

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO HINF I DO GENE OBESE POR PCR-RFLP  
SOBRE DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO  
EM SUÍNOS LANDRACE**

**JULIANA FRANCO ALMEIDA**

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Agosto – 2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO HINF I DO GENE OBESE POR PCR-  
RFLP SOBRE DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO  
EM SUÍNOS LANDRACE**

**JULIANA FRANCO ALMEIDA**

**LUIZ RICARDO GOULART**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

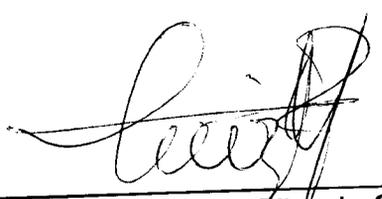
Agosto – 2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

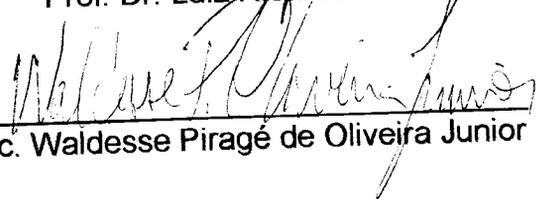
**ANÁLISE DO POLIMORFISMO HINF I DO GENE OBESE POR PCR-RFLP SOBRE DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM SUÍNOS LANDRACE**

**JULIANA FRANCO ALMEIDA**

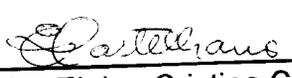
Aprovado Pela Banca Examinadora Em 24/08/02 Nota 100,0



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart



\_\_\_\_\_  
MSc. Waldesse Piragé de Oliveira Junior



\_\_\_\_\_  
MSc. Elaine Cristina Castelhana Barbosa

Uberlândia, 29 de Agosto de 2002.

"Nada lhe posso dar que já não existam em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo".

(Hermann Hesse)

Ofereço à minha família,  
pelo valioso apoio e total compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais, Odécio e Coleta, pelo apoio concedido e por abdicarem de seus próprios sonhos em benefício dos meus.

Ao meu irmão Júlio, por sempre incentivar-me na busca de meus ideais.

À minha irmã Adriana, por estar ao meu lado, vivendo e ajudando a superar as dificuldades.

Ao meu sobrinho Henrique por alegrar-me com suas demonstrações de amor e carinho.

Ao meu orientador, Luiz Ricardo Goulart, por acolher-me e oferecer a oportunidade de aprender.

Aos membros da banca, Elaine e Waldesse pelo apoio e disponibilidade na correção do trabalho.

Ao Maurício Machaim Franco, pelo conhecimento a mim transmitido e pelas suas demonstrações de otimismo quando tudo parecia desabar.

*“Vai dar certo...”*

Aos meus amigos e colegas; Lorraine, Fausto, Lúbia, Daniela Valéria, Teresa, Vanessa, Paula, Cristiane, Narcisa, Luciana Oliveira, e todos da 49ª Turma de Ciências Biológicas pelos anos de convivência harmoniosa.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular; Katiana, Guilherme, Carlos, Cícero, Walter, Rossana, Luciana, Juliana Machado, Juliana Meola, Fred, Elisângela, Ana Cândida, Adriana, Jaqueline, Andréia, Alexandra, Renata, Bethania, Giovana, Nádia, Mércia, Ana Paula, Paula Cristina e Karina, pela troca de conhecimentos e pelo ambiente de trabalho agradável.

## ÍNDICE

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 - A proteína-OB –Leptina.....	02
1.2 – O gene <i>Obese</i> .....	05
1.3 – Marcadores Moleculares.....	06
1.4 – Marcadores RFLP.....	07
1.5 – PCR (Polymerase Chain Raction).....	08
1.6 – PCR – RFLP.....	08
1.7 – LIS – SSCP.....	09
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 – Marerial Biológico.....	11
2.2 – Extração de DNA.....	12
2.3 – Reação em Cadeia da Polimerase.....	13
2.4 – Restrição Enzimática.....	14
2.5 – LIS-SSCP.....	14
2.6 – Análise dos Resultados.....	15
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>4 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>23</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

## RESUMO

A leptina é uma proteína codificada pelo gene *Obese*, produzida no tecido adiposo e circulante no sangue. É proposto que esse hormônio tenha função de “fator de saciedade”. O gene da obesidade, incluindo o de suínos, já foi sequenciado em várias espécies, sugerindo função altamente conservada. Estudos buscam marcadores moleculares para características favoráveis à comercialização da carne suína. Os objetivos deste trabalho foram determinar a frequência genotípica e alélica para o polimorfismo *Hinf I* do gene *Obese* por PCR-RFLP; associar possíveis relações deste com características de desempenho em uma população de suínos da raça Landrace e, por fim, otimizar a técnica de LIS-SSCP para caracterização deste polimorfismo. Dos 216 animais genotipados, 182 destes apresentaram genótipo TT (84,26 %), 33 TC (15,28 %) e 01 CC (0,46%), as frequências alélicas encontradas foram 0,92 para o alelo T e 0,07 para o alelo C. O valor de  $\chi^2$  encontrado foi 0,14212 (0,50 < P < 0,75) mostrando que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy - Weinberg. Notou-se diferença significativa para Ganho de Peso Médio Diário e Espessura de Toucinho (DEPs).

