

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Determinação da Frequência do Gene Halotano em
Diferentes Raças de Suínos**

Bárbara Amélia Aparecida Santana

**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
Dezembro - 1997**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Determinação da Frequência do Gene Halotano em
Diferentes Raças de Suínos**

Bárbara Amélia Aparecida Santana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**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
Dezembro - 1997**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Determinação da Frequência do Gene Halotano em
Diferentes Raças de Suínos

Bárbara Amélia Aparecida Santana

Aprovada pela banca examinadora em 11/12/97

Nota: _____

Luiz Ricardo Goulart Filho
Orientador

Robson Carlos Antunes
Có-Orientador

Maurício Borges
Có-Orientador

Uberlândia, 11 de dezembro de 1997

“No final só preservaremos
o que amarmos,
E só amaremos o que compreendermos,
E só compreenderemos
o que nos for ensinado.”

Dedico este trabalho às pessoas que
me deram e ensinaram a amar a vida, que,
mesmo privados do conhecimento científico,
sempre me incentivaram nessa busca...

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à todas as pessoas que me deram sua ajuda e seu apoio durante a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço a confiança, incentivo e entusiasmo do meu orientador Luiz Ricardo; ao Robson, agradeço a forma interessante, espontânea e criativa de ver e fazer ciência, lembrando que a vida tem sempre algo mais a nos oferecer... Ao Maurício devo a perseverança, eficiência e objetividade ao lidar com os fatos, algo que, confesso, venho tentando imitar!

Agradeço ainda, aos proprietários das Fazendas Barreiro Arantes e Cruzeiro do Sul, à Rezende Alimentos S/A, ao Prof. Isaú Gouveia Arantes (UNESP-Jaboticabal) pelo fornecimento das amostras de sangue dos animais utilizados.

Ao Prof. Heyder (Depto de Matemática), obrigada pelos momentos de discussão.

Aos amigos do convívio “genético”: Maurício Machain, que para mim é exemplo de dedicação e companheirismo, Graciele e sua inseparável praticidade, Vivian, Rosana, Soraya, Warley, Alexandre, Waldesse, Marcos, Kleber, Mirian, Marcelo, Gerson, Gustavo e Giovani (Veterinária), Ana Paula, Ju, Wânia (companheiras de “luta”)... e tantas outras pessoas... obrigada pelo apoio que por diversas vezes, foi mais que um apoio, mas um estímulo para continuar...

À tutora do PET/Biologia Ana Maria Bonetti, obrigada pela atenção, dinamismo e diversas oportunidades que com certeza contribuíram para meu crescimento... Aos petianos: Paulinha, Bruninho, Carlinhos, Elisângela, Fran, Jackie, Kaila, Káti, Londe, Raquel e Rod, agradeço ao convívio, me fizeram ver que é impossível agradar a todos, e ao mesmo tempo, me mostraram como é maravilhoso poder contar com amigos de verdade!

Agradeço a Deus por tudo o que me permitiu viver, pelas alegrias e tristezas, por toda a ansiedade e pelo “estresse”, que só me fizeram acreditar ainda mais na frase: **Sozinhos... não somos nada!!!**

As teorias científicas não estarão nunca aptas a fornecer uma descrição completa e definitiva da realidade. Serão sempre aproximações da verdadeira natureza das coisas. Em termos claros: os cientistas não lidam com a verdade; eles lidam com descrições da realidade limitadas e aproximadas.

