRNA de leptina nos adipócitos destes dois tecidos, através do método quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR), comparando a expressão do gene LEP entre indivíduos portadores dos alelos de predisposição a ganho de peso e desempenho reprodutivo e o grupo controle.

CAPÍTULO III

Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle cows

DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY (SUBMETIDO)

1 **Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on**
2 **adipose tissues in beef cattle cows**

3

4 Passos, D.T.^{a,b*}; Hepp, D^b.; Moraes, J.C.F^c.; Weimer, T.A.^{a,b}

5

6

7

8

9 ^aPPG Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande
10 do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ^bLaboratório de Biotecnologia, Hospital
11 Veterinário, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil; ^cEmpresa
12 Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bagé, RS, Brasil.

13

14 **Running title:** Leptin adipose fat expression in beef cattle

15

16 *Keywords:* Leptin; gene expression; Real-Time RT-PCR; beef cattle; MAS.

17

18 *** Corresponding author:**

19 Daniel Thompsen Passos

20 Lima e Silva, 30/1301

21 90050-100, Porto Alegre, RS, Brasil

22 e-mail: danielth@ulbra.tche.br

23 Phone/Fax number: 00 55 51 34779284

1 **Abstract**

2

3 Polymorphisms at leptin gene may affect gene expression and, in beef
4 cattle, the alleles *IDVGA51*181* and *LEPSau3A1*2* have been described as
5 increasing calving interval (CI), and *BMS1074*151* and *BM1500*135* as
6 affecting daily weight gain. In order to verify the effect of these alleles on LEP
7 gene transcription, this work analyzed LEP mRNA levels on cattle
8 subcutaneous and omental adipose tissues through Real-Time RT-PCR. A
9 sample of 137 females of a Brangus-Ibague herd was previously analyzed in
10 relation to these polymorphisms distribution; then animals presenting only
11 one of the *IDVGA51*181* (n=6), *LEPSau3A1*2* (n=4), *BMS1074*151* (n=13),
12 *BM1500*135* (n=6) alleles and a control group composed by animals without
13 any of these alleles (n=4) were submitted to surgery to obtain omental and
14 subcutaneous adipose tissues. Leptin mRNA expression was quantified by
15 TaqMan Real-Time RT-PCR, using 18S rRNA as internal control. Leptin
16 expression was adjusted for the effect of body score condition, through
17 regression analysis. Omental fat had LEP gene expression 33% lower than
18 the subcutaneous tissue. Carrier animals of *IDVGA*181* and *BMS1074*151*
19 alleles showed subcutaneous fat mRNA leptin levels higher than the controls.
20 As leptin controls food intake, animals with higher LEP gene expression will
21 probably have less daily weight gain than the other in similar forage offer and
22 nutritional condition. Leptin coordinate also reproductive function, and in
23 cattle, antagonizes insulin's stimulatory effect on steroidogenesis; therefore,
24 animals with higher LEP gene expression will probably have longer CI.

1 1. Introduction

2

3 Leptin is a hormone produced by adipocytes, and its expression is
4 regulated by body fatness, energy balance, insulin, growth hormone and
5 glucocorticoids [1, 2]. It is expressed in a variety of tissues besides adipose
6 cells, including placenta [3, 4], mammary gland [5], skeletal muscle [6],
7 gastric mucosa [7], brain and pituitary [8]. Effects of food intake on leptin
8 expression in ruminants can occur at either in long-term (weeks or months),
9 mid-term (days), or short-term (minutes or hours after meal intake). Long-
10 term effects of feeding factors (animal nutritional history) are predominant,
11 and interact with mid and short-term effects [9]. Leptin may also orchestrate
12 and coordinate the reproductive status of an organism by acting as an
13 intermediate molecule between nutrition and reproduction, monitoring the
14 changes of nutritional states and probably recruiting additional molecules and
15 hormones to regulate energy metabolism and reproduction [10].

16 Several polymorphisms at the leptin and leptin receptor genes have been
17 described as influencing gain weight and obesity in different species [11]. In
18 cattle, polymorphisms at the leptin gene had been described affecting milk
19 yield, carcass traits, and reproduction [12, 13, 14]. In beef cattle, *IDVGA51*
20 STR and *LEPSau3A1* SNP had been described as affecting reproductive
21 performance, the alleles *IDVGA51*181* and *LEPSau3A1*2* increasing calving
22 interval by about 79 and 81 days, respectively [15], and the influence of
23 *BMS1074* and *BM1500* STRs on gain weight, in postpartum cows had been
24 also detected, the alleles *BMS1074*151* and *BM1500*135* reducing and
25 increasing, respectively, the daily weight gain [16]. According to these
26 authors the effects could result from the influence of these markers on LEP

1 gene expression control or from linkage disequilibrium of these alleles with
2 some LEP gene mutation, which alter leptin function or expression [15, 16].

3 In order to confirm or not their effect on LEP gene expression, this paper
4 compares the leptin mRNA levels on carriers and non-carriers animals of the
5 *IDVGA51*181*, *LEPSau3A1*2*, *BMS1074*151* and *BM1500*135* alleles,

6

7 **2. Material and Methods**

8

9 *2.1. Animals and blood sample collection*

10

11 A sample of 137 cows of a Brangus-Ibage herd was previously analyzed
12 in relation to IDVGA51, BMS1074 and BM1500 STRs and LEPSau3A1 SNP
13 alleles distribution. This is a composite beef cattle (5/8 Aberdeen Angus x 3/8
14 Nellore) resulting from the crossing between Aberdeen Angus cows (*Bos*
15 *primigenius taurus*) and Nellore bulls (*B. p. indicus*) performed by the
16 Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA, Pecuária Sul). The
17 selection program began in 1945, emphasizing body weight measurements
18 at birth, at weaning adjusted to 205 days and at 18 months of age, without
19 any special criterion on selection for fertility. All the animals have been
20 managed exclusively on native pasture in an extensive livestock system, with
21 the mating season extending from 15 November to 15 February. The
22 breeding procedure includes single sire mating in small paddocks in groups
23 of about 40 females, for paternity identification [17].

24 Blood sample was obtained from the caudal vein using EDTA, as
25 anticoagulant.

26

1 *2.2. Polymorphisms analyses*

2

3 Genomic DNA of 137 cows was extracted from total blood by the method
4 of salting out [18], and the molecular markers were analyzed using standard
5 polymerase chain reaction (PCR) conditions, using specific primers and
6 annealing temperatures [16]. The amplicons were analyzed by vertical
7 electrophoresis in 10,5 % non-denaturing polyacrylamide gel [19] those of
8 STR immediately after PCR and those of SNP after the cleavage of the
9 product with the *Sau3A1* endonuclease, according to manufacturer's
10 instructions.

11

12 *2.3. Surgery and adipose and omental fat samples collection*

13

14 After this previous analysis, animals were selected by presenting only one
15 of *IDVGA51*181* (n=6 cows), *LEPSau3A1*2* (n=4), *BMS1074*151* (n=13) or
16 *BM1500*135* (n=6) alleles, and a control group (n=4) was also obtained
17 composed by animals without any of these alleles; these individuals were
18 separated from the herd, and had their body condition visually evaluated in a
19 score classification range from 1 - very thin - to 5 – obese [20]; immediately
20 2 to 5 grams of omental and subcutaneous (at the base of the tail) adipose
21 tissue were surgically obtained after sedation with xylazine (0.2 mg/kg) and
22 local infiltration anesthesia by 2 % lidocaine. The experiment was conducted
23 at EMBRAPA Pecuária Sul, following the Principles of Veterinarian Medical
24 Ethics and the International Guiding Principles for Biomedical Research
25 Involving Animals.

1 After the beginning and before the end of the operation tissue samples
2 were immediately placed into polypropylene containers, frozen in liquid
3 nitrogen, and stored at -196°C until RNA analyses.

4

5 *2.4. Real-Time RT-PCR tests*

6

7 RNA from fat samples was extracted by silica method [21] with small
8 modifications. Briefly, 100 mg of fat samples were lysed in 900 μl of a
9 GuSCN buffer. After lysis, nucleic acids were bound to silica particles and
10 washed twice with a GuSCN-containing washing buffer, twice with 70%
11 ethanol and once with acetone. After being dried, the nucleic acids were
12 released from the silica particles in 50 μl of elution buffer.