Palavras-chave: Polimorfismo, Landrace, Leptina

## 1 – INTRODUÇÃO

A genética é uma das principais ciências a serviço do homem. Ela tem contribuído em vários campos de atividades merecendo destaque sobretudo na agropecuária, onde o crescimento populacional exerce grande pressão. No incremento da produção, uma das principais ferramentas que o homem dispõe é o melhoramento genético de plantas e animais que assume um papel muito importante na obtenção de indivíduos superiores, com o objetivo final de melhorar o padrão de nutrição do povo brasileiro, especialmente das classes menos favorecidas (RAMALHO *et al.* 2000).

Com a evolução das técnicas de Biologia Molecular, muitos genes de interesse ligados a características econômicas, vêm sendo estudados, propiciando grandes benefícios para o setor produtivo e, conseqüentemente para a população de um modo geral. Não obstante, a indústria de carne suína utiliza das técnicas de melhoramento genético tradicionais, assim como da Biologia Molecular propriamente dita, na tentativa de aumentar a produção de carne “rentável”, buscando manter em seus plantéis reprodutores que possuam características que levem a uma maior viabilidade de suas progênes.

Importantes características econômicas, relacionadas ao desenvolvimento corporal, são freqüentemente controladas por muitos genes e modificadas por fatores de meio. Muitos genes estudados intensivamente parecem ter efeitos pleiotrópicos, ou seja, controlam duas ou mais características. Genes envolvidos na biologia de uma determinada característica de interesse são genes candidatos e são alvos para os estudos de marcadores (FRANCO, 1999).

As diferenças genéticas entre os indivíduos que são fornecidas como resposta da utilização da genética quantitativa, são nada mais que a diferença nas freqüências alélicas para os diferentes genes que constitui o genótipo do indivíduo. Partindo desse ponto de vista, as diferenças são geradas pela constituição genética de cada indivíduo dentro da população, seja por meio de efeito genético aditivo ou combinação de alelos, através de suas relações de dominância e epistasia (BORGES, 1997).

### **1.1 - A proteína-OB - Leptina**

Na década de 1950 pela primeira vez descobriu-se um gene mutante em camundongos obesos e nas duas décadas seguintes Douglas Coleman sugeriu que a obesidade poderia ser corrigida por uma substância reguladora de peso presente no sangue de um indivíduo normal, ao observar que quando ligava os sistemas circulatórios de dois animais, um rato portador do gene mutante (rato ob-ob) e um rato normal, o animal obeso perdia peso (DIO *et al.*, 2002).

A Figura 1, mostra camundongos geneticamente obeso e normal.

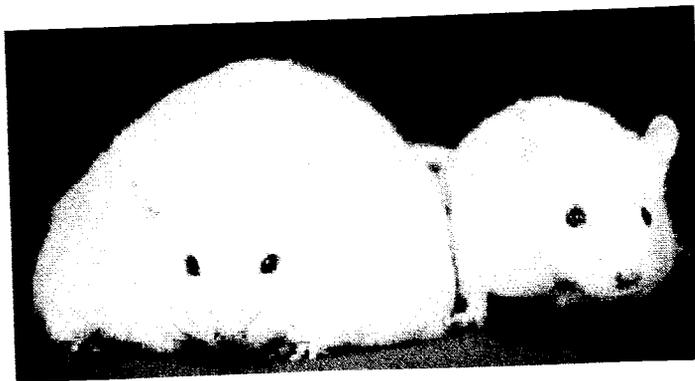


Figura 1: Camundongo geneticamente obeso e normal. O camundongo da esquerda (ob/ob), apresenta mutação no gene.

Com tais descobertas, posteriormente, Zang e colaboradores (1994), caracterizaram a leptina como uma proteína codificada pelo gene *Obese*, produzida no tecido adiposo e circulante no sangue.

A proteína-ob ou leptina é uma proteína de 16 KD, secretada pela célula adiposa em resposta ao aumento da massa gordurosa e age sobre o hipotálamo ventro-medial onde diminui a biossíntese e a secreção do NPY (neuropeptídeo Y), reconhecido como o mais potente modulador do apetite (DIO, *et al.*, 2002).

Existem demonstrações de que mutações no gene *ob* e no receptor da leptina causam obesidade massiva nos roedores (CHUA *et al.*, 1996).

O receptor da leptina é um membro da classe da família do receptor da Citocina I, e existe pelo menos 5 isoformas derivadas de "splicings" alternativos do mRNA. O Ob-Rb é o receptor predominante expresso no cérebro, particularmente no hipotálamo, o Ob-Ra é encontrado principalmente em tecidos periféricos como o fígado, pâncreas, gônadas e músculo esquelético, todavia, o Ob-Ra está presente no plexo coróide e nos capilares neurais, onde está envolvido no transporte da leptina entre o sangue e o fluido cérebro espinhal através da barreira hematoencefálica. Outra isoforma, o Ob-Re é solúvel e serve como proteína circulante (SMITH, *et al.* 2002).

A concentração de leptina no plasma e tecidos adiposos diminuem rápida e profundamente como resultado da deprivação alimentar e balanço negativo de energia (BARB, *et al.*, 2001).

## 1.2 – O gene *Obese*

Os suínos já eram considerados como modelos para a obesidade pela sua propensão natural para engordar, a qual pode ser maior pela composição da dieta e ingestão (MERSMANN, 1986) e atualmente o gene da obesidade desta espécie já está clonado (BIDWEL *et al.*, 1997). Existem atualmente, experimentos que afirmam a hipótese da expressão do gene variar de acordo com a propensão de tecido adiposo (RAMSAY *et al.*, 1998).