Fritjof Capra

RESUMO

Uma mutação (C→T) no gene codificador da proteína que compõe o canal liberador de cálcio da musculatura esquelética em suínos, (gene Hal) está associada às manifestações da Síndrome do Estresse Suíno (PSS) ou Hipertermia Maligna (MH). Animais que morrem em decorrência dessa síndrome apresentam maior susceptibilidade a produzir carne de baixa qualidade (PSE: pálida, mole e exsudativa). Ao mesmo tempo, trata-se de uma característica autossômica recessiva relacionada com maior rendimento de carne magra. Utilizando a técnica PCR-RFLP, as frequências gênicas para o locus Hal foram estimadas para 565 animais distribuídos em 3 raças puras (Large White, Landrace e Pietrain), 2 raças nativas (Piau e Monteiro), 3 linhas cruzadas (LW/LD, LW/PI, LW/LD/PI) e uma amostra de animais sem raça definida. Para a PCR foram utilizados dois pares de *primers* REZSUI e SUI, que amplificam fragmentos de 862 e 282 pb, respectivamente. As restrições enzimáticas foram realizadas pelas enzimas Hha I (restrição no indivíduo normal) ou BsiHKA I (restrição no mutante). O primeiro par de *primers* não se mostrou eficiente. Devido ao seu tamanho, exige DNA de alto peso molecular, o que não foi conseguido com o processo de extração utilizado. Estimou-se para a raça Large White uma frequência de 9,04% do gene Hal, enquanto que para a Landrace 11,5% e para a Pietrain 100%. Os resultados mostraram que as raças puras apresentam frequências semelhantes às de países como Canadá, Inglaterra e EUA. As linhas cruzadas demonstraram que os cruzamentos são realizados ao acaso com relação ao gene Hal, pois as frequências observadas não diferiram significativamente das esperadas. Parece haver contradição neste fato, pois, os cruzamentos são selecionados para características de rendimento de carcaça, por sua vez ligadas ao gene Hal. Sugere-se então, uma pequena pressão de seleção nesses cruzamentos, ou uma ligação mais flexível do gene Hal com características de interesse econômico, permitindo a recombinação. As raças nacionais, e os animais sem raça definida não apresentaram o gene mutado. Acredita-se na atuação diferenciada de seleção natural. Finalmente, a genotipagem prévia dos animais pode auxiliar o criador ao monitorar os cruzamentos, podendo fixar ou não determinado gene na população.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Aspectos históricos sobre o desenvolvimento do suíno moderno	03
2.2. Importância da carne suína na alimentação	04
2.3. Suinocultura no Brasil e no mundo	05
2.4. A qualidade da carne suína	07
2.5. Causas das alterações fisiológicas na carne P.S.E. X Gene Halotano	11
2.6. Características do desempenho de carcaça relacionadas ao genótipo Hal	13
2.7. Detecção do genótipo Hal	15
2.8. Raças e a frequência do gene Hal	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Material Biológico	19
3.2. Extração e Quantificação do DNA	19
3.3. Amplificação do DNA	21
3.4. Restrição Enzimática	23
3.5. Eletroforese e Coloração	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Otimização da reação	26
4.2. Restrição Enzimática	28
4.3. Genotipagem dos animais	29
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade bastante rentável, fornecendo emprego a milhares de pessoas em todo o país. Além disso, com o crescente aumento da população mundial, o abastecimento protéico sob a forma de carne tornou-se de importância capital na alimentação humana.

A carne suína ainda é alvo de preconceitos, no que se refere à presença de gordura e colesterol. No entanto, um problema sólido enfrentado pela indústria suína reside na qualidade da carne, onde, o principal comprometimento instala-se na produção da carne P. S. E. (do inglês: *pale, soft, exsudative*). Hoje, já está estabelecida a relação entre a produção da carne PSE e o gene halotano, o qual codifica uma proteína do canal liberador de cálcio no retículo sarcoplasmático da musculatura esquelética.

O gene halotano teve como origem uma mutação de ponto, o que consequentemente levou à alteração de um aminoácido na cadeia polipeptídica da proteína. Essa alteração é considerada como sendo a responsável pela Síndrome do Estresse Suíno ou Hipertermia Maligna. Animais homozigotos (nn) para a mutação são altamente sensíveis a fatores ambientais estressantes, além de anestésicos como halotano (daí o nome gene halotano).

Baseados nessa sensibilidade, eram realizados os primeiros testes, que mais tarde foram substituídos por moderna biotecnologia (PCR - RFLP/*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), a qual permite um teste altamente específico, sensível e com apurada

acurácia, detectando não só os animais resistentes e sensíveis, mastambém, separando os genótipos em NN, Nn (resistentes) e nn (sensíveis).

Ao longo do processo de formação das raças, ainda não se conhece exatamente o motivo, mas, algumas raças fixaram uma maior frequência do gene. Gene este, que, segundo vários autores está relacionado à produção de carcaças mais magras e ao mesmo tempo à menores leitegadas, e é claro, sem contar com a predisposição a produção da carne P.S.E.

Na tentativa de se entender um pouco mais sobre a distribuição de frequência do gene em diferentes raças suínas no Brasil, propôs-se neste trabalho, estimar a frequência gênica em 3 raças puras (Large White, Landrace, Pietrain), em 2 raças nacionais (Piau e Monteiro), em 3 linhas cruzadas (LW/L, LW/P e LW/LD/P) e em uma população de animais sem raça definida (S.R.D.). Além disso, conhecidos os genótipos dos animais é possível a interferência do criador, manipulando os cruzamentos de tal forma, que se possa alterar essa frequência gênica ao longo das gerações, de acordo com os benefícios ou prejuízos ligados à determinada forma alélica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos históricos sobre o desenvolvimento do suíno moderno

Os suínos são o único artiodáctilo monogástrico vivendo em domesticidade. Apareceram na terra há cerca de 40 milhões de anos e pertencem ao gênero *Sus*. Com base em suas origens, todas as raças de suínos domésticos conhecidas atualmente podem ser filiadas a três grandes espécies: 1. *Sus scrofa*: tipo celta descendente do javali europeu; 2. *Sus vittatus*: tipo asiático originário da Índia; 3. *Sus mediterraneus*: tipo ibérico.