13 Real-Time RT-PCR amplification and product reporting system was
14 based on the 5' nuclease TaqMan assay [22], and used commercial reagents
15 (TaqMan EZ RT-PCR Kit, Applied Biosystems P/N N808-0236) according to
16 the manufacturer's protocol. TaqMan primers and probe for leptin (Table 1)
17 were designed based on *B. p. taurus* leptin complete gene sequence
18 (GeneBank U50365) using Applied Biosystems Assays-by-DesignSM Service
19 for Gene Expression. 18S Ribosomal RNA control kit (Applied Biosystems
20 P/N N4308329) was used as the housekeeping gene reference to normalize
21 samples for any variation in RNA loading [23].

22

23 *2.5. Statistical analysis*

24

25 To improve accuracy each sample was tested twice and the results were
26 expressed as the mean value of the number of cycles necessary to reach the

1 threshold, which was established at the linear amplification phase of the
2 cDNA (the CT value). This value reflects the total mRNA abundance for a
3 given target RNA; a high CT value means low level of gene expression [24].

4 Leptin expression is usually correlated to body score conditions [9];
5 therefore, regression analysis was used to adjust leptin CT for the effect of
6 body score condition (BSC).

7 Data are presented as the mean \pm se CT of samples with the same
8 genotype, corrected by BSC (CT_c) and normalized by ribosomal CT, the final
9 results being expressed as relative units, $RU = CT_c \text{ Lep}/CT \text{ 18S rRNA}$ [25].
10 Comparisons between genotype RUs were made by Students t-test after
11 previous descriptive analyses to evaluate the normality of the distributions.
12 All statistical analyses were made using SPSS[®] for Windows[™] software
13 (SPSS Inc), version 10.0.5 (1999).

14

15 **2. Results**

16

17 The allele frequencies of molecular markers analyzed in Brangus-Ibague
18 cattle are presented in Table 2, the most common alleles being
19 *IDVGA51*177*, *BM1500*141*, *BMS1074*151* and *LepSau3A1*1*.

20 In previous studies *IDVGA51*181* and *LepSau3A1*2* alleles were
21 associated to greater calving interval, *LepSau3A1*2* to greater weight at first
22 calving, *BMS1074*151* to smaller daily weight gain, and *BM1500*135* to
23 greater daily weight gain [15, 16]. Based on these data, leptin mRNA levels
24 were tested on adipose tissues of animals with and without these alleles to
25 verify the effect these alleles on LEP gene expression.

1 Fig. 1 presents the Real-Time RT-PCR results of LEP and 18S rRNA
2 genes in a subcutaneous fat sample and Table 3 presents the results of
3 relative units ($RU = CT_c \text{ Lep} / CT \text{ 18S rRNA}$) for the different genotype groups.
4 The number of animals differs among groups because, to avoid interference
5 of one genotype on the effect of the others, only animals having the specific
6 allele was included on a group and animals of control group did not present
7 any of these alleles.

8 The controls LEP gene expression (which is inversely proportional to RU)
9 was lower than that of the genotype groups, which are in general very similar
10 each other. The statistical analysis indicated two significant associations,
11 animals having *IDVGA51*181* and *BMS1074*151* alleles showed mRNA
12 leptin levels higher than that of the controls ($t = 2.6, P = 0.03$; $t = 2.3, P =$
13 0.04 , respectively).

14 The analyses of omental fat mRNA indicated low LEP gene expression in
15 this tissue, the values being 33 % lower than that observed in subcutaneous
16 tissue (Fig. 2; $t = 14.8, P < 0.001$). These low omental mRNA levels did not
17 permit confidence enough to allow comparison among genotypes.

18

19 **4. Discussion**

20

21 The main leptin function is to inform the central nervous system about the
22 size of fat storages; however this mechanism is true only when the energy
23 uptake of the body is equal to the sum of energy-spending processes. In
24 negative and positive energy balance leptin level decreases and increases,
25 respectively [26]. Adipose LEP gene expression and plasma protein levels
26 are dependent on meal intake, on nutrients and hormones, on feeding level

1 and energy balance, on physiological cycles, on environmental factors, and
2 on both the present and history nutritional factors [9]. Adipose tissue secretes
3 a great number of proteins beside leptin, which putatively interact each other
4 to regulate a large number of physiological functions, including insulin-
5 sensitivity, glucose utilization and lipid synthesis, oxidation and deposition,
6 probably reflecting the great sophistication of mammalian physiological
7 regulation. In cattle, leptinemia values are similar between animals, when the
8 values are corrected for individual differences in subcutaneous adipocyte
9 size, and nutritional conditions, suggesting that plasma leptin reflects
10 primarily differences in body fatness [9].

11 Leptin seems also to exert equally important effects on gonads. The
12 expression of functional leptin receptors on the surface of ovarian follicular
13 cells, including granulosa, theca, and interstitial cells, indicates the endocrine
14 or paracrine effects of leptin on the gonads. Low concentrations of leptin
15 injected in vivo or in vitro into rat ovary reduce ovulation, with no changes in
16 steroid or growth factor secretion or in the number of preovulatory follicles.
17 However high concentrations of leptin injected in the ovary may suppress
18 estradiol production and interfere with the development of dominant follicles
19 and oocyte maturation [27]. In cattle, leptin directly antagonizes insulin's
20 stimulatory effect on thecal cell steroidogenesis [28].

21 Leptin seems also to influence lactation, the protein produced by mother
22 adipocytes appearing in the milk and being taken up by the newborn during
23 suckling. Leptin content in the milk is always higher than that in mother
24 circulation, suggesting the alveolar epithelial cells contribution to milk
25 leptinemia, and milk production stops after withdrawal of leptin. Therefore the
26 locally produced leptin is not only important to contribute to milk leptin but

1 might also play a role in supporting continuous lactation [26]. In the period
2 after delivery the leptin level decreases even in well-fed animals [29].

3 This is the first paper analyzing LEP gene expression by Real-Time RT-
4 PCR in live animals, in omental and subcutaneous adipocyte cells, surgically
5 obtained. No post operation problem was observed in any of the animals
6 investigated.

7 Our data indicated higher subcutaneous than omental fat LEP gene
8 expression. Also, *IDVGA51*181* and *BMS1074*151* alleles carriers
9 presented higher subcutaneous LEP expression than the other animals.

10 The previous results about ruminant omental and subcutaneous adipose
11 tissues leptin levels are contradictory. Some authors [30] found greater
12 expression in omental in relation to subcutaneous fat, other did not verify
13 differences between these tissues [31, 32, 33], while others described higher
14 values in subcutaneous tissue [34]. The differences seem to be dependent
15 on the species, the breed or the physiological status of the animals [9].

16 Carriers cows of *IDVGA51*181* allele have been described as having
17 calving interval (CI) 79 days longer than the other females [15]. Considering
18 the effect of leptin on reducing rat ovulation [27], on interfering on bovine
19 thecal cell steroidogenesis [28], and on influencing lactation [26], and the fact
20 that lactation delays recovery of reproductive function [35], it is expected that
21 in similar forage offer and nutritional conditions animals with higher LEP gene
22 expression, will have, as matter of fact, longer CI.

23 In relation to *BMS1074* STR, it was observed [16] that post partum
24 Aberdeen Angus *BMS1074*151* carriers had lower average daily weight gain
25 when compared with the other animals. The animals herein analyzed are non
26 pregnant cows managed on native pasture with stock rate and forage offers

1 above the maintenance diet, being, therefore in energy homeostasis.
2 Almeida's [16] sample was composed by lactating females and, therefore the
3 animals were in negative energy balance. As leptin levels control food intake,
4 animals with higher LEP gene expression will probably have less daily weight
5 gain compared with other in similar forage offer and nutritional status, but
6 having lesser LEP gene expression. This is true not only for animals in
7 energy homeostasis but also for those in negative energy balance.

8 The effect of body score conditions on LEP expression [9] do not interfere
9 in the present results because leptin expression levels have been corrected
10 by corporal score condition. The adipocyte size effect [9] is not also
11 influencing these results because the amount of adipose tissue used for RNA
12 extraction and of RNA used for RT-PCR tests was the same for all samples,
13 and because each LEP gene expression was corrected by the correspondent
14 18S rRNA gene expression.