O gene já foi sequenciado em várias espécies, incluindo o suíno, o qual apresenta-o no cromossomo 18 com homologia de 88% ao do humano (cromossomo 7), 85% ao do camundongo (cromossomo 6) e 92% ao do bovino (cromossomo 4) (RAMSAY *et al.*, 1998); isto sugere que sua função deve ser altamente conservada já que é extensa a homologia do produto do gene *ob* entre os vertebrados (ZHANG *et al.*, 1994).

Stratil e colaboradores (1997), utilizaram um par de “primers” que amplificava uma seqüência de 152 pares de bases (pb) do gene *Obese* do suíno, utilizando a enzima *Hinfl*, que cliva uma seqüência constituída por GANTC, que é reconhecida neste gene quando existe uma mutação de ponto na última base desta seqüência, substituindo uma base T por C, que gera a formação de dois fragmentos em indivíduos mutados (84 e 68 pb). Neste trabalho, foi encontrado para os animais Landrace genotipados as freqüências alélicas de 0,96 e 0,04 para os alelos T e C respectivamente.

Krenková & Urban (1998), analisaram as frequências genotípicas e alélicas ( 0,925 para o alelo T e 0,075 para C) para o gene da leptina em suínos Landrace x Large White, podendo demonstrar que a população estudada encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Borges (1999), estudou o mesmo polimorfismo do gene e encontrou para os indivíduos Landrace genotipados uma frequência de 0,95 para o alelo T e 0,04 para o alelo C.

Recentemente, Keenes *et al.*, (2001), trabalhando com suínos Yorkshire, Landrace e Duroc, caracterizaram e avaliaram 4 polimorfismos no gene da leptina (LEP) em suínos, para associação com características de produção economicamente importantes. Os resultados mostraram que dois destes polimorfismos são de baixa frequência ou ausentes e dois podem estar associados com características de consumo de alimento e crescimento em suínos Landrace.

### **1.3 - Marcadores Moleculares**

O surgimento da Engenharia Genética envolve um grande número de técnicas da Biologia Molecular e todas elas representam um enorme potencial na solução de muitos problemas da agropecuária (RAMALHO *et al.*, 2000).

Qualquer segmento de DNA ou RNA que esteja acompanhando por uma característica fenotípica é considerado um marcador molecular.

O uso de marcadores moleculares tem sido de suma importância para o avanço da genética moderna. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e construção das primeiras versões de mapas genéticos (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1998). Hoje, segmentos específicos

de DNA são usados como marcadores moleculares para várias características fenotípicas.

#### **1.4 - Marcadores RFLP**

Na década de 70 iniciou-se o estudo das isoenzimas. Logo em seguida foram descobertas um grupo de enzimas (endonucleases) que eram capazes de cortar a moléculas de DNA em grande número de sítios específicos (SOLLER, 1990). As enzimas de restrição são as principais ferramentas utilizadas pelos biólogos moleculares na manipulação do DNA. Estas se ligam ao DNA e clivam a dupla fita do mesmo em sítios específicos dentro ou ao lado de seqüências particulares reconhecidas por cada enzima (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O DNA digerido por endonucleases e seus fragmentos separados em gel de agarose podem ser transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, hibridados com uma sonda (geralmente um oligonucleotídeo marcado com  $P^{32}$ ) e então a membrana exposta a um filme de raios-X, permitindo determinar variabilidade genética entre indivíduos, esta técnica é denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A base genética do polimorfismo RFLP resulta de mutações e/ou deleções e inserções no sítio de restrição das enzimas ao longo do genoma. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

## 1.5- PCR – Polymerase Chain Reaction

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma nova ferramenta para a Biologia Molecular e tem tido efeito na pesquisa similar ao descobrimento das enzimas de restrição e do Southern Blot (INNIS, *et al.*, 1990).

Um avanço extraordinário ocorreu quando, na década de 80, a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) foi concebida. Isto valeu o Prêmio Nobel de Química em 1993. A PCR é um método *in vitro* de produção de grandes quantidades de fragmentos de DNA a partir de pequenas quantidades, por uma polimerase termoestável (Taq DNA Polimerase). Na amplificação enzimática pela polimerase, um fragmento é flanqueado por dois oligonucleotídeos que hibridam com cadeias opostas de seqüência alvo. Ciclos repetidos de desnaturação do DNA molde, anelamento dos "primers" e extensão destes pela Taq DNA polimerase, resultam em amplificação dos segmentos definidos pelo término 5' dos "primers". O produto de extensão de cada "primer" serve como molde no ciclo seguinte. Assim, em cada ciclo, dobram-se as quantidades de DNA produzido (WHITE *et al.*, 1989).

## 1.6 - PCR – RFLP

Recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA Polimerase (PCR) levou a descrição de outras classes de marcadores moleculares. Com a possibilidade crescente de seqüenciamento de fragmentos de DNA aliado à amplificação de DNA *in vitro*, surgiu a opção de se converter marcadores RFLP em marcadores baseados em PCR, sendo possível

construir “primers” específicos para identificar fragmentos polimórficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Neste procedimento o DNA é amplificado por PCR (seqüências específicas) e o produto amplificado é submetido à digestão por uma enzima de restrição. Como os fragmentos obtidos foram exponencialmente amplificados por PCR isso é o suficiente para sua visualização no gel de Agarose sem a necessidade de hibridação com sondas marcadas radioativamente (HOY, 1994).