No Brasil, os primeiros porcos chegaram ao litoral paulista (São Vicente) em 1532, trazidos pelo navegador Martim Afonso de Souza. Pertenciam às raças da Península Ibérica, existentes em Portugal. Foi, porém, somente a partir do início deste século que começaram os processos de melhoramento por meio das importações de animais estrangeiros. O porco selvagem da Antigüidade possuía 70% da massa anterior e 30% de posterior. Vivia na floresta e alimentava-se de pastos nativos, frutas e pequenos animais. Era muito veloz e possuía como principal arma os seus dentes longos e afiados. Para resistir aos impactos das lutas, seus membros dianteiros eram fortes e musculosos, enquanto seu posterior era formado por fracas massas musculares. O porco tipo banha surgiu na época da domesticação, há 10 mil anos, o que perdurou até o início do século XX. Com a domesticação, o porco não necessitava mais procurar alimentos na floresta nem precisava mais fugir de seus inimigos. Vivendo em chiqueiros

fechados, recebia toda a alimentação que necessitava. Comendo mais e fazendo menos exercícios, começou a alterar sua composição corporal, passando a apresentar 50% de dianteiro e 50% de traseiro. O acúmulo de gordura fez com que passasse a ser considerado o animal ideal para o homem, já que lhe fornecia grande quantidade de banha (energia) e carne (proteína). É dessa época que advêm os conceitos de animais criados na lama e com altos teores de gordura na carcaça. O suíno moderno começou a ser desenvolvido no início do século, através do melhoramento genético com cruzamento de raças puras. Pressionados por uma melhor produtividade para tornar a espécie economicamente mais viável e pelas exigências da população por um animal com menos gordura, devido à substituição das mesmas pelas margarinas vegetais, os técnicos e criadores passaram a desenvolver um suíno (e não mais porco) com 30% de massa anterior e 70% de posterior. Os suínos começaram a apresentar menores teores de gordura na sua carcaça e a desenvolver massas musculares proeminentes, especialmente nas suas carnes nobres, como o lombo e o pernil. No início desta fantástica seleção, o suíno apresentava 40 a 45% de carne magra e espessuras de toucinho de 5 a 6 centímetros. Atualmente, graças aos programas de genética e nutrição, o suíno moderno apresenta de 55 a 60% de carne magra na carcaça e apenas 1,5 a 1 centímetro de espessura de toucinho. Esta evolução foi muito forte e eficiente também nas áreas de sanidade, manejo e instalações (Roppa, 1997).

2.2. Importância da carne suína na alimentação

A carne suína representa uma importante fonte protéica para a alimentação humana e é um dos produtos agropecuários de grande concorrência no mercado. Trata-se de um alimento que enriquece a refeição de maneira nutritiva e saborosa. Além de atrair pelo sabor, a carne suína é também excelente fonte de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, B6 e B12) e minerais (cálcio, fósforo, zinco e ferro). O conteúdo de gordura e colesterol apontados pelas pessoas como o ponto fraco da carne suína, tem

evoluído de forma expressiva nos últimos anos. De 1980 até hoje, o suíno moderno perdeu 31% do seu nível de gordura, 14% das calorias e 10% do colesterol, e espera-se para o ano 2000 um percentual de 60% de carne magra na carcaça. A quantidade de colesterol de uma carne não está diretamente relacionado à quantidade de gordura, ao consumir 100 g de carne suína, uma pessoa normal estará ingerindo 75 mg de colesterol, que constituem apenas 25 % da necessidades diárias deste nutriente, que são de 300 mg/dia. A carne suína atualmente disponível para o consumidor não faz jus aos errôneos conceitos de que é gordurosa e faz mal à saúde (Roppa, 1997).

2.3. Suinocultura no Brasil e no mundo

De 1970 a 1994, a suinocultura mundial cresceu numa taxa de 1,9% ao ano em relação à quantidade de animais. Os abates cresceram 2,5% ao ano e a produção de carne suína, 3% ao ano. A produção mundial e o rebanho suíno estão concentrados principalmente na Ásia e Região do Pacífico (49,5 e 55,9%, respectivamente), seguido pela Europa e a ex-URSS (3 e 25,7%), pela América do Norte e Central, América do Sul e África. Comparativamente às carnes de outras espécies animais, a carne suína é a mais produzida e consumida em todo o mundo, seguida por leite, carne bovina, frangos e ovos – o consumo *per capita* da população mundial é ao redor de 13 Kg de carne suína por habitante/ano. Prevê-se para o início do próximo século, grandes avanços nos resultados zootécnicos das granjas, o que contribuirá decisivamente para tornar a carne suína mais competitiva ao nível do consumidor (Roppa, 1996).