15 LEP gene is mapped at BTA 4 at 87cM, BMS1074 and IDVGA51 STRs
16 being downstream it, at 80 and 84cM respectively [[http://locus.jouy.inra.fr/
17 fpc/cattle/WebAGCoL/WebChrom/index.html](http://locus.jouy.inra.fr/fpc/cattle/WebAGCoL/WebChrom/index.html)]. Markers downstream gene
18 sequences could be in enhancer regions, and influence on gene expression
19 by altering the transcription complex assemblage [36].

20 The absence of effect of *LepSau3A1*2* and *BM1500*135* alleles,
21 previously associated to reproduction and weight gain, on LEP gene
22 expression suggest that their effect on production, if real, is specific of the
23 previous sample and could not be applied to other populations.

24 In summary, LEP gene expression is higher in subcutaneous than
25 omental fat in a compose beef cattle herd, Brangus-Ibague. Carriers animals
26 of *IDVGA51*181* allele, previously described as having longer calving interval

1 presented high levels of LEP mRNA, confirming the negative effect of leptin
2 levels on cattle reproduction. Animals having *BMS1074*151* allele, previously
3 detected as having lower average daily weight gain, presented also higher
4 LEP gene expression, which is accordance with the leptin role in food intake
5 control. These STRs could be employed for Marker Assisted Selection to
6 obtain herds with greater growth rate and reproductive performance.

7

8 **Acknowledgments**

9

10 Thanks are due to the “Laboratório de Diagnóstico Genético Molecular,
11 ULBRA”, “SIMBIOS Biotecnologia” and their staff for the facilities provided for
12 Real-Time RT-PCR analyses. This work was supported by Conselho
13 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq,
14 EMBRAPA/Pecuária Sul, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio
15 Grande do Sul/FAPERGS and Universidade Luterana do Brasil/ULBRA.

16

17 **References**

18

19 [1] Houseknecht KL, Portocarrero CP. Leptin and its receptors: regulators of
20 whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:457-475.

21 [2] Leury BJ, Baumgard LH, Block SS, Segole N, Ehrhardt RA, Rhoads RP,
22 Bauman DE, Bell AW, Boisclair YR. Effect of insulin and growth hormone on
23 plasma leptin in periparturient dairy cows. *Am J Physiol Regul Integr Comp*
24 *Physiol* 2003;285:1107-1115.

- 1 [3] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG.
2 Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus
3 and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11073-11078.
- 4 [4] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al.
5 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived
6 hormone in humans. *Nat Med* 1997;3:1029-1033.
- 7 [5] Bonnet M, Gourdou I, Leroux C, Chilliard Y, Djiane J, Leptin expression in
8 the ovine mammary gland: Putative sequential involvement of adipose,
9 epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*
10 2002;80:723-728.
- 11 [6] Wang T, Brown MJ. mRNA quantification by real time TaqMan
12 polymerase chain reaction: validation and comparison with RNAase
13 protection. *Anal Biochem* 1999;269:198-201.
- 14 [7] Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi
15 MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The
16 stomach is a source of leptin. *Nature* 1998;394:790-793.
- 17 [8] Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd
18 RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.
19 *Endocrinology* 2000;141:333-339.
- 20 [9] Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. Leptin expression in ruminants:
21 Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism.
22 *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29:3-22.
- 23 [10] Chehab FF, Qiu J, Mounzih K, Ewart-Toland A, Ogus Scott. Leptin and
24 Reproduction. *Nutr Rev* 2002;60:39-46.
- 25 [11] Nkrumah JD, Li C, Yu J, Hansen C, Keisler DH, Moore SS.
26 Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin

- 1 concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of
2 carcass merit. *J Anim Sci* 2005;83:20-28.
- 3 [12] Liefers SC, te Pas MFW, Veerkamp RF, van der Lende T. Associations
4 between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy
5 Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *J Dairy Sci*
6 2002;85:1633-1638.
- 7 [13] Fitzsimmons CJ, Schmutz SM, Bergen RD, McKinnon JJ. A potential
8 association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef
9 cattle. *Mamm Genome* 1998;9:432-434.
- 10 [14] Hale CS, Herring WO, Johnson GS, Shibuya H, Lubahn DB, Keisler DH.
11 Evaluation of the leptin gene as a possible marker of Carcass traits in angus
12 cattle. *UMC Animal Sciences Departmental Report* 1998;25-27.
- 13 [15] Almeida SEM, Almeida EA, Moraes JCF, Weimer TA. Molecular markers
14 in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *J Anim Breed*
15 *Genet* 2003;120:106-113.
- 16 [16] Almeida SEM, Almeida EA, Terra GH, Neves JP, Weimer TA.
17 Associations between molecular markers on the LEP gene and weight gain in
18 beef cattle. *Ciência Rural* 2006: in press.
- 19 [17] Oliveira NM, Salomoni E, Leal JJB. Genetic and environmental effects
20 on growth of 3/8 Nellore X 5/8 Aberdeen Angus beef cattle derived from
21 different crossbreeding schemes. *Arch Latinoam Prod Anim* 1998;6:173-188.
- 22 [18] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for
23 extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*
24 1988;16:1215.
- 25 [19] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. New
26 York: Cold Spring Harbor, 2001.

- 1 [20] Lowman BG. Condition scoring of cattle. East of Scotland College of
2 Agriculture, Bulletin 1973;6:1-31.
- 3 [21] Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen C L, Wertheim-Van Dillen
4 PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic
5 acids. J Clin Microbiol 1990;28:495-503.
- 6 [22] Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand.. Detection
7 of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3'
8 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad
9 Sci 1991;88:7276-7280.
- 10 [23] Voge JL, Santiago CA, Aad PY, Goad DW, Malayer JR, Spicer LJ.
11 Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-
12 time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and
13 gonadotropins. Domest Anim Endocrinol 2004;26:241-258.
- 14 [24] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR.
15 Genome Res 1996;10: 986-994.
- 16 [25] Schoof E, Stuppy A, Harig F, Carbon R, Horbach T, Stohr W, Rascher
17 W, Dotsch J. Comparison of leptin gene expression in different adipose
18 tissues in children and adults. Eur J Endocrinol 2004;150:579-584.
- 19 [26] Bartha T, Sayed-Ahmeda A, Rudas P. Expression of leptin and its
20 receptors in various tissues of ruminants. Domest Anim Endocrinol
21 2005;29:193–202.
- 22 [27] Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT,
23 Magoffin DA, Norman RJ. The in Vivo and in Vitro Effects of Exogenous
24 Leptin on Ovulation in the Rat. Endocrinology 2000;141:1971-1976.
- 25 [28] Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits
26 bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. Biol Reprod 1998;58:207-212.

- 1 [29] Liefers SC, Veerkamp RF, Te Pas MF, Chilliard Y, Van der Lende T.
2 Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domest Anim*
3 *Endocrinol* 2005;29:227-238.
- 4 [30] Ren MQ, Wegner J, Bellmann O, Brockmann GA, Schneider F,
5 Teuscher F, et al. Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin
6 receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle. *Domest Anim*
7 *Endocrinol* 2002;23:371-381.
- 8 [31] Ji S, Willis GM, Scott RR, Spurlock ME. Partial cloning and expression of
9 the bovine leptin gene. *Anim Biotechnol* 1998;9:1-14.
- 10 [32] Kim H, Chi Y, Chung K, Kim K, Choi Y, Baik M. Differential response of
11 obese gene expression from fasting in bovine adipose tissues. *Biosci*
12 *Biotechnol Biochem* 2000;64:2240-2242.
- 13 [33] Chelikani PK, Glimm DR, Kennelly JJ. Tissue distribution of leptin and
14 leptin receptor mRNA in the bovine. *J Dairy Sci* 2003;86:2369-2372.
- 15 [34] Kumar B, Francis SM, Suttie JM, Thompson MP. Expression of obese
16 mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. *Comp Biochem*
17 *Physiol B Biochem Mol Biol* 1998;120:543-548.
- 18 [35] Butler WR. Relationships of Negative Energy Balance with Fertility. *Adv*
19 *In Dairy Techn* 2005;17:35-46.
- 20 [36] Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes:
21 structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004;21:991-1007.

