

Polimorfismo no gene do receptor da leptina em raças brasileiras de galinhas caipiras (*Gallus gallus*)

Artur Oliveira Rocha¹
Débora Araújo de Carvalho¹
José Lindenberg Rocha Sarmento¹
Abigail Araújo de Carvalho¹
Bruna Lima Barbosa¹

¹ Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí. deborabie@hotmail.com, sarmento@ufpi.edu.br, abigail.ac@hotmail.com, bruna.limasp@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa conhecer polimorfismos no gene receptor da leptina em três raças de galinhas brasileiras (Canela-Preta, Caneluda e Peloco) e uma linhagem especializada, visando contribuir com a seleção assistida por marcadores, para características de desempenho e carcaça. Foram coletados sangue de 120 aves, sendo 30 Canela-Preta, 30 Peloco, 30 Caneludo do Catolé e 30 da linhagem Pesadão vermelho. Fez-se a extração do ácido desoxirribonucléico e posteriormente à amplificação do gene do Receptor da Leptina. Utilizou-se a técnica molecular polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. Para a clivagem utilizou-se a enzima *BsrGI*, que reconhece e cliva o polimorfismo G>A. Todo material clivado foi submetido a eletroforese e visualizado em gel de agarose. Calculou-se a frequência alélica e genotípica nessas quatro populações. Verificou-se nos animais avaliados, que a raça Peloco apresentou dois genótipos possíveis (GG e GA) sendo o GG=96,6% e GA=3,4%, com frequências para o alelo A= 1,7% e o G= 98,3%. As demais raças e linhagem não apresentaram variação genotípica e alélica, estando o alelo G fixado na população amostrada. As populações Canela-Preta, Caneludo do Catolé e linhagem comercial não apresentaram variabilidade para o locus do marcador estudado no gene do receptor da leptina; na população Peloco a variabilidade está presente, contudo, em baixa frequência.

Palavras-chave: *BsrGI*, enzima de restrição, frequência gênica, galinhas nativas, marcador genético, *RFLP*

Polymorphism in the leptin receptor gene in Brazilian breeds of free-range chickens (*Gallus gallus*)

ABSTRACT

The objective of this research was to know polymorphisms in the leptin receptor gene in three Brazilian chicken breeds (Canela-Preta, Caneluda and Peloco) and a specialized strain, aiming to contribute to the selection assisted by markers, for performance characteristics and carcass. Blood was collected from 120 birds, being 30 Canela-Preta, 30 Peloco, 30 Caneludo do Catolé and 30 of the Pesadão Vermelho line. The deoxyribonucleic acid was extracted and subsequently the amplification of the Leptin Receptor gene. The restriction fragment length polymorphisms molecular technique was used. For cleavage, the enzyme *BsrGI* was used, which recognizes and cleaves the G>A polymorphism. All cleaved material was subjected to electrophoresis and visualized on the agarose gel. The allelic and genotypic frequency in these four populations was calculated. It was verified in the animals evaluated, that the Peloco breed had two possible genotypes (GG and GA) with GG = 96.6% and GA = 3.4%, with frequencies for the A allele = 1.7% and G = 98.3%. The other races and lineages did not show genotypic and allelic variation, with the G allele being fixed in the sample population. The populations Canela-Preta, Caneludo do Catolé and commercial lineage did not show variability for the marker locus studied in the leptin receptor gene, in the Peloco population the variability is present, however, at low frequency.

Key words: *BsrGI*, restriction enzyme, gene frequency, native chickens, genetic marker, *RFLP*



INTRODUÇÃO

A criação de galinhas caipiras usando raças nativas está sendo praticada em muitos países em desenvolvimento do mundo (Magothe et al., 2012). Estas aves proporcionam renda as famílias, além de garantir alimento disponível, têm a vantagem de não dependerem de grandes tecnologias e altos custos para sua criação (Fonteque et al., 2014). Demonstaram, também, menor susceptibilidade a doenças contagiosas e boa adaptação as condições edafoclimáticas de ambiente tropical (Almeida et al., 2013).

Neste sentido estudos de polimorfismos de genes com expressão fenotípica de características de interesse da produção vêm sendo realizados. O uso de marcadores moleculares foram os responsáveis pela identificação de polimorfismos em várias espécies de animais domésticos, a exemplo do marcador “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*” (RFLP) (Caetano, 2009).