### 1.7 - LIS – SSCP

O SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), é um método alternativo para identificar mutações, e foi desenvolvido por Orita *et al.*, (1989) e baseia-se no fato de que a mobilidade eletroforética dos ácidos nucléicos de fita simples em gel de poliacrilamida não desnaturante não dependem somente do seu tamanho, mas também de sua seqüência. Para o uso desta técnica submete-se a amostra a aquecimento na presença de formamida para desnaturar o DNA formando o ssDNA (fitas simples de DNA). Maruya *et al.*, (1996) ao observarem a instabilidade das ssDNA em solução de formamida, desenvolveram o LIS-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism em Baixa Concentração Iônica*), uma adaptação da técnica de SSCP, onde a solução de formamida é substituída por uma solução de baixa força iônica (LIS) capaz de garantir maior estabilidade das fitas simples.

A vantagem da genotipagem por essa técnica reside na rapidez e diminuição de custos, pois evita o emprego de enzimas de restrição (SILVA, 1998). Além do baixo custo e alta eficiência este método detecta polimorfismos no DNA, incluindo mutações de ponto em uma variedade de posições dentro do gene estudado.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a frequência genotípica e alélica para polimorfismo *Hinf I* do gene *Obese* por PCR-RFLP; associar possíveis relações deste com características de desempenho em uma população de suínos da raça Landrace, testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população estudada e, por fim, otimizar da técnica de LIS-SSCP para caracterização deste polimorfismo.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.

### **2.1 – Material Biológico**

Para a realização deste trabalho utilizou-se uma amostra de 216 suínos da raça Landrace, machos e não castrados, dos quais foram criteriosamente medidas ou inferidas as características de desempenho que se seguem: Espessura de toucinho (**ET**), Ganho de Peso Médio Diário (**GPMD**), Diferença Esperada na Progênie para Ganho de Peso Médio Diário (**DEP GPMD**), Diferença Esperada na Progênie para Espessura de Toucinho (**DEP ET**), Diferença Esperada na Progênie para Tamanho de Leitegada (**DEP TL**) e Peso Final (**PESO**). Tais avaliações foram possibilitadas pela Granja Rezende S/A, Uberlândia - MG, de onde obteve-se também, da mesma amostra de indivíduos, alíquotas de sangue periférico, coletado na veia marginal da orelha em tubos à vácuo contendo solução anticoagulante com agulhas individuais.

## 2.2 – Extração de DNA

A partir das amostras de sangue, foi extraído o DNA pelo método descrito em: *A Workshop on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources* (1992), com algumas modificações propostas anteriormente (BORGES, 1997).

Após a sedimentação em tubos de 2 mL, foram retirados 500 $\mu$ L de sangue na camada de transição entre o plasma e os eritrócitos aos quais adicionou-se 1mL de tampão de lise não diluído (20mM de Tris-HCl, 5mM de EDTA pH 7,5, 640 mM de sacarose, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 4% de Triton X-100), submetendo a solução à agitação lenta e incubação em gelo por 10 minutos. Após este procedimento, foi realizada a centrifugação a 7.23g por 1 minuto descartando-se em seguida o sobrenadante. Mais duas lavagens foram necessárias com tampão de lise diluído (1:1) até que o precipitado (*pellet*), ficasse limpo (branco). Em seguida, foram acrescentados 20 $\mu$ l de TE + Sarcosyl 1% (10 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA pH 7,5 e 1% de Sarcosyl) e 10  $\mu$ L de Proteinase K (10mg/mL). As amostras foram incubadas *overnight* a 50<sup>o</sup>C, para que o precipitado fosse desfeito. Posteriormente, foi adicionado 500 $\mu$ L de 8mM Guanidina-HCl / 0,49 M Acetato de Amônio, agitando à temperatura ambiente por 1 a 2 horas até que o precipitado fosse solubilizado. O DNA foi precipitado adicionando 800  $\mu$ l de isopropanol puro. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Procederam-se mais duas lavagens com isopropanol 60% (7.23 g por 2 minutos). O precipitado de DNA foi seco sob vácuo e diluído em 0,5 - 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl e 1,mM de EDTA) dependendo do tamanho do mesmo. Foi necessário 1 - 4 horas de incubação a 65<sup>o</sup>C para completa dissolução do precipitado. Após terminada a extração, algumas

amostras foram submetidas à espectrofotometria (260 nm) para quantificação do DNA. Para calcular a concentração do DNA foi usada a seguinte fórmula: Concentração do DNA em ng/ $\mu$ l = Absorbância 260 nm x 50 x Fator de Diluição (FRANCO, 1999).

Desta forma, foi possibilitada a montagem de um banco de dados de características genéticas e de parâmetros quantitativos, que pudesse ser usado para diversos marcadores moleculares.

### **2.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Devido ao grande número de animais a serem genotipados; durante o período de otimização das reações, foram testados diferentes volumes de DNA para que pudesse ser estipulada uma quantidade fixa de amostra a ser usada em todas as reações, sem a necessidade de quantificação por espectrofotometria de todas as amostras antes de submetê-las à reação.