A população brasileira, aliás, poucas vezes comeu tanta carne de suíno como em 1996 – no que a doença da “vaca louca” teve grande participação. A taxa *per capita* atinge 9,3 Kg/habitante/ano, com aumento de 9,45% em relação ao ano passado (8,5 Kg). Mesmo assim, estamos muito aquém do consumo de países desenvolvidos, na Europa, por exemplo, o consumo *per capita* alcança 42 Kg. O rebanho suíno no Brasil teve um crescimento

discreto, da mesma forma que o consumo da carne suína nos últimos anos. Isso se comparado com a carne de frango. Hábitos de consumo, ligados na maior parte aos níveis de gordura e colesterol, mitos que envolvem a carne suína, são os principais fatores que justificam esse comportamento. A doença da “vaca louca” ajudou um pouco os suinocultores, que viram crescer a demanda da população pela carne de frango e de porco (Ferreira Júnior, 1997).

A suinocultura brasileira é uma das atividades mais importante do complexo pecuário nacional por ser preponderantemente desenvolvida em pequenas propriedades, gerando renda, alimento e emprego a mais de 2 milhões de proprietários rurais. O Brasil possui um rebanho de 34,8 milhões de suínos, o que lhe garante o 4º lugar no *ranking* mundial. Em relação à produção de carne, porém posiciona-se apenas como o 12º maior produtor. Este rebanho concentra-se principalmente nas regiões Sul (31,5%), Nordeste (28,5%) e Sudeste (18,2%). A região Centro-Oeste detém 10,6% do rebanho e vem apresentando um crescimento expressivo devido a sua facilidade em transformar, de forma barata e eficiente, a produção vegetal em animal. Os grandes programas de genética que se instalam no País deverão dar preferência para as regiões do Centro-Oeste e Triângulo Mineiro, pois regiões de cerrado é que permitem um adequado controle sanitário (Roppa, 1996).

A suinocultura exige pouco espaço e pequeno capital inicial e de giro. Os lucros são altamente compensadores, quando se usa tecnologia adequada. Os suínos possuem grande poder de assimilação de alimentos, transformando-os eficientemente em alimento humano. Realizam maior ganho em peso a partir de uma determinada quantidade de alimento como nenhuma outra espécie animal para carne (exceto frangos novos cuidadosamente manejados) e ainda convertem a energia dos alimentos em energia corporal mais eficientemente que qualquer outra classe de animal, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Eficiência da utilização dos alimentos para diferentes animais para cada 1000g de alimento ingerido.

Animal	Ganho de peso vivo (g)	Ganho de energia (Kcal)	Ganho de proteína (g)
Aves	356	782	101
Suínos	292	1492	30
Ovelhas	185	832	22
Bovinos	165	748	26
Peixes	715	935	118

Fonte: Meyer, 1963 citado por Cavalcanti, 1984.

2.4. A qualidade da carne suína

O plantel de suínos em algumas áreas do Brasil, em termos de qualidade, alcança níveis próximos aos dos melhores rebanhos do mundo. Países desenvolvidos tais como Dinamarca, França e Estados Unidos consideram importante critério de seleção a qualidade da carne suína (Bressan et al., 1993).

Em se tratando da suinocultura moderna, a qualidade da carne é um dos aspectos mais importantes. Segundo Cameron (1993), a qualidade da carne envolve quatro características principais: 1. organolépticas (influenciam na decisão de compra do consumidor); 2. tecnológicas (se relacionam com aspectos de industrialização e estocagem); 3. nutricionais (diz respeito à composição química e propriedades nutricionais) e 4. higiênicas (envolve ausência de resíduos indesejáveis e microorganismos).

A preocupação com a qualidade da carne como critério de seleção iniciou-se a partir de observações em que era verificado que determinados suínos apresentavam e transmitiam à sua descendência, características organolépticas e tecnológicas indesejáveis (Bressan et. al., 1993).

Foi verificado um crescente aumento do número de animais extremamente excitáveis, difíceis de serem manejados nos matadouros e que geralmente resultavam em carcaças P.S.E.: pálidas, flácidas e exsudativas após o abate.

Um breve histórico organizado por Felício (1986), facilita-nos compreender a evolução do conhecimento a respeito dessa anomalia tão preocupante para a indústria suína em todo o mundo. Na década de 40, professores americanos começaram a notar que nas indústrias, uma pequena percentagem dos pernis apresentava o problema, e diziam aos seus estudantes que tal anomalia era indesejável, porém, não davam maiores explicações, pois não havia pesquisa no assunto, e ainda eram raros nos EUA os pesquisadores da área de carnes. No início dos anos 50, os europeus começaram a investigar possíveis causas do P.S.E. e, por volta de 1956, iniciaram-se os projetos de pesquisa na área. Em meados da década de 60 já se sabia que a condição anômala da carne P.S.E. estava ligada ao rápido acúmulo de ácido láctico nos músculos e à temperatura mais alta dos mesmos.