Nos últimos anos o gene da leptina (*LEP*) tem sido utilizado em pesquisa com animais de produção com uso do marcador RFLP (Carvalho et al., 2012). A priori esse gene foi identificado no tecido adiposo de camundongos mutantes, mas na espécie *Gallus gallus* a sequência e expressão deste gene só foi elucidada a pouco tempo (Seroussi et al., 2016).

A leptina é composta de 146 aminoácidos, resultante da tradução do *LEP*, e produzida primordialmente no tecido adiposo (Sirotkin e Grossmann, 2015), é também um cofator de presença ou não de adipócitos no sangue, que pode aumentar ou diminuir, em níveis séricos, de acordo com a quantidade de energia estocada (Lew, 2012).

O gene do receptor da leptina (*LEPR*), que medeia as funções fisiológicas da leptina e está diretamente relacionado com a sua expressão, foi elucidado em frangos por meio de sua clonagem. Esta forneceu evidências para a existência de um homólogo do *LEP* nas aves (Liu et al., 2007). Esse gene está diretamente ligado a regulação, armazenamento de energia, metabolismo do corpo e deposição de gordura das aves (Adachi et al., 2008). Portanto, a análise dos polimorfismos no *LEPR* pode ser útil para entender a variação do ganho de peso, deposição de gordura e a eficiência alimentar das galinhas nativas e propiciar informações que possam auxiliar em futuras aplicações de seleção assistida por marcadores.

Dado o exposto, objetivou-se com esta pesquisa conhecer polimorfismos no gene do receptor da leptina em três raças de galinhas brasileiras e uma linhagem especializada, visando contribuir com a seleção assistida por marcadores, para características de desempenho e carcaça.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em Teresina no estado do Piauí de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) nº 399/17.

Foram coletadas 120 amostras de sangue, diretamente da veia ulnar, das aves de quatro grupos genéticos distintos, sendo 30 das galinhas Canela-Preta, 30 das galinhas Peloco, 30 das galinhas Caneludo do Catolé e 30 das galinhas da linhagem industrial Pesadão. As amostras das galinhas Canela-Preta e da linhagem Pesadão foram coletadas em Teresina-PI e das galinhas Peloco e Caneludo do Catolé foram coletadas em núcleo de conservação na cidade de Itapetinga-BA.

Para a extração do DNA, utilizou-se o Kit DNEASY BloodandTissue da QIAGEN®. O procedimento para extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, que resultava em 200 µL de DNA genômico concentrado. Após o procedimento de extração do DNA

genômico, avaliou-se a qualidade do mesmo por eletroforese em gel de agarose a 1%. As bandas foram visualizadas em sistema de foto documentação com utilização do brometo de etídio (EtBr) para corar o gel e o transiluminador para visualizar os fragmentos do DNA.

O fragmento do gene do Receptor da Leptina de 940bp encontrado no intro 19 com seguinte conjunto de primers: *LEPR F*: 5' AAAACCAGCACCCTGAAATG 3' e *LEPR R*: 5' CAGACTGTGCTTGGGGATTT 3'; desenhado por Ninov (2006), foi sintetizado e realizada a otimização das condições para a reação em cadeia de polimerase (PCR).

Para a reação da PCR com o *primer LEPR* foram utilizados 4 µL de DNA (20 ng/µL) adicionados a 21 µL de *mix* de reação composto pelos seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão 10X (100 mM TrisHCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 2 µL MgCl₂ (50 mM), 2 µL da mistura de dNTP (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8 µM de cada iniciador, e 0,2 µL (1 U) de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), para um volume final de 25 µL.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 62°C e 50 segundos de extensão a 72°C; e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5 % por eletroforese. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb (*NipponGenetics*).

Para avaliar o polimorfismo na região amplificada a enzima *Bsp1407I* (*BsrGI*) (*ThermoScientific*), que reconhece e cliva o sítio polimórfico G>A, foi utilizada. As quantidades utilizadas na formulação do *mix* final dos reagentes foram: 5 µL do produto de PCR, 4 µL de água- ultra pura, 2 µL de *Buffer Tango* 10X (33Mm Tris-acetate, 10 Mm magnesiumacetate, 66 mMpotassiumacetate, 0,1mg/ml BSA) e 0,2 µL da enzima *BsrGI* (10 U/µL). A temperatura ótima de digestão enzimática foi de 37 °C com um tempo de 3h em banho maria. A sequência do sítio de clivagem da enzima pode ser visualizada na Figura 1.