As condições usadas para a amplificação das amostras foram: 0,5 – 2,5  $\mu$ L (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5  $\mu$ L) de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de dNTPS, 10pmoles de “primers” e 1 U de Taq DNA Polimerase, sendo o volume completado para 20  $\mu$ L com água ultrapura em tubos de 0,2 mL que foram submetidos ao termociclador por 30 ciclos, com a seguinte programação:

- temperatura de desnaturação - 95°C/ 1 minuto
- temperatura de anelamento - 55°C/ 1 minuto
- temperatura de extensão - 72°C/ 1 minuto
- desnaturação inicial - 2 minutos
- extensão final de - 7 minutos

Para a prévia confirmação da amplificação das amostras, anteriormente à restrição enzimática, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal, em géis de agarose 1,5%, corados com Brometo de Etídio (10  $\mu\text{g/mL}$ ), sob corrente elétrica de 100 Volts por 30 minutos, e visualizados através de raios ultravioleta pelo sistema VDS<sup>®</sup> (Pharmacia Biosciences).

## 2.4 – Restrição Enzimática

A restrição enzimática foi realizada a partir de 10  $\mu\text{L}$  de cada um dos produtos PCR, utilizando-se 5 unidades da enzima *Hinfl* e tampão específico, submetidos a 37<sup>o</sup>C por no mínimo 1 hora, como descrito por BORGES (1999), salvo a quantidade de enzima que foi aumentada de 1 para 5 unidades para uma melhor eficácia.

Os produtos das restrições foram também submetidos à eletroforese, sendo o gel de agarose 3.5% e a voltagem 120 Volts por 1 hora, também corados e visualizados tal como descrito anteriormente.

## 2.5 – LIS-SSCP

Na otimização da técnica de LIS-SSCP para a caracterização deste polimorfismo, foi utilizada uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  do produto de PCR (fragmento de 152 pb), ao qual foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  da solução de LIS (Sacarose 10%, Azul de Bromofenol 0,01%, Xilenocianol 0,01%), as misturas foram incubadas por 5 minutos à 95<sup>o</sup>C e imediatamente submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (Acrilamida / Bisacrilamida 49:1), variando a voltagem, e as concentrações entre 8 e 15%, para que fosse encontrada uma concentração que atendesse às necessidades requeridas para a separação das bandas de interesse.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados por Nitrato de Prata da maneira que se segue: realizou-se a fixação em solução de Ácido Acético 10% por 10 minutos, em seguida lavados com água destilada 2 vezes por 2 minutos cada lavagem. Assim, foram emergidos em solução 0,012 M de Nitrato de Prata (200 mg/100ml) e 0,056% de formalina (150 µl de formaldeído / 100 ml ) por 20 minutos em ambiente escuro e lavados 2 vezes por 30 segundos com água destilada. Após as lavagens foram revelados em solução gelada (8<sup>o</sup> C, aproximadamente), de 0,28 M de Carbonato de Sódio anidro (3g/100ml), 0,056% de formalina (150 µl de formaldeído/ 100ml) e 4µM de tiosulfato (10 mg/100ml) até o aparecimento das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados. Para terminar a reação, foi utilizado Ácido Acético Glacial 10%, gelado.

## 2.6 – Análise dos Resultados

Os dados (genótipos) encontrados através da PCR-RFLP foram catalogados e discriminados, utilizando-se os números 1, 2 e 3 para identificar respectivamente os genótipos TT, TC e CC. Para a associação do marcador molecular (genótipo) com as características de desempenho (ET, GPMD, DEP GPMD, DEP ET, DEP TL e PESO), os dados foram submetidos à Análise de Variância, utilizando o genótipo *Obese* como tratamento e cada uma destas características e DEPs como variáveis independentes pelo Software STAT 5.0. Além disto, foram obtidas também as frequências genóticas e alélicas e teste  $\chi^2$  para testar o equilíbrio de Hardy – Weinberg.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras amplificações do material genético, para a otimização da quantidade de DNA a ser usado, obteve-se resultado satisfatório para todos os volumes analisados (0,5 – 2,5 $\mu$ L), portanto, foi estipulado que as reações subsequentes seriam realizadas com o menor volume de DNA testado, ou seja, 0,5  $\mu$ L, por ser a amostra que apresentou menor quantidade de resíduos. Os padrões de amplificação obtidos com as variações da quantidade de DNA são mostrados na FIGURA 3.

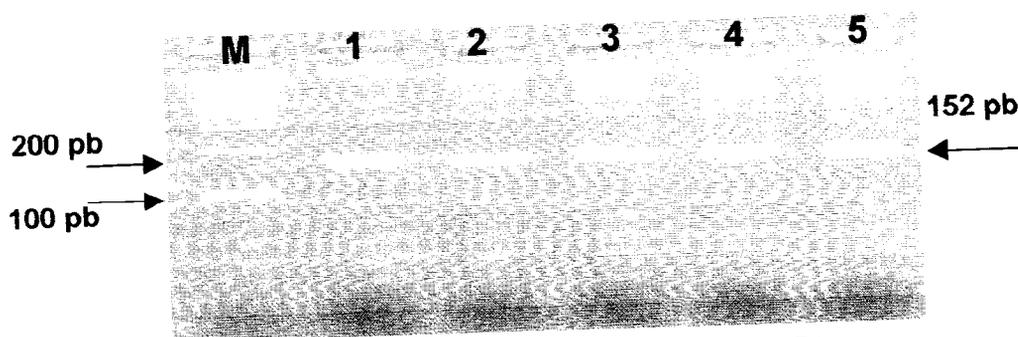


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 3,5% para otimização do volume de solução necessário para amplificação satisfatória. M – Marcador Molecular, 1 – 0,5 $\mu$ L de DNA, 2 – 1,0 $\mu$ L de DNA, 3 – 1,5  $\mu$ L de DNA, 4 – 2,0 $\mu$ L de DNA e 5 – 2,5 $\mu$ L de DNA.