Em 1968, Topel et al., descreveram os sintomas dos animais afetados pela condição a que deram o nome de dificuldade de adaptação ao estresse ou *Porcine Stress Syndrome* (P.S.S.). Conforme relataram, os primeiros sintomas consistem de tremores da cauda e da musculatura em geral e relutância ao movimento. A persistência do estresse resulta em dificuldade respiratória, manchas avermelhadas na pele, aumento da temperatura corporal, mucosas azuladas e acidose (o pH sanguíneo cai de 7,4 a 6,5). Depois disso, sobrevém um colapso e a morte. A carne resultante desses animais sensíveis, quando chegavam a ser abatidos, apresentava ou a condição P.S.E. Estava assim estabelecida uma relação direta entre sensibilidade ao estresse (P.S.S.) e o P.S.E. da carne.

A musculatura de um animal sadio tem um pH ligeiramente acima de 7,0, e uma reserva de glicose na forma de glicogênio, que corresponde a cerca de 1% do peso do músculo. No animal vivo essa reserva está sendo constantemente mobilizada para prover energia para a atividade muscular, e ao mesmo tempo sendo restaurada pela glicose que é levada pela corrente sanguínea.

Quando o suprimento de O_2 é insuficiente - em casos de exercícios físicos intensos ou estresse - o metabolismo anaeróbico é ativado para suprir energia à célula, ainda que de modo muito menos eficiente. Diferentemente do metabolismo aeróbico, que tem como produtos finais CO_2 e H_2O , o metabolismo anaeróbico tem como produto final o ácido lático, que acumula no músculo, fazendo baixar o pH e conduzindo à fadiga muscular. Porém, ao permanecer em repouso após a fadiga, a corrente sanguínea transporta o ácido lático do músculo para o fígado, e ao ingerir alimento, o organismo restabelece a reserva de glicogênio na musculatura.

Quando se abate um animal, sua musculatura não pára simplesmente de funcionar, tornando-se carne (Forrest et al.; 1975 citado por Felício, 1986). Após a morte, o metabolismo do músculo continua através de uma série de reações químicas e físicas que perduram por várias horas antes que o músculo se transforme em carne. Com a sangria do animal abatido, cessa o suprimento sanguíneo para o músculo. Na falta de O_2 , o metabolismo anaeróbico - conhecido como glicólise - é ativado para produzir as moléculas ricas em energia (ATP) necessárias à manutenção da integridade estrutural e da temperatura das células. Haverá então produção e acúmulo de ácido lático, e um conseqüente abaixamento do pH do músculo. O abaixamento do pH do músculo por acúmulo de ácido lático é uma das alterações mais importantes que ocorrem na transformação do músculo em carne. Da velocidade do declínio de pH, bem como do valor atingido ao final, quando o pH se estabiliza, dependem muitas das características e propriedades da carne.

Em condições normais, sob refrigeração, o pH da carne de porco fica entre 5,5 e 5,8 após 8 horas, entre 5,3 e 5,7, 24 horas após o abate. Na carne P.S.E., a glicólise é mais rápida, e o pH cai a valores próximos de 5,8, já na primeira hora pós-abate. Porém, isso não significa que o pH final dessa carne dê valores abaixo do pH da carne normal, pois a quantidade de glicogênio do músculo é limitada. Portanto, para que se possa diferenciar uma carne P.S.E. de outra normal, através de medidas de pH, é necessário que a medida seja feita 1 hora após o abate. Essa queda brusca de pH da carne P.S.E., que ocorre antes da dissipação de calor da massa muscular,

causa uma desnaturação das proteínas musculares. O grau de desnaturação das proteínas depende da temperatura do músculo e do valor de pH que é atingido logo após o abate. Isto é, quanto mais alta a temperatura do músculo e menor o pH, maior será a desnaturação de proteínas. A desnaturação causa uma redução na solubilidade das proteínas, uma perda na capacidade de reter água, e uma aparente descoloração do músculo. Alterações essas que são altamente indesejáveis tanto para a comercialização e degustação da carne, como para a fabricação de produtos cárneos (Forrest et al., 1975 citado por Felício, 1986).