Os produtos da clivagem foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. Após a corrida, as bandas foram visualizadas em sistema de foto documentação e para confirmação do tamanho dos fragmentos clivados foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb (*NipponGenetics*). Os Genótipos foram obtidos e posteriormente calculadas as frequências alélicas e genotípicas obtidas nas 4 populações de galinhas com auxílio do programa Microsoft Excel (2016).

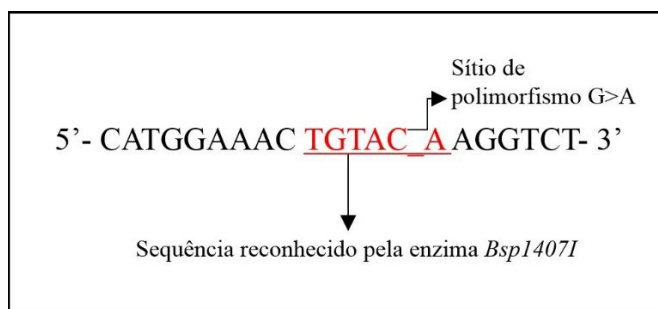


Figura 1. Sítio de restrição da enzima *Bsp1407I*, utilizada para genotipar o polimorfismo G>A. Fonte Ninov (2006) modificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de amplificação da região do gene do receptor da Leptina diferiram na temperatura de anelamento que foi de 62 °C para as populações estudadas, enquanto na literatura a mais utilizada é 64 °C (Ninov, 2006). Essa diferenciação pode estar relacionada às concentrações diferentes de reagentes

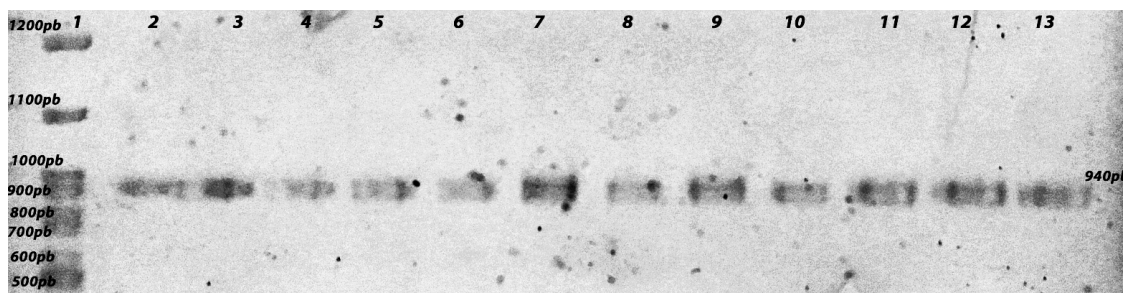


Figura 2. Gel de agarose a 1,5 % para visualização do fragmento amplificado pelo primer *LEPR* do gene do receptor da leptina. A canaleta 1 corresponde ao padrão de peso molecular 100 pb (NipponGenetics) as canaletas 2 a 4 correspondem a amostras de Canela-preta, de 5 a 7 a raça Peloco, de 8 a 10 a raça Caneluda e de 11 a 13 a linhagem comercial Pesadão.

da PCR, bem como individualidades dispostas por cada laboratório nas suas condições de trabalho, além da influência das diferentes marcas e fabricantes dos reagentes de PCR que variam entre laboratórios.

Na Figura 2 visualiza-se imagem de gel de Agarose a 1,5%, onde foram aplicados os produtos da PCR para visualização do tamanho dos fragmentos amplificados. O tamanho esperado é 940 pb para o primer *LEPR*.

A digestão com a enzima *Bsp1407I* resultou em dois genótipos distintos, indivíduo heterozigoto *GA* com três padrões de bandas: 940, 674 e 266 pb e indivíduos homozigotos *GG* apresentaram apenas um fragmento com 940 pb. Na Figura 3 observa-se o padrão de bandas do polimorfismo



Figura 3. Padrão dos fragmentos do produto amplificado do gene do receptor de leptina digerido com enzima *Bsp1407I*. A canaleta 1 corresponde ao padrão de peso molecular 100 pb (NipponGenetics) a canaleta 2 ao genótipo homozigoto *GG* e a canaleta 3 ao genótipo heterozigoto *GA*.

após a digestão enzimática em banho maria. Os padrões de fragmentos encontrados eram os esperados e concordaram parcialmente com a literatura, pois segundo Nivov (2006) existe um terceiro padrão de bandas em galinhas, que seria referente ao genótipo homozigoto *AA*, que não foi encontrado nesta pesquisa a partir da amostragem dos materiais genéticos estudados.