Posteriormente ao período de otimização, cada uma das amostras foi amplificada, encontrando-se o fragmento esperado de 152 pb do gene *Obese* como mostrado na Figura 4.

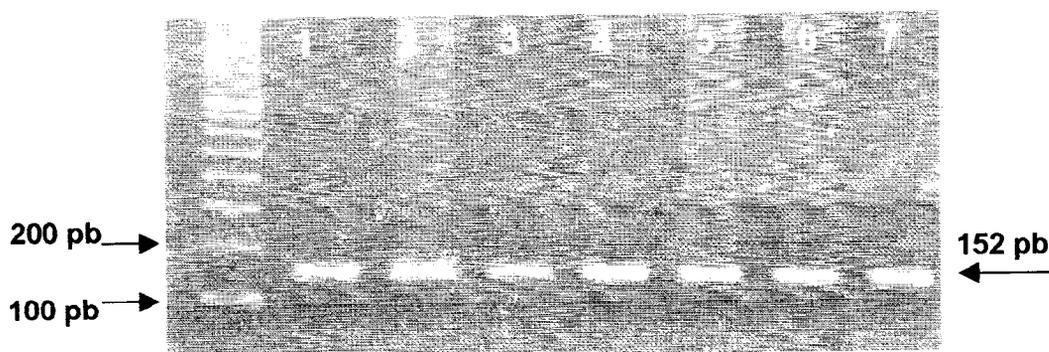


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amplicons do gene *Obese* (152 pb). Amplificação pré-restrição enzimática.

Após a amplificação dos fragmentos, e realizada a restrição enzimática com a enzima *HinfI*, foram verificados, como na Figura 5, os fragmentos de 152 pb para indivíduos de genótipo TT; 152, 84 e 68 pb para genótipos TC e finalmente, 84 e 68 pb para genótipos CC, que é mostrado claramente na Figura 6.



Figura 5: Eletroforese em gel de Agarose 3,5% de fragmentos gerados por restrição enzimática. Canaletas 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9: Genótipo TT, canaletas 4 e 6: genótipo TC.

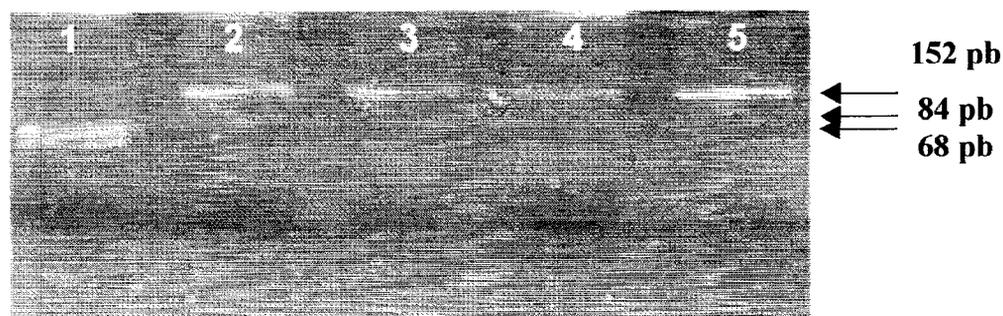


Figura 6: Eletroforese em gel de Agarose 3,5% de fragmento gerado por restrição enzimática. Canaleta 1: Genótipo CC; demais canaletas: Genótipo TT.

Com a realização da genotipagem por LIS-SSCP, concomitantemente com a PCR-RFLP, notou-se a possibilidade de utilização da primeira para a detecção deste polimorfismo, mostrando diferentes conformações, para visualização clara e precisa de cada um dos polimorfismos. Após realização de testes com diferentes concentrações, foi utilizado gel de acrilamida/bisacrilamida (49:1, 12%), submetido à eletroforese vertical por 4 horas, sob voltagem de 300 V, em temperatura ambiente, obtendo o padrão mostrado na Figura 7.

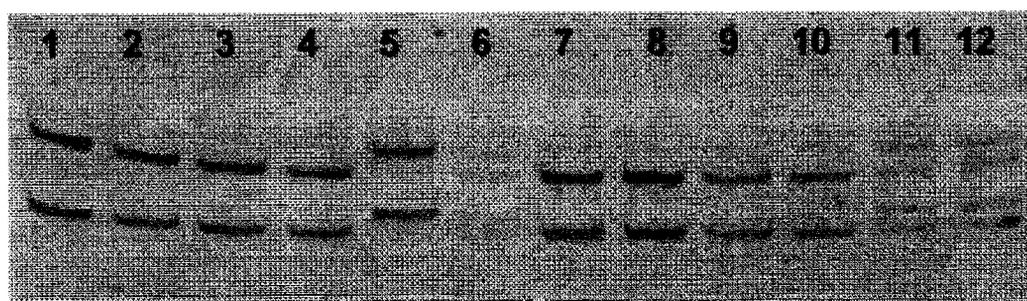


Figura 7: Padrão eletroforético LIS-SSCP para o polimorfismo *Hinfl* do gene *Obese*. Gel de Poli(acrilamida) (49:1) 12%. Canaletas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10: Genótipo TT. Canaletas 6, 11 e 12: Genótipo TC. Canaleta 5: Genótipo CC.