1 Table 1. Leptin primers and probe designed based on *B. p. taururs* leptin
 2 complete gene sequence

3

Primers / probe	Sequence	Gene Position
LEPTIN primer F	5' AGGTCCAGGATGACACCAAAC 3'	Exon 2
LEPTIN primer R	5' CCAGTGACCCTCTGTTTGGGA 3'	Exon 3
TaqMan [®] MGB LEPTIN probe	5' FAM TCACACACGCAGTCCGT NFQ 3'	Exon 2/ exon 3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1

2 Table 2. STR allele frequencies in a Brangus-Ibage herd

Genetic Markers							
IDVGA51 (n=131)		BM1500 (n=133)		BMS1074 (n=133)		LepSau3A1(n=126)	
Alleles	Frequency	Alleles	Frequency	Alleles	Frequency	Alleles*	Frequency
171	0.02	135	0.21	151	0.44	1	0.91
173	0.02	137	0.01	153	0.16	2	0.09
175	0.17	141	0.69	155	0.24		
177	0.38	143	0.08	157	0.13		
179	0.21	149	0.01	159	0.03		
181	0.14						
183	0.05						

3

4 n: analyzed numbers; the numbers differ among systems due to amplification
5 problems of some samples; *1: absence of restriction site, 2: presence of
6 restriction site

7

8

9

10

11

12

13

14

1

2 Table 3: Relative units of subcutaneous CT (CT_c Lep/CT 18S rRNA) in
 3 animals with different genotypes.

4

Genotypes	Number	RU	t test
		mean \pm se	
<i>IDVGA51*181^a</i>	6	1.315 \pm 0.02	2.60; 8 df; P=0.03
<i>BM1500*135^a</i>	6	1.397 \pm 0.06	0.73; 8 df; P=0.48
<i>BMS1074*151^a</i>	13	1.317 \pm 0.03	2.32; 15 df; P=0.04
LepSau3A1 2/1	4	1.327 \pm 0.06	1.54; 6 df; P=0.18
Control	4	1.458 \pm 0.07	

5

6 ^a homo or heterozygote for this allele; Control: animals without any of these
 7 alleles; CT_c : CT LEP corrected by body score condition.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1

2 Figure Captions:

3

4 Fig. 1. Real-Time detection of LEP and 18S rRNA transcripts in Brangus-
5 Ibage subcutaneous adipose tissue.

6

7 Fig. 2. LEP gene expression in Brangus-Ibage subcutaneous and omental
8 adipose tissues. Results in $RU = CT_c \text{ LEP}/CT \text{ 18S rRNA}$. Subcutaneous:
9 1.36 ± 0.02 ; omental: 1.81 ± 0.02 ; t: 14,77 40GL $P < 0,001$. $CT_c \text{ LEP} = CT \text{ LEP}$
10 correct by body score condition.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

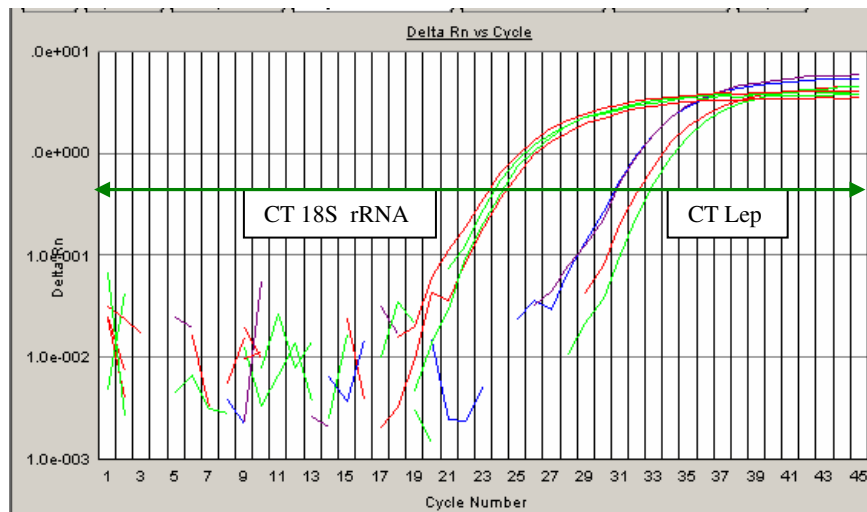
22

23

24

25

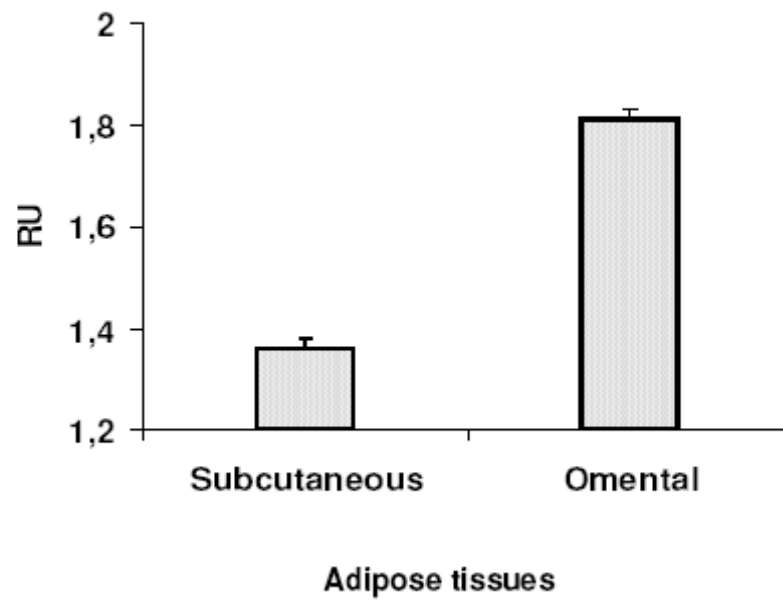
1
2
3
4
5
6
7



8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Figure 1. Passos et al., 2006

1
2
3
4
5
6



7
8
9
10
11
12
13
14
15

Figure 2. Passos et al., 2006

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Em ruminantes, a leptina é expressa em tecidos fetais, glândulas pituitária e mamária, rúmen, abomaso e duodeno, mas o gene é principalmente funcional no tecido adiposo. A quantidade de proteína é determinada pelo estado nutricional, grau de gordura corporal, e número de adipócitos. Sua ação pode se dar via endócrina, no cérebro e tecidos periféricos, onde são expressos seus receptores (gônadas, hipotálamo, pituitária) ou como sinal parácrino ou autócrino nos tecidos onde é produzida (SANSINANEIA et al., 2001; CHILLIARD et al., 2005). Os níveis de expressão do gene LEP e da proteína circulante variam conforme o estado fisiológico do animal e podem ser dependentes de diferentes tratamentos hormonais (Tabela IV.1).

Os valores de leptina circulantes, em bovinos dependem ainda, do tamanho das células gordurosas, pois quando corrigidos pelas diferenças individuais nos tamanhos dos adipócitos, os valores de leptinemia são similares, sugerindo que a leptina plasmática reflete não só as diferenças na quantidade de adipócitos, mas também em seu tamanho (DELVAUD et al., 2002).

O tecido adiposo secreta, além da leptina, um grande número de proteínas que interagem, hipoteticamente, para regular muitas funções fisiológicas, incluindo a sensibilidade a insulina, a utilização de glicose e a síntese, oxidação e deposição de lipídios, o que reflete a grande sofisticação da regulação fisiológica dos mamíferos e a adaptação para sobrevivência em uma ampla variedade de ambientes (CHILLIARD et al., 2005).

Tabela IV.1 Efeitos de fatores fisiológicos e de tratamentos hormonais nos níveis de expressão da leptina em adipócitos (mRNA) ou da proteína no plasma, em ruminantes.