As frequências foram calculadas para os quatro grupos genéticos totalizando 120 animais. Na Tabela 1 é possível observar as frequências genotípicas e alélicas para os genótipos encontrados, *GG* e *GA* e alelos *A* e *G* respectivamente.

Esta baixa frequência genotípica encontrada para o genótipo *GA* está de acordo com o que foi encontrado para galinhas de raças nativas do Irã, neste mesmo gene do receptor de leptina onde a frequência de heterozigose foi baixa (20% em 30 animais), e a frequência do genótipo *AA* nula (0 %) (Mokhtarzadeh et al., 2009). Os resultados desta pesquisa condizem com o encontrado por Fongaro et al. (2010) que encontraram baixa frequência alélica para o alelo *A* e alta frequência genotípica para *GG* (100% em uma linhagem de corte e 65% em uma linhagem de postura), para este mesmo fragmento de gene amplificado e clivado com a mesma enzima.

O gene do receptor da leptina, em muitos estudos é associado a ganho de peso e outras características de desempenho de carcaça (Moujahid et al., 2014). Segundo Nivov (2006) em estudos com linhagens especializadas de corte e postura, para o mesmo polimorfismo analisado, esses genótipos também estão associados a rendimento de pulmão (*GG*), onde o alelo *G* apresenta efeito de dominância sobre o alelo *A*, consumo de ração e rendimento de coxa, onde os genótipos homozigotos apresentaram rendimentos maiores em relação aos heterozigotos *GA*, havendo efeito negativo de sobredominância neste loco. O genótipo associado a consumo de ração (*AA*) não foi observado nesta pesquisa. Este terceiro padrão (*AA*) talvez não tenha sido encontrado devido ao tamanho amostral por grupo genético que foi utilizada nessa pesquisa, aproximadamente 30 animais por grupo.

Além do tamanho amostral, a falta do terceiro padrão *AA*, pode estar relacionado com o manejo genético dos rebanhos estudados. A falta de controle de acasalamentos, ausência de seleção ou migração específica no *LEPR* ou seus efeitos, parece ter selecionado mais o Alelo *G*, estando, mais relacionado a efeitos positivos sobre o metabolismo, como concluíram Mokhtarzadeh et al. (2009). Importante ressaltar que em

Tabela 1. Frequência de genótipos e alelos encontrados com o polimorfismo do gene do receptor de leptina em quatro grupos de galinhas brasileiras.

Genótipo/Alelo	Canela Preta	Peloco	Caneluda	Pesadão
			(%)	
GA	0	3,3	0	0
GG	100	96,7	100	100
G	100	98,3	100	100
A	0	1,7	0	0

ambos os trabalhos, Nivov (2006) e Fongaro et al. (2010) os indivíduos que possuíram o alelo *G* fixado eram de linhagens selecionadas e melhoradas, por vários anos, para corte, o que poderia explicar a associação com rendimento de coxa e sobrecoxa e que sugere esse potencial direcionado para as aves nativas no presente estudo.

Outro fator interessante seria a característica de rendimento de pulmão que foi associada ao genótipo *GG* e *GA* como dito anteriormente que corresponde ao tamanho do pulmão e capacidade de trocas gasosas. A seleção natural ter fixado o alelo *G* nas aves nativas estudadas, corrobora com a forma de vida livre destes animais e com a associação encontrada por Nivov (2006), porque com um maior pulmão estas aves podem fazer mais trocas gasosas e por consequência ter um melhor condicionamento e maior metabolismo, o que é observado diariamente com a vida mais ativa que elas possuem e menor susceptibilidade quantitativa a doenças e paradas respiratórias (Gaya et al., 2008).