De acordo com este resultado, notamos que a técnica de LIS-SSCP, tem a total capacidade de substituir a PCR-RFLP no estudo deste polimorfismo do gene *Obese*, sem gerar nenhum problema com a

identificação dos polimorfismos, além de ser economicamente mais viável, pelo fato de não utilizar enzimas de restrição e o custo do gel de acrilamida ser inferior ao de Agarose, que deve ser bastante concentrado para que se possa detectar os polimorfismos (3,5%).

Pode-se mencionar, a confiabilidade do padrão obtido, devido à prévia genotipagem utilizando a enzima Hinf I.

Dos 216 animais genotipados, encontrou-se que 182 destes eram genótipo TT (84,26 %), 33 TC (15,28 %) e 01 CC (0,46%), as freqüências alélicas são mostradas na tabela 1 onde estas são comparadas com as encontradas anteriormente por STRATIL *et al.*, (1997); KRENKOVA & URBAN, (1998) e BORGES (1999).

Observando as freqüências genotípicas e alélicas encontradas, notamos a grande discrepância entre as freqüências dos indivíduos com genótipo TT, que possuem a maior freqüência na população (84,26%), e os indivíduos com genótipo CC que têm baixa freqüência (0,46%). Partindo-se deste ponto de vista, o genótipo CC apareceria teoricamente 0,994 vezes em uma população de 216 indivíduos, o que pôde ser confirmado pelo único genótipo CC encontrado na população estudada. Além disto, os dados obtidos nesta pesquisa foram notavelmente semelhantes aos anteriormente pesquisados por outros pesquisadores, não havendo diferença estatística significativa entre os resultados por eles encontrados e os do presente estudo (Tabela 1), mostrando-nos que em diferentes regiões podemos encontrar freqüências aproximadas, e também que, devido à estas semelhanças, marcadores moleculares universais podem ser futuramente gerados.

**TABELA 1: Freqüências alélicas para polimorfismo do gene Obese encontradas segundo os autores Stratil et al, Krenkova & Urban, Borges e presente estudo.**

Alelos	AUTORES			
	Stratil	Krenkova & Urban	Borges	Presente estudo
T	0,96	0,93	0,95	0,92
C	0,04	0,07	0,04	0,07

Tabela 1: Freqüências alélicas encontrados nos estudos de Stratil, et al (1997), Raça Landrace; Krenkova & Urban (1998) Landrace x Large White; Borges (1999) Landrace e presente estudo (2002). Não houve diferença estatística pelo teste de  $\chi^2$  para as freqüências dos alelos T e C do gene OB entre as populações avaliadas ( $p > 0,05$ ).

O valor de  $\chi^2$  encontrado foi 0,14212 ( $0,50 < P < 0,75$ ) mostrando que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy - Weinberg.

Para a análise da variância foram considerados somente os animais TT e TC devido ao fato do genótipo CC ter sido encontrado em apenas um indivíduo da população estudada, podendo ser portanto, estatisticamente insignificante. Dentre todas as características analisadas, notou-se diferenças significativas para DEP GPMD (Diferença Esperada na Progenie para Ganho de Peso Médio Diário) com animais TT com média de 49,27 g e TC com média 57,40 g e para DEP ET (DEP para Espessura de Toucinho), que apresentaram médias -0,04 mm para animais TT e 0,061 mm para os TC. As médias encontradas para cada característica em relação aos genótipos são mostradas na Tabela 2.

**TABELA 2: Médias para as características de desempenho segundo os genótipos do gene OB.**

GENÓTIPOS	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO					
	ET.	GPMD.	DEP.	DEP.	DEP.	Peso
	Real. (mm)	Real (Kg)	GPMD. (g)	ET. (mm)	LT. (N)	Final (Kg)
TT	11,24	0,865	49,27*	-0,04*	0,39	90,02
TC	11,52	0,884	57,40*	0,061*	0,37	91,77

Tabela 2: ET REAL = Espessura de Toucinho em mm; GPMD Real = Ganho de Peso Médio Diário em Kg; DEP GPMD = Diferença Esperada na Progenie para GPMD em g; DEP ET = Diferença Esperada na Progenie para Espessura de Toucinho em mm; DEP TL = Diferença Esperada na Progenie para Tamanho de Leitegada em número de animais. Foi observado diferença estatística entre as médias para DEP. GPMD ( $p = 0,0259$ ) e DEP. ET. ( $p = 0,0458$ ) segundo os genótipos para OB. Para as demais médias não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Ao encontrarmos tais resultados, podemos inferir que animais com genótipos TC geram progênies com maior GPMD do que animais de genótipo TT, devido às diferenças encontradas entre ambas as médias para a DEP GPMD, característica esta desejável para a indústria de carne suína. Em contrapartida, nota-se também, que poderíamos esperar em progênies de animais TC, uma maior Espessura de Toucinho, o que não é uma característica apreciada pelos produtores que valorizam a produção de carne magra para o abate. Portanto, os resultados encontrados são antagônicos, se o marcador molecular for observado isoladamente. Por este motivo, faz-se necessário estudos subsequentes para a busca de marcadores moleculares adicionais que se complementem, para a realização de uma seleção mais efetiva

associada à características de interesse econômico atendendo, concomitantemente, um maior número de características viáveis à produção comercial. Deve-se também considerar, que mesmo sendo estatisticamente insignificantes, alguns dados podem ser relevantes quando extrapolados para grandes indústrias produtoras de carne suína.