Espécie	Tecido	Avaliação	Fisiologia ou tratamento	Expressão
Bovina e Ovina	Plasma	In vivo	Homeostasia energética	Normal
Bovina e Ovina	Plasma	In vivo	Perda de peso	Diminuição
Bovina e Ovina	Plasma	In vivo	Jejum	Diminuição
Bovina e Ovina	Plasma	In vivo	Ganho de peso	Aumento
Bovina e Ovina	Plasma	In vivo	Dieta hiper-calórica	Aumento
Ovina	Adipócitos	In vitro	Insulina	Aumento
Bovina e Ovina	Adipócitos	In vitro	Dexametasona	Aumento
Bovina	Plasma	In vivo	Dexametasona	Normal
Bovina (pós-parto)	Plasma	In vivo	Dexametasona	Pequeno aumento
Ovina (após ovariectomia)	Plasma	In vivo	Estrógenos/progestágenos sintéticos	Normal
Ovina	Plasma	In vivo	Ciclando	Normal
Bovina	Plasma	In vivo	Progestágenos (sincronização de estro)	Desconhecido
Ovina	Plasma	In vivo	Progestágenos (sincronização de estro)	Pequeno aumento
Bovina	Plasma	In vivo	Mastite	Normal
Bovina	Plasma	In vivo	Metrite	Redução
Bovina	Adiposo	In vivo	1-4 semanas pré-parto	Aumento
Bovina	Adiposo	In vivo	≤ 8 semanas pós-parto	Redução

Revisões em KULCSÁR et al. (2005) e CHILLIARD et al. (2005).

A principal função da leptina é informar ao sistema nervoso central sobre as reservas de gordura, reduzindo a ingestão de alimento e aumentando o gasto energético. No entanto, isto só é verdadeiro quando o

animal está em equilíbrio energético; caso ocorra balanço energético negativo ou positivo os níveis de leptina decrescem ou aumentam, respectivamente (BARTHA et al., 2005).

A leptina pode também coordenar o status reprodutivo de um organismo não só atuando como uma molécula intermediária entre a nutrição e a reprodução, ao monitorar as mudanças do status nutricional e requisitar moléculas e hormônios adicionais para regular o metabolismo energético e a reprodução (CHEHAB et al., 2002), como também, exercendo efeitos parácrinos e/ou endócrinos nas gônadas.

Estes efeitos decorrem da expressão de receptores de leptina funcionais na superfície das células dos folículos ovarianos, incluindo granulosa, teca, e células intersticiais. Em ratos, a injeção de baixas concentrações de leptina, em ovários, in vivo ou in vitro, reduz a ovulação, sem alterar a secreção de esteróides, de fatores de crescimento ou o número de folículos pré-ovulatórios; no entanto, em altas concentrações, a leptina pode suprimir a produção de estradiol e interferir com o desenvolvimento de folículos dominantes e com a maturação do oócito (MOSCHOS, et al., 2002). Em roedores e primatas, baixos níveis de leptina circulante estão associados com baixa secreção de gonadotrofinas, como LH e FSH, sendo que o tratamento com leptina exógena pode reverter o atraso na maturação sexual (CUNNINGHAM et al., 1999).

Em ruminantes, a restrição calórica gera decréscimo drástico nos níveis de leptina circulante, funcionando como um importante fator na adaptação de animais desnutridos, podendo ser um sinal para estimular o bloqueio da reprodução, a secreção de glicocorticóides e o comportamento de ingesta calórica (CUNNINGHAM et al., 1999; AMSTALDEN et al., 2000;

CHILLIARD et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002). Em bovinos, a leptina antagoniza o efeito estimulatório da insulina na produção de esteróides pelas células da teca (SPICER & FRANCISCO, 1998).

Em fêmeas bovinas, no pós-parto, os níveis de leptina plasmática decrescem, mesmo em animais bem alimentados, o que parece sugerir o custo energético da produção de leite, embora não haja indicação que isso seja devido ao estímulo da sucção (LIEFERS et al., 2005).

A expressão multifocal da leptina e a ocorrência de receptores no hipotálamo, pituitária e gônadas indica que a regulação do status nutricional e da reprodução, pela leptina, é uma rede de interações complexa (MOSCHOS et al., 2002).

Este foi o primeiro trabalho que investigou a influência de polimorfismos nos níveis de expressão do gene da leptina, em bovinos vivos, pelo método quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR). Obtiveram-se amostras de tecido adiposo subcutâneo e omental, cirurgicamente, de vacas adultas, não prenhes, pertencentes a um rebanho da raça Brangus-Ibagé, criado em condições naturais e em pastagem nativa. Os procedimentos realizados para a coleta das amostras não acarretaram complicações pós-cirúrgicas a nenhum dos indivíduos.

Os animais foram genotipados e as análises de expressão realizadas em indivíduos com ou sem a presença dos alelos previamente associados por ALMEIDA et al. (2003 e 2006) a características produtivas, *IDVGA51*181* e *LepSau3A1*2*, influenciando a reprodução e *BM1500*135* e *BMS1074*151*, o ganho de peso.

Os tamanhos amostrais das análises de expressão gênica diferem entre os grupos de estudo, porque, para evitar interferência entre os efeitos

dos genótipos, foram utilizados, em cada grupo, animais com apenas um dos alelos e, para o controle, indivíduos com nenhum dos alelos de possível predisposição a melhor ou pior desempenho produtivo.

Verificou-se alta variabilidade genética nestas amostras, similar ao observado por ALMEIDA et al. (2003), como seria esperado para raças compostas, como a Brangus-Ibagé.

Os níveis de mRNA de leptina em gordura omental na raça Brangus-Ibagé foram significativamente menores que os observados em adipócitos de tecido subcutâneo ($P < 0,001$). Estudos de expressão da leptina em bovinos são muito raros e os resultados contraditórios. REN et al. (2002), verificaram maior expressão nos depósitos de gordura omental do que na subcutânea, enquanto JI et al. (1998), KIM et al. (2000) e CHELIKANI et al. (2003), não observaram diferenças nos níveis de mRNA entre gordura subcutânea e omental. No entanto, a expressão desse gene foi maior no tecido subcutâneo que no omental, em ovinos (KUMAR et al., 1998). Assim, as diferenças na expressão da leptina entre os tecidos podem ser dependentes da raça, da espécie investigada ou do estado fisiológico dos animais. É importante salientar que, com exceção deste trabalho, os demais estudos foram realizados em amostras de abatedouro e que, geralmente, os animais, antes do abate são mantidos por pelo menos 24 horas de dieta hídrica, o que pode interferir nos níveis circulantes desta proteína.

Os experimentos desta investigação demonstraram que, no tecido adiposo subcutâneo, existem variações nos níveis de leptina, corrigidos pela condição corporal, mesmo dentro dos grupos submetidos às mesmas condições alimentares, isto é, mesmo status nutricional. Animais portadores dos alelos *IDVGA51*181* e *BMS1074*151* apresentaram níveis de expressão

de leptina significativamente maiores que os animais do grupo controle ($P=0,03$ e $P=0,04$, respectivamente), sugerindo o efeito desses genótipos na regulação da expressão do gene LEP. Os outros alelos estudados, *LepSau3A1*2* e *BM1500*135* não apresentaram associação significativa nos níveis de leptina em relação ao grupo controle ($P=0,18$ e $P=0,48$, respectivamente).

Fêmeas da mesma raça, portadoras do alelo *IDVGA51*181*, haviam sido descritas por ALMEIDA et al. (2003), como apresentando um intervalo entre partos 79 dias maior do que as demais fêmeas.

Considerando-se os achados do efeito da leptina na redução da ovulação (DUGGAL et al., 2000), na produção de esteróides pela teca (SPICER & FRANCISCO, 1998), na lactação (BARTHA et al., 2005) e o retardo, decorrente da lactação, da recuperação das funções reprodutivas de bovinos, no pós-parto (BUTLER, 2005), é de se esperar que animais com altos níveis de expressão do gene LEP teriam, de fato, um maior intervalo entre partos.

Em relação ao STR BMS1074, ALMEIDA et al. (2006) observaram, que fêmeas, no pós-parto, da raça Aberdeen Angus, portadoras do alelo *BMS1074*151*, apresentavam um ganho médio de peso diário menor, quando comparadas com o restante da população.

Considerando o papel da leptina no controle da ingestão de alimentos, é de esperar que indivíduos expressando maiores níveis de mRNA de LEP tenham um ganho de peso diário menor do que aqueles com menores valores circulantes desta proteína, desde que estejam em mesma condição corporal e regime alimentar.