CONCLUSÕES

Verificou-se nas populações estudadas baixa variabilidade entre as raças para o locus do marcador estudado no gene *LEPR*, com polimorfismo apenas na raça Peloco e fixado nas raças Canela Preta e Caneluda do Catolé e na linhagem comercial Pesadão. Na literatura o gene *LEPR* é amplamente utilizado em aves para estudos de associação com características produtivas. Assim, fazem-se necessários estudos com amostras mais representativas das raças brasileiras investigadas e análises complementares com outros polimorfismos para melhor compreender a associação e expressão deste gene em aves nativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as instituições CAPES e CNPq pelo incentivo financeiro disponibilizado para realizar a pesquisa.

LITERATURA CITADA

- Adachi, H.; Takemoto, Y.; Bungo, T. *et al.* Chicken leptin receptor is functional in activating JAK/STAT pathway in vitro. *Journal of Endocrinology*, vol. 197, n. 2, p. 335-342, 2008. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0098>
- Almeida, E.C.J.; Carneiro, P.L.S.; Wenceslau, A.A. *et al.* Características de carcaça de galinha naturalizada Peloco comparada a linhagens de frango caipira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 11, p. 1517-1523, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001100013>.
- Caetano, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p.64-71, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300008>
- Carvalho, T. D.; Siqueira, F.; Júnior, R.A.A.T. *et al.* Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 10, p. 2162-2168, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012001000004>.
- Fongaro, G.; Peri, E.; Tessmann, A. L. *et al.* Frequência alélica e genotípica de polimorfismo no gene receptor da leptina (*LEPR*) em duas linhagens de aves (*Gallus gallus*). 4ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa, 2010. Disponível em; <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/874445/1/GislaineFongaroA.pdf>. Acessado em 16 de fevereiro de 2020.
- Fontequê, G.V.; Battilana, J.; Paludo, E. *et al.* Genetic Polymorphism of Fifteen Microsatellite Loci in Brazilian (blue-egg Caipira) Chickens. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 1, p. 98-102, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100016>
- Gaya, L.G.; Ferraz, J.B.S. Melhoramento Genético do Rendimento e Qualidade da Carne de Frango. VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. 2008. Disponível em: <https://docplayer.com.br/12011441-Melhoramento-genetico-do-rendimento-e-qualidade-da-carne-de-frango.html>. Acessado em 16 de Fevereiro de 2020.
- Lew, B.J.; Oliveira, M.D.S.; Carvalho, M.V. *et al.* Expressão do gene da leptina e seu receptor Ob-Rb no parênquima mamário de novilhas leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 5, p. 1263-1270, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000500025>.
- Liu, X.; Dunn, C.; Sharpp, J. *et al.* Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 32, n. 3, p. 155-166, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.02.001>
- Magothe, T. M.; Okeno, T. O.; Muhuyi, W. B. *et al.* Indigenous chicken production in Kenya: I. Current status, *World's Poultry Science Journal*, vol. 68, no. 1, p. 119-132, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000128>
- Mokhtarzadeh, S.; Fayazi, J.; Mamoei, M. *et al.* Investigation of Leptin's Receptor Gene Polymorphism, by Using PCR-RFLP Technique in Native Poultry Population of Khouzestan Province. *Research Journal of Biological Sciences*, v. 8, n. 4, p. 933-936, 2009. Disponível em: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=rjbsci.2009.933.936>. Acessado em 16 de Fevereiro de 2020.
- Moujahid, E.M.E.; Chen, S.; Sihujain. *et al.* Association of leptin receptor gene polymorphisms with growth and feed efficiency in meat-type chickens. *Poultry Science*, v. 93, n. 8, p. 1910-1915, 2014. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03674>
- Ninov K. Identificação de polimorfismos no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça. 90p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2006. <https://doi.org/10.11606/D.11.2007.tde-05032007-162413>
- Pitel, F.; Faraut, T.; Bruneau, G. *et al.* Is there a leptin gene in the chicken genome? Lessons from phylogenetics, bioinformatics and genomics. *General and Comparative Endocrinology*, v. 167, n.1, p. 1-5, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2009.10.006>
- Serousse, E.; Cinnamon Y.; Yosefi S. *et al.* Identification of the Long-Sought Leptin in Chicken and Duck: Expression Pattern of the Highly GC-Rich Avian leptin Fits an Autocrine/Paracrine Rather Than Endocrine Function. *Endocrinology*, v. 157, n. 1, p. 737-751, 2016. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1634>
- Sirotkin, A.V.; Grossmann, H. Interrelationship between feeding level and the metabolic hormones leptin, ghrelin and obestatin in control of chicken egg laying and release of ovarian hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 184, p. 1-5, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.016>