Uma situação inversa se verifica quando os animais são submetidos a exercícios físicos ou agressões de meio ambiente causadores de estresse, como o transporte, a movimentação e o contato com outros animais até então desconhecidos, e a permanência em jejum no frigorífico por um tempo prolongado. Nessa situação, o músculo consome as suas reservas de glicogênio, o ácido lático formado é retirado pela corrente sanguínea, mas não há tempo para recomposição das suas reservas energéticas. Quando esses animais são abatidos, a glicólise é lenta por falta de glicogênio no músculo. O pH cai ligeiramente nas primeiras horas e depois se estabiliza, permanecendo em níveis superiores a 6,0 ao final. É a carne D.F.D. (do inglês: *dark, firm, dry*). Na carne D.F.D., em decorrência do pH alto, as proteínas musculares conservam uma grande capacidade para reter água no interior das células. Como consequência, a superfície de corte do músculo fica pegajosa e muito escura. Ainda devido ao pH alto, essa carne se deteriora com facilidade. Quando submetida ao processamento de presuntos, verifica-se na carne D.F.D. uma certa dificuldade para difusão dos sais de cura, resultando em deficiências no sabor e na cor do produto.

Em síntese, o P.S.E. está relacionado a uma queda brusca de pH (acúmulo de ácido lático) no músculo, e o D.F.D. a uma pequena - ou quase nula - queda de pH. Em ambos os casos, ficam alteradas as propriedades da carne, como a de refletir luz (cor) e a de reter água; a firmeza - ou flacidez - é apenas uma consequência da maior ou menor capacidade de reter água. A causa é sempre o estresse, geralmente, mas não necessariamente, associado a uma sensibilidade genética do animal.

2.5. Causas das alterações fisiológicas na carne P.S.E. X Gene Halotano

Vários estudos tentaram explicar as alterações fisiológicas que ocorrem na P.S.S. Desenvolveu-se então, um consenso entre os autores de que o músculo esquelético é o sítio primário do quadro apresentado pelos animais susceptíveis à síndrome.

Dentre os trabalhos de maior significado para a área, cita-se em 1987, Campbell et al., que caracterizaram uma proteína de 350 kDa, parte do canal liberador de cálcio localizado no retículo sarcoplasmático (de músculo esquelético), denominado receptor rianodine (RYR1), por ligar-se fortemente ao alcalóide da planta desse mesmo nome.

A importância dessa proteína com relação à P.S.S. só foi totalmente elucidada com o trabalho de Fujii et al. (1991). Estes autores determinaram uma relação entre a síndrome e uma mutação recessiva no gene que codifica para o receptor rianodine (chamado gene halotano); a mudança de uma base nitrogenada citosina para uma timina na posição 1843 da sequência de DNA, resultou na alteração do aminoácido 615: uma arginina cedeu lugar a uma cisteína. Os mesmos pesquisadores encontraram outros 18 polimorfismos entre as sequências nucleotídicas dos DNA complementares de animais normais, isto é, resistentes e sensíveis à P.S.S., mas nenhum deles resultou em substituição de aminoácidos na cadeia da proteína. Fujii et al. (1991) sugeriram, então, que o canal liberador de cálcio mutado é mais sensível, desencadeando com mais facilidade, a abertura do canal e liberação exagerada do íon para o citossol da célula, provocando contrações musculares, hipermetabolismo e hipertermia.

Boles et al. (1992) demonstraram diferenças na solubilidade e degradação de miofibrilas. Estas, apresentaram uma menor solubilidade quando provenientes de animais homozigotos recessivos para a Síndrome do Estresse Suíno, em comparação com os animais heterozigotos e normais para a mutação no gene halotano. A taxa de degradação pós-morte de proteínas estruturais é mais baixa em animais sensíveis ao halotano. A combinação entre a reduzida solubilidade das proteínas miofibrilares e a

baixa taxa de degradação de proteínas estruturais podem explicar, em parte, a reduzida qualidade da carne P.S.E.

Pesquisando a expressão de proteínas do estresse (Hsp 70), VanLaack et al. (1993), não encontraram diferenças na intensidade de expressão destas quanto aos genótipos homozigotos ou heterozigotos relacionados à mutação no gene que codifica para a proteína rianodine.

As várias pesquisas realizadas na tentativa de se relacionar o genótipo nn com a produção da carne P.S.E., levou a uma afirmação amplamente aceita no mundo científico, de que há uma íntima correlação entre os animais portadores do gene Hal e a condição P.S.E. da carne (Silveira, 1996).

No entanto, alguns pesquisadores não concordam com a relação: gene Hal - carne P.S.E., como ressalta Vries et al. (1994), o genótipo Hal por si só não explica totalmente a produção de carne P.S.E.

Pommier & Houde (1993) encontraram pequena porcentagem (0,6%) de animais recessivos (nn) que produziram carne normal. Ao passo que 67,6% de indivíduos normais (NN) e 28,7% de heterozigotos (Nn) produziram P.S.E. Os autores, dessa forma, foram levados a concluir que nem toda condição P.S.E. é causada pela presença do gene Hal, mas que a maioria dos suínos recessivos para este alelo (nn) produzem a carne pálida, mole e exsudativa.