Os dados obtidos neste trabalho revelaram a influência de polimorfismos nos níveis de expressão do gene da leptina, em bovinos de corte, possibilitando uma maior compreensão das relações destes polimorfismos no gene LEP e as variações fisiológicas acarretadas pelos diferentes níveis de expressão da leptina. Os resultados, se aplicados na seleção assistida por marcadores, possibilitarão a obtenção de rebanhos mais produtivos, já que os alelos *IDVGA51*181* e *BMS1074*151*, ambos associados a pior desempenho, apresentam frequências consideráveis (14 e 44%, respectivamente), podendo ser, facilmente, reduzidas pela não inclusão de seus portadores entre os reprodutores das próximas gerações.

CAPÍTULO V

RESUMO E CONCLUSÕES

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Os caracteres produtivos são normalmente influenciados por muitos fatores, sendo difícil determinar todos os locos envolvidos em um fenótipo específico. Por isso, a seleção animal tem se baseado principalmente em uma estimativa direta ou indireta do fenótipo.

A leptina é um importante regulador do metabolismo energético, da adiposidade e da reprodução. E por desempenhar diferentes funções, pode ser considerado um bom gene candidato para o estudo de associações entre marcadores moleculares e a eficiência reprodutiva ou ganho de peso.

Em várias espécies, têm sido descritos diversos polimorfismos no gene da leptina, influenciando o ganho de peso, a reprodução, e outras características produtivas. Em bovinos, o STR *IDVGA51* e o SNP *LEPSau3A1*, foram descritos por afetarem a performance reprodutiva, os alelos *IDVGA51*181* e *LEPSau3A1*2* estando associados a um aumento no intervalo entre partos de 79 e 81 dias, respectivamente, e os STRs *BMS1074* e *BM1500* afetam o ganho de peso, em vacas, no pós-parto: os alelos *BMS1074*151* e *BM1500*135* reduzindo e aumentando, respectivamente, o ganho de peso diário.

Para confirmar o efeito ou não destes alelos na expressão do gene da leptina, este trabalho comparou os níveis de mRNA de leptina em animais portadores e não portadores dos alelos *IDVGA51*181*, *LEPSau3A1*2*, *BMS1074*151* e *BM1500*135*, com os objetivos de:

1. Verificar as distribuições genótípicas e alélicas dos marcadores *IDVGA51*, *BMS1074*, *BM1500* e *LEPSau3A1*, em uma amostra de 137 bovinos da raça Brangus-Ibagé, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Pecuária Sul, Bagé-RS).

2. Identificar, no rebanho, animais portadores e não portadores dos alelos *IDVGA51*181*, *LEPSau3A1*2*, *BMS1074*151* ou *BM1500*135*, previamente descritos como associados à eficiência reprodutiva e ganho de peso.

3. Avaliar os animais, criados em campo nativo, com pastagem natural, quanto à sua condição corporal.

4. Realizar procedimento cirúrgico, para obtenção de amostras de tecido adiposo subcutâneo e omental.

5. Dosar os níveis de mRNA de leptina nos adipócitos destes dois tecidos, através do método quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR), comparando a expressão do gene *LEP* entre indivíduos portadores e não portadores dos alelos de predisposição a ganho de peso e desempenho reprodutivo.

Os resultados e conclusões deste trabalho foram:

1. Foi detectada alta variabilidade genética nas amostras estudadas, como seria esperado para raças compostas, como a Brangus-Ibagé, sendo os alelos mais freqüentes para os marcadores estudados, *IDVGA51*177*, *BM1500*141*, *BMS1074*151* e *LepSau3A1*1*.

2. Os níveis de expressão de leptina foram 33% maiores no tecido adiposo subcutâneo do que no omental.

3. Animais portadores dos alelos *IDVGA51*181*, previamente associados com maior intervalo entre partos, apresentaram níveis de expressão de leptina significativamente maiores que os animais do grupo controle. A leptina reduz a ovulação, inibe a produção de esteróides e estimula a lactação; por outro lado a lactação retarda a recuperação das funções reprodutivas de bovinos, no pós-parto. Portanto, pode-se esperar que animais com altos níveis de expressão do gene LEP teriam, como de fato, um maior intervalo entre partos.

4. Os animais portadores do alelo *BMS1074*151*, previamente associados com ganho de peso médio diário menor, apresentaram níveis de expressão de leptina significativamente maiores que os animais do grupo controle. Considerando o papel da leptina no controle da ingestão de alimentos é de esperar que indivíduos expressando maiores níveis de mRNA de LEP tenham um ganho de peso diário menor do que aqueles com menores valores circulantes desta proteína, desde que estejam em mesma condição corporal e regime alimentar.

5. Nenhuma diferença na expressão de leptina foi observada nos animais portadores dos alelos *LepSau3A1*2* e *BM1500*135*, previamente associados com eficiência reprodutiva e ganho de peso. Portanto, os seus efeitos na produção, se verdadeiros, poderiam ser devido a um desequilíbrio de ligação destes alelos com alguma mutação no gene ou outro fator

particular, sendo específicos para as amostras anteriormente estudadas e não poderiam ser aplicados em outras populações.

6. O efeito da condição corporal na expressão de LEP não interferiu nos resultados, já que os níveis de expressão de leptina foram corrigidos pela condição corporal.

7. O efeito do tamanho dos adipócitos também não influenciou os resultados, uma vez que, a quantidade de tecido adiposo utilizado para a extração de RNA e o RNA utilizado nas reações da RT-PCR, foram iguais para todas as amostras, e ainda, os valores de expressão do gene LEP foram normalizados com os valores de expressão do gene constitutivo de RNA ribossomal 18S.

8. O gene LEP está localizado no cromossomo BTA 4 a 87 cM, e os STRs, BMS1074 e IDVGA51 estão 3' do gene ("downstream"), a 80 e 84 cM respectivamente. Marcadores além da seqüência gênica, podem estar localizados em regiões "enhancer" e influenciarem a expressão do gene, modificando a montagem do complexo de transcrição.

9. Os STRs IDVGA51 e BMS1074 poderiam ser empregados na Seleção Assistida por Marcadores (MAS) para obtenção de animais com maior taxa de crescimento e eficiência reprodutiva.

CAPÍTULO VI

SUMMARY AND CONCLUSIONS

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Production characters are usually determined by multifactorial factors being difficult to determine all the individual loci involved in a specific phenotype. Therefore, animal selection had been so far applied based mainly on phenotype direct and indirect estimates.

Leptin is an important regulator of energy metabolism, adiposity and reproduction. Due to these different roles it could be considered a good candidate gene for the study of association between molecular markers and reproductive efficiency or weight gain.

Several polymorphisms at the leptin gene have been described as influencing weight gain, reproduction, and other productive traits in different species. In cattle, *IDVGA51* STR and *LEPSau3A1* SNP had been described as affecting reproductive performance, the alleles *IDVGA51*181* and *LEPSau3A1*2* increasing calving interval by about 79 and 81 days, respectively, and *BMS1074* and *BM1500* STRs seem to be related to weight gain, in postpartum cows, the alleles *BMS1074*151* and *BM1500*135* reducing and increasing, respectively, the daily weight gain.

In order to confirm or not their effect on leptin gene expression, this paper compares the leptin mRNA levels on carriers and non-carriers animals of the *IDVGA51*181*, *LEPSau3A1*2*, *BMS1074*151* and *BM1500*135* alleles, with the objectives:

1. To verify genotype and allele frequencies of *IDVGA51*, *BMS1074*, *BM1500* STRs e *LEPSau3A1* SNP in a sample of 137 Brangus-Ibagé cows from the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Pecuária Sul, Bagé-RS).
2. To identify in this herd carriers and non carriers of *IDVGA51*181*, *LEPSau3A1*2*, *BMS1074*151* or *BM1500*135* alleles, previously described as associated to reproduction or weight gain.
3. To evaluate the body score conditions of the animals managed on native pasture in an extensive livestock system.
4. To perform surgery in these animals to obtain adipose omental and subcutaneous tissues.
5. To evaluate adipocyte mRNA levels of these two tissues, through Real-Time RT-PCR, comparing the values between animals with and without these alleles.