## 4 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e na própria realização deste trabalho, podemos concluir que:

- A técnica de PCR – RFLP é eficaz para a determinação do polimorfismo estudado e pode ser substituída com tranquilidade pela técnica de LIS – SSCP.
- O polimorfismo do gene Obese, não pode ser utilizado isoladamente para fins de seleção assistida, pois a associação com as características quantitativas para maiores DEP GPMD e DEP ET, é antagônica ao desejado, ou seja, espera-se maior ganho de peso e menor espessura de toucinho, o que não foi observado.
- A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy – Weinberg.
- Não há diferença significativa entre as frequências alélicas encontradas para o polimorfismo estudado neste trabalho e nos anteriormente publicados.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A workshop on DNA technologies and selection of animal genetic resources. Brisbane, Australia, June 14<sup>th</sup> to 26<sup>th</sup>, compiled and represented by CSIRO molecular animal genetics centre and centre for molecular biology and biotechnology at the University of Queensland. **Practical Manual**: p.70-71, 1992.

BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K.L. Biology of leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p.297-317, 2001.

BIDWELL, C.A.; S. JI, FRANK, G.R.; CORNELIUS, S.G.; WILLIS, G.M. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Animal Biotechnology**, v.8, p.191-206, 1997.

BORGES, G.S.N. **Influência do gene da obesidade em características quantitativas de suínos**. Tese ( Mestrado em Genética e Bioquímica). Uberlândia: Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 63pp, 1999.

BORGES, M. **Marcadores Moleculares e seus Efeitos Sobre Características Quantitativas de Bovinos de Corte**. Tese (Mestrado em Genética e Bioquímica). Uberlândia: Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 119 pp, 1997.

CHUA, S.C.J.; CHUNG, W.K.; WU-PENG, S.; LIU, S.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R.L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. **Science**, v.271, p.994-996, 1996.

DIO, R.D; Barbério, J. C.; Pradal, M. G.; Menezes, A. M. S., 2002, **Leptina: Fisiologia dos mecanismos mantenedores do peso “versus” fisiopatologia da obesidade – Informativo CRIESP**. Disponível em: < <http://www.criesp.com.br/inform/inabr96.htm>. Acesso em 17 Maio. 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, 3ª, p. 16-55, 1998.

FRANCO, M.M. **Estudo da Relação do Polimorfismo dos Gene Hal e GH com Características de Carcaça e Qualidade de Carne em 3 Raças de Suínos**. Tese (Mestrado em Genética e Bioquímica). Uberlândia: Instituto em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 73 pp , 1999.

FRIEDMAN, J.M. The alphabet of weight control. **Nature**, v.385, p.119-120. 1997.

HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E.  
The Biology of Leptin: A Review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.  
1405-1420, 1998.

HOY, M.A. Insect Molecular Genetics. An introduction to Principles and  
Applications. **Academic press**. San Diego, California, p. 203-240, 1994.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR  
PROTOCOLS – A Guide to Methods and Applications**. Academic  
Press Inc., Sandiego, California, 1990 .

KEENES, Y.M.; MURPHY, B.D.; POTHIER, F.; PALIN, M.-F.  
Characterization of Swine leptin (LEP) polymorphisms and their  
association with production traits. **International Society for Animal  
Science, Animal Genetics**, v. 32, p. 215-218, 2001.

KRENKOVÁ, L.; URBAN, T. The frequency of the genotypes and alleles  
of the obesity gene (LEP) in commercial hybrid pigs. **RFVS MSTM,  
Czech Republic**, no. 0472, 1998.

MARUYA, E.; SAJI, H.; YOKOYAMA, S. PCR-LIS-SSCP (low Ionic  
Strenght Single-stranded Conformation Polymorphism) – A Simple  
Method for Hight-resolution Allele Typing of HLA-DRB1, DQB1, and –  
DQB1. **Genome Research**, v.6, p. 51-57, 1996.

MERSMANN, H.J. The pig as a model for aberration associated with  
carbohydrate and lipid metabolism. **Swine in Biomedical Research**.  
Plemum Press, NY. v.2. p.981-995, 1986.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K., SEKIYA, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel eletrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.2766-2770, 1989.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na Agropecuária**. Editora Globo, 7<sup>a</sup>, 359 pp, 2000.

RAMSAY T. G.; YAN, X.; MORRISON, C. The Obesity gene in Swine: Sequence and Expression of Porcine Leptin. **Journal of Animal Science**, v. 76, p.484-490, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning : A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York,3:B.23,E.6, 2<sup>a</sup>, 1989.

SILVA, E.R. **Análise da correlação genética entre o fator V de Leiden e o enfarto do miocárdio**. Monografia ( Graduação em Ciências Biológicas). Uberlândia: Instituto de Biologia. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 30pp, 1998.

SMITH, G. D.; JACKSON, L. M.; FOSTER, D. L. Leptin regulation of reproductive and fertility. **Theriogenology**, v. 53, p.73-86, 2002.

SOLLER , M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. **J. of Daire Science**, v.73, p.2628-2646,1990.

STRATIL, A.; PEELMAN, L.J.; VANPOUCKE, M.; CEPICA, S. A HinfI PCR-RFLP at the porcine leptin (LEP) gene. **Animal Genetics**, v.28, p.370-383, 1997.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Technical Focus**, p. 5(6), p. 185-188, 1989.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, p.425-431, 1994.