Murray (1994), em seu trabalho realizado com suínos no Canadá, cita que a eliminação da mutação da população de animais, poderia abaixar a frequência de P.S.E. de 20% para 16,5% apenas, indicando que dependendo do manejo pré-abate, entre 10 e 63% dos animais Nn e entre 25 e 85% dos animais nn produzem P.S.E., o que é uma variação muito grande.

O melhoramento das carcaças para carne magra como fator de aumento da frequência de P.S.E. é questionado por Swatland (1995), após análise de pH medido 45 minutos depois do abate em carne de várias raças de suínos, em diferentes países e anos. O próprio autor, no entanto, lança a hipótese de que as mudanças no método de abate provavelmente tiveram maior contribuição para a redução do P.S.E. do que a redução da frequência do gene Hal. Jones et al. (1993) reforçam a hipótese de Swatland (1995). Estes pesquisadores, estudando o efeito do grau de cobertura e do grau de

marmoreio sobre a condição de carne P.S.E., evidenciaram que a carne magra não está relacionada com a incidência de P.S.E. Suínos com pequenos escores de marmoreio, no entanto, tendem a apresentar menor incidência de P.S.E do que suínos livres de marmoreio.

Em recente revisão sobre o assunto, Mickelson & Louis (1996) propõem que a síndrome seja realmente resultante de uma concentração aumentada de cálcio no citoplasma das fibras da musculatura esquelética. Segundo os autores, essa elevada concentração de cálcio poderia prolongar a estimulação da atividade contráctil do músculo e quebra de glicogênio, resultando em exacerbação do metabolismo e produção de calor (daí a síndrome também ser conhecida por Hipertermia Maligna), o que está, por sua vez, relacionado ao gene do canal liberador de cálcio.

2.6. Características de desempenho de carcaça relacionadas ao genótipo Hal

Elizondo et al. (1976) e Webb & Jordan (1978), utilizando o teste do halotano, compararam dados de carcaça (de raças puras e cruzadas) com os genótipos resistentes (NN ou Nn) e sensíveis (nn) ao halotano, com isso observaram que os animais susceptíveis ao estresse eram de menor comprimento, mas, em compensação exibiam uma carcaça mais magra, apesar de produzirem menor número de leitões nascidos vivos e apresentarem uma taxa de mortalidade mais elevada.

Discordando dos autores acima, a pesquisa de Kukoyi et al. (1981), que trabalharam com as mesmas raças que Elizondo et al. (1976), não observaram menor espessura de toucinho nos animais sensíveis, mas é importante mencionar que o tamanho da amostra pode ter influenciado.

Carden et al. (1985) sugerem que o gene Hal afeta negativamente a habilidade materna pré e pós-natal.

Ainda sem contar com o preciso teste de DNA, Simpson & Webb. (1989), concluíram que há vantagem econômica dos animais heterozigotos

em relação aos animais homozigotos dominantes, e que ambos, nn e Nn possuem mais carne magra na carcaça que os NN, mas ao contrário do esperado, animais NN tiveram maior rendimento de pernil. No entanto, Aalhus et al. (1991) observaram que a diferença de rendimento de carne magra entre os genótipos é devido, principalmente, a um maior rendimento de pernil dos animais nn.

De acordo com Zhang et al. (1992) que já contavam com a técnica PCR-RFLP, ação do gene Hal parece ser bastante aditiva para quantidade de carne, o que torna o heterozigoto (Nn) mais vantajoso que o homozigoto normal (NN), mas, envolve maior dominância para qualidade de carne e susceptibilidade ao estresse. Quando em homozigose, o gene recessivo (nn) parece aumentar o volume de água e anular a deposição de gordura em tecidos musculares, ao mesmo tempo em que reduz a qualidade da carne. Em animais que possuem somente uma cópia do gene (Nn), o crescimento é rápido e apresentam uma qualidade de carcaça relativamente boa quando comparada com grupos animais com duas cópias (nn). Portanto, para Zhang et al. a introdução do gene na indústria pode trazer certos benefícios, mas é recomendado uma aplicação bastante cuidadosa. Semelhante ao encontrado pelos autores anteriores, Antunes (1997), concluiu que o genótipo Nn é superior ao NN, quanto a qualidade de carcaça, produzindo carcaças com maior deposição de músculos e menor deposição de gordura, e ainda, observou que a expressão do gene Hal, ou dos genes a ele ligado, é diferente ao longo da carcaça, sendo maior no pernil e paleta, seguido do costado posterior e anterior, e menor na barriga.