The main results and conclusions here obtained were:

1. A great variability was observed in Brangus-Ibagé animals, as expected for composite breeds, the most frequent alleles being *IDVGA51*177*, *BM1500*141*, *BMS1074*151* and *LepSau3A1*1*.
2. The leptin expression was 33% higher in subcutaneous than in omental adipose tissue.
3. Carriers animals of *IDVGA51*181* allele, previously described as having longer calving interval (CI) presented significantly higher leptin levels than animals without this allele. Leptin reduces ovulation, inhibits steroidogenesis and stimulates lactation; on other hand lactation delays

recovery of reproductive functions. Therefore animals having high leptin expression will have, as a matter of fact, longer CI.

4. Carriers animals of *BMS1074*151* allele, previously described as having less daily weight gain, presented significantly higher LEP gene expression. As leptin levels control food intake, animals with higher LEP gene expression will probably have less daily weight gain compared with others in similar forage offer and nutritional status, but having lesser LEP gene expression.

5. No difference in leptin expression was observed for *LepSau3A1*2* and *BM1500*135* carriers, previously associated to reproduction and weight gain. Therefore, their effect on production, if real, could be due to linkage disequilibrium of these alleles with some LEP gene mutation or other particular factor, being specific of the previous sample and could not be applied to other populations.

6. The effect of body score conditions on LEP expression do not interfere in the present results because leptin expression level have been corrected by corporal score condition.

7. The adipocyte size effect is not also influencing these results because the amount of adipose tissue used for RNA extraction and of RNA used for RT-PCR tests was the same for all samples, and because each LEP gene expression was corrected by the correspondent 18S rRNA gene expression.

8. LEP gene is mapped at BTA 4 at 87 cM, *BMS1074* and *IDVGA51* STRs being downstream it, at 80 and 84 cM respectively. Markers downstream gene sequences could be in enhancer regions, and influence on gene expression by altering the transcription complex assemblage.

9. IDVGA51 and BMS1074 STRs could be employed for Marker Assisted Selection to obtain animals with greater growth rate and reproductive performance.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 120, p. 106-113, 2003.
- ALMEIDA, S.E.M.; ALMEIDA, E.A.; TERRA, G.H.; NEVES, J.P.; WEIMER, T.A. Associations between molecular markers on the *LEP* gene and weight gain in beef cattle, 2006 (**submitted**).
- ALMEIDA, S.E.M.; MACHADO, M.S.N.; STEIGLEDER, C.S.; GAMA, C.L.; HUTZ, M.H.; HENKES, L.E.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Genetic diversity in a Brazilian bovine herd based on four STRs loci. **Genet. Mol. Biol.**, v.23, p.347-350, 2000.
- 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 I(1). **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 127-133, 2000.
- AUWERX, J.; STAELS, B. Leptin. **Lancet**, v. 351, p. 737-742, 1998.
- BARSH, G.S.; FAROOQI, I.S.; O'RAHILLY, S. Genetics of body-weight regulation. **Nature**, v. 404, p. 644-651, 2000.

- BARTHA, T; SAYED-AHMED, A.; RUDAS, P. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 29, p. 193-202, 2005.
- BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WINKELMAN-SIM, D.C.; SCHMUTZ, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genet. Sel. Evol.**, v. 34, p. 105-116, 2002.
- BUTLER, W.R. Relationships of Negative Energy Balance with Fertility. **Adv. In Dairy Techn.**, v. 17, p. 35-46, 2005.
- CHEHAB, F.F.; QIU, J.; MOUNZIH, K.; EWART-TOLAND, A.; OGUS SCOTT. Leptin and Reproduction. **Nutr. Rev.**,v. 60, p. 39-46, 2002.
- CHELIKANI, P.K.; GLIMM, D.R.; KENNELLY, J.J. Short communication: Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2369-2372, 2003.
- CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L.A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S.J.; LAKEY, N.D.; CULPEPPER, J.; MOORE, K.J.; BREITBART, R.E.; DUYK, G.M.; TEPPER, R.I.; MORGENSTERN, J.P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, p. 491-495, 1996.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 21, p. 271-295, 2001.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 29, p. 3-22, 2005.

CLEMENT, K.; VAISSE, C.; LAHLOU, N.; CABROL, S.; PELLOUX, V.; CASSUTO, D.; GOURMELEN, M.; DINA, C.; CHAMBAZ, J.; LACORTE, J.M.; BASDEVANT, A.; BOUGNERES, P.; LEBOUÇ, Y.; FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, p. 398-401, 1998.

COMINGS, D.E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. **Mol. Pysich.**, v. 3, p.21-31, 1998.

CONSIDINE, R.V.; CONSIDINE, E.L.; WILLIAMS, C.J.; HYDE, T.M.; CARO, J.F. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. **Diabetes**, v. 45, p. 992-994, 1996.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 216-222, 1999.

- DAVIS, G.P.; DeNISE, S.K. The impact of molecular markers on selection. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 2331-2339, 1998.
- DE KONING, G.J.; WELLER, J.I. Efficiency of direct selection on quantitative trait loci for a two-trait breeding objective. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 669, 1994.
- DE LA BROUSSE, F.C.; SHAN, B.; CHEN, J.L. Identification of the promoter of the mouse obese gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 4096-4101, 1996.
- DELAVAUD, C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D.H.; GERTLER, A.; KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. **J. Endocrinol.**, v. 165, p. 519-526, 2000.
- DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FALCONNIER, Y.; BOCQUIER, F.; KANN, G.; CHILLIARD, Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effect of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **J. Anim. Sci.**, v. 80, p. 1317-1328, 2002.
- DUGGAL, P.S.; VAN DER HOEK, K.H.; MILNER, C.R.; RYAN, N.K.; ARMSTRONG, D.T.; MAGOFFIN, D.A.; NORMAN, R.J. The in Vivo and in Vitro Effects of Exogenous Leptin on Ovulation in the Rat. **Endocrinology**, v. 141, p. 1971-1976, 2000.

ECHWALD, S.M.; SORENSEN, T.D.; SORENSEN, T.I.; TYBJAERGHANSEN, A.; ANDERSEN, T.; CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L.; PEDERSEN, O. Amino acid variants in the human leptin receptor: lack of association to juvenile onset obesity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 233, p. 248-252, 1997.

EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; van AMBURGH, M.E.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, Y.R. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulation leptin in cattle and sheep. **J. Endocrinol.**, v. 166, p. 519-528, 2000.

EPSTEIN, H. The Origin of the Domestic Animals of Africa. **Africana Publishing Cooperation**, New York, v. 1, p. 185–555, 1971.

EPSTEIN, H.; MASON, I.L. Cattle. In: **Evolution of Domesticated Animals (Mason, I.L., ed.)**. Longman, New York, p. 6-27, 1984.

FAO. **Faostat Agricultural data**. <http://faostat.fao.org>. 2006.

FRIEDMAN. O papel da Leptina e de seus Receptores no Metabolismo da Gordura. In: SOARES, M.A.M.; GUIMARÃES, S.E.F. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. Disponível em http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_pt.pdf, acesso em julho de 2006.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theor. Appl. Genet.**, v. 46, p.319-330, 1975.

- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.
- GOTODA, T.; MANNING, B.S.; GOLDSTONE, A.P.; IMRIE, H.; EVANS, A.L.; STROSBERG, A.D.; MCKEIGUE, P.M.; SCOTT, J.; AITMAN, T.J. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 869-876, 1997.
- HE, Y.; CHEN, H.; QUON, M.J.; REITMAN, M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 28887-28891, 1995.
- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 10, p. 986-994, 1996.
- HOLLENBERG, A.N.; SUSULIC, V.S.; MADURA, J.P.; ZHANG, B.; MOLLER, D.E.; TONTONOZ, P.; SARRAF, P.; SPIEGELMAN, B.M.; LOWELL, B.B. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 5283-5290, 1997.
- HWANG, C.S.; MANDRUP, S.; MacDOUGALD, O.A.; GEIMAN, D.E.; LANE, M.D. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 873-877, 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE.

Opinion 2027 (Case 3010). Usage of 17 specific names based on wild species which are pre-dated by or contemporary with those based on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): conserved.

Bull. Zool. Nomencl., v. 60, p. 81-84, 2003.

JAUME, C.M.; MORAES, J.C.F. Importância da condição corporal na eficiência reprodutiva do rebanho de cria. **Editores EMBRAPA**, Bagé, v.43 p.1-30, 2002.

JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R.; SPURLOCK, M.E. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. **Anim. Biotechnol.**, v. 98, p. 1-14, 1998.

KIM, H.; CHI, Y.; CHUNG, K.; KIM, K.; CHOI, Y.; BAIK, M. Differential response of obese gene expression from fasting in bovine adipose tissues. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 2240-2242, 2000.

KIM, J.B.; SARRAF, P.; WRIGHT, M.; YAO, K.M.; MUELLER, E.; SOLANES, G.; LOWELL, B.B.; SPIEGELMAN, B.M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1-9, 1998.

KULCSAR, M.; JANOSI, S.; LEHTOLAINEN, T.; KATAI, L.; DELAVAUD, C.; BALOGH, O.; CHILLIARD, Y.; PYORALA, S.; RUDAS, P.; HUSZENICZA, G. Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 29, p. 214-226, 2005.

- KUMAR, B.; FRANCIS, S.M.; SUTTIE, J.M.; THOMPSON, M.P. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 120, p. 543-548, 1998.
- LEE, G.H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.M.; CARROLL, K.M.; DARVISHZADEH, J.G.; LEE, J.I.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**. v. 379, p. 632-635, 1996.
- LENSTRA, J.A.; BRADLEY, D.G. Systematics and phylogeny of cattle. **In: The genetics of cattle**. R. Fries and A. Ruvinsky, eds. CAB International, Wallingford, U.K., p. 1-14, 1999.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, p. 991–1007, 2004.
- LIEFERS, S.C. Physiology and genetics of leptin in periparturient dairy cows. Ph.D. Thesis, Animal Breeding and Genetics, Wageningen University, Wageningen and Division Resources Development, Animal Sciences Group, Lelystad, 2004.
- LIEFERS, S.C.; VEERKAMP R.F.; te PAS, M.F.W.; DELAVALD, C.; CHILLIARD, Y.; PLATJE, M; van der LENDE, T. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. **Anim. Genet.**, v. 36, p. 111-118, 2005.

- LIEFERS, S.C.; VEERKAMP, R.F.; te PAS, M.F.W.; DELAVALD, C.; CHILLIARD, Y.; van der LENDE, T. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Anim. Genet.**, v. 35, p. 138-141, 2004.
- LOFTUS, R.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Nat. Sci., USA**, v.91, p. 2757-2761, 1994.
- MA, Z.; GINGERICH, R.I.; SANTIAGO, J.V.; KLEIN, S.; SMITH, C.H.; LANDT, M. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. **Clin. Chem.**, v. 42, p. 942-946, 1996.
- MACHUGH, D.E. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Ph.D. thesis, University of Dublin, pp. 257, 1996.
- MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071-1086, 1997.
- MASON, M.M; HE, Y; CHEN, H; QUON, M.J.; REITMAN, M. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. **Endocrinology**. v. 139, p. 1013-1022, 1998.
- MILLER, S.G.; de VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; WONG, K.; HERMANN, T.; STAELS, B.; BRIGGS, M.R.; AUWERX, J. The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5507-5511, 1996.

- MORAES, J.C.F. O uso de tecnologias e a produção de bovinos de corte. **O Embrião**, v. 2, p. 9, 2002.
- MOSCHOS, S.; CHAN, J.L.; MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil. Steril.**, v. 77, p. 433-444, 2002.
- MURPHY, L.D.; HERZOG, C.E.; RUDICK, J.B.; FOJO, A.T.; BATES, S.E. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. **Biochemistry**, v. 45, p. 10351-10356, 1990.
- NEIMANN-SORENSEN, A.; ROBERTSON, A. The association between blood groups and several production characteristics in three Danish cattle breeds. **Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.**, v. 11, p. 71-83, 1961.
- OLIVEIRA, N.M.; SALOMONI, E.; LEAL, J.J.B. Genetic and environmental effects on growth of 3/8 Nelore X 5/8 Aberdeen Angus beef cattle derived from different crossbreeding schemes. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v. 6, p. 173-188, 1998.
- PAYNE, W.J.A. Domestication: A step forward in civilization. In: **Cattle Genetic Resources**. (eds. Hickman). World Animal Series, Publ. Elsevier, v. B7, p. 51-72, 1991.
- PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético: bases para a produção do zebu. **Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte 1^a. ed, v. 1, pp.159, 1997.
- PFISTER-GENSKOW, M.; HAYES, H.; EGGEN, A.; BISHOP, M.D. Chromosomal localization of the bovine obesity (OBS) gene. **Mamm. Genome**, v. 7, p. 398-399, 1996.

- REN, M.Q.; WEGNER, J.; BELLMANN, O.; BROCKMANN, G.A.; SCHNEIDER, F.; TEUSCHER, F.; ENDER, K. Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 371-381, 2002.
- SANSINANEA, A.S.; CERONE, S.I.; ZONCO, I.; GARCIA, C.; AUZA, N. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. **Nutr. Res.**, v. 21, p. 1045-1052, 2001.
- SCHOOOF, E.; STUPPY, A.; HARIG, F.; CARBON, R.; HORBACH, T.; STOHR, W.; RASCHER, W.; DOTSCHE, J. Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 150, p. 579-584, 2004.
- SILVA, L.F.; VANDEHAAR, M.J.; WEBER NIELSEN, M.S.; SMITH, G.W. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. **J. Dairy Sci.** v. 85, p. 3277-3286, 2002.
- SPELMAN, R.J.; BOVENHUIS, H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 77-84, 1998.
- SPIKER, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 21, p. 251-270, 2001.
- SPIKER, L.J.; FRANCISCO, C.C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 207-212, 1998.

- TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T.; SASAKI, Y. Genomic structure and promoter analysis of the bovine. **IUBMB Life**, v. 53, p. 131-135, 2002.
- TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 6093-6096, 1997.
- TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MUIS, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; MONROE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. **Cell**, v. 83, p. 1263-1271, 1995.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. **In. DNA fingerprinting: State of the Science**, Pena et al. (eds), Verlag, Basel, p. 21-28, 1993.
- TSUCHIYA, T.; NAGAO, Y.; OZAWA, A.; MATSUMOTO, M.; SUGAHARA, K.; KUBO, T.; KATO, H. Decrease of the obese gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue by fasting. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 62, p. 2068-2069, 1998.
- VAISSE, C.; HALAAS, J.L.; HORVATH, C.M.; DARNELL, J.E.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J.M. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 95-97, 1996.

- WANG, T.; BROWN, M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNAase protection. **Anal. Biochem.**, v. 269, p. 198-201, 1999.
- WEIMER, T.A. Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal. **In: Diagnóstico Genético-Molecular**, MARKES, E.K. (org)., p. 203-218, ULBRA, Canoas, 2003.
- 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. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 339-349, 2002.
- WINER, J.; JUNG, C.K.; SHACKEL, I.; WILLIAMS, P.M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Anal. Biochem.**, v. 270, p. 41-49, 1999.
- YAMASHITA, T.; MURAKAMI, T.; IIDA, M.; KUWAJIMA, M.; SHIMA, K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. **Diabetes**, v. 46, p. 1077-1080, 1997.
- YONEKURA, S.; KITADE, K.; FURUKAWA, G.; TAKAHASHI, K.; KATSUMATA, N.; KATOH, K.; OBARA, Y. Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 22, p. 25-35, 2002.

ZHANG, F.; BASINSKI, M.B.; BEALS, J.M.; BRIGGS, S.L.; CHURGAY, L.M.;
CLAWSON, R.D.; DIMARCHI, R.D.; FURMAN, T.C.; HALE, J.E.;
HSIUNG, H.M.; SCHONER, B.E.; SMITH, D.P.; ZHANG, X.Y.; WERY,
J.P.; SCHEVITZ, R.W. Crystal structure of the obese protein leptin-
E100. **Nature**, v. 387, p. 206-209, 1997.

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