Já Murray & Jones (1994) não encontraram diferença entre os genótipos NN e nn (raças Pietrain e Lacombe) quanto ao rendimento de carne predito.

Uma população de Pietrain pura por cruza, apresentando os genótipos Nn e nn, em uma pesquisa desenvolvida por Hanset et al. (1995) não mostrou diferença em relação ao ganho de peso médio diário, tanto para animais castrados quanto para inteiros. No entanto, animais inteiros nn tiveram um rendimento de carne maior e foram significativamente menos compridos.

Segundo O'Brien et al. (1994) os resultados obtidos das comparações entre os genótipos Hal descritos na literatura são bastante conflitantes pois, deve-se levar em conta que muitos dos trabalhos foram baseados no teste do halotano, que pode fornecer animais falsos-positivo e ainda não detecta o heterozigoto. Segundo os autores, os efeitos provocados pelo gene Hal ainda são diferentes dependendo da raça, isto é, o genótipo nn pode aumentar a produção de carne magra para determinada raça, enquanto produz menor efeito prejudicial na produção de P.S.E.

2.7. Detecção do genótipo

A síndrome em suínos pode, então, ser desencadeada por vários fatores estressantes como por exemplo, o manejo, o exercício, a desmama, a cópula, o transporte, a mistura com outros grupos de animais e o abate (Adeola & Ball, 1992), mas, outros fatores como: agentes anestésicos, cafeína, rianodina e relaxantes musculares também são capazes de desenvolver o quadro (O'Brien et al., 1990).

Baseados nessa sensibilidade ao gás halotano (anestésico), Sybesma & Eikelenboom (1969) citados por Santoro & Faucitano (1996), desenvolveram o teste do halotano, que permite a detecção dos animais resistentes e sensíveis, isto é, os indivíduos que submetidos ao anestésico mantêm o tônus muscular são resistentes, enquanto que, aqueles que apresentam rigidez, são considerados sensíveis ao halotano, portanto susceptíveis à PSS. Andresen & Jesen (1977) também citados por Santoro e Faucitano (1996) denominaram o locus responsável pela sensibilidade ao anestésico como sendo o locus Hal. Segundo Mikema et al. (1977) citados por Sellier (1995), os resistentes incluem os dominantes (NN ou Nn) e os sensíveis: os recessivos (nn).

No entanto, o teste não detectava os heterozigotos, problema que foi resolvido em 1991, com Fujii et al., que por meio de técnicas de genética molecular tornaram possível o diagnóstico dos três genótipos: NN, Nn e nn.

No mesmo ano, Otsu et al., concluíram que os pares alélicos C/C, C/T e T/T estavam associados, respectivamente, aos genótipos NN, Nn e nn.

Sem dúvida o uso dessa biotecnologia permitiu um grande avanço nos estudos da PSS. Os pesquisadores citados anteriormente, desenvolveram um teste não invasivo, baseado na técnica de PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase) associada à RFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição). Outros autores como Hugles et al. (1992), Houde et al. (1993), Brenig & Brem (1992), Russo et al. (1993) e Rempel et al. (1993), foram aprimorando e confirmando a eficiência da técnica na detecção dos genótipos para o halotano.

*Reação em Cadeia da Polimerase – PCR- criada por Kary Mullis em 1983 (SAIKI et. al.; 1985 e 1989), é um método enzimático utilizado para produzir várias sequências definidas de ácido nucléico alvo *in vitro*. O segmento desejado é marcado usando dois *primers* (sequência de oligonucleotídeos) específicos, nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Resumidamente, a amplificação de uma sequência alvo pela PCR opera da seguinte maneira: 1. desnaturação do DNA genômico; 2. anelamento dos *primers* específicos na fita simples; 3. extensão da fita nascente pela DNA polimerase, esse processo é repetido por muitas vezes no termociclador, o que nos fornece milhares de cópias de um mesmo fragmento. Outros elementos adicionados à reação juntamente à enzima DNA polimerase, *primers* e DNA alvo: deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), cloreto de magnésio (MgCl₂) e solução tampão.

2.8. Raças e a frequência do gene Hal

A raça Large White ou Yorkshire teve sua origem no Condado de York (Inglaterra), foi a que mais difundiu a suinocultura britânica pelo mundo. Alguns autores ingleses diferenciam o Large White e Yorkshire, atribuindo ao primeiro conformação mais comprida e ao segundo, um animal com pernil mais desenvolvido. Na prática, porém, é uma só raça com duas

denominações. Esses animais são caracteristicamente de cor branca, cabeça moderadamente longa, orelhas grandes e eretas do tipo asiático, são bastante resistentes, com boa adaptação ao nosso país.

A principal raça estrangeira em nosso meio, foi originada na Dinamarca e trata-se da Landrace. São animais totalmente brancos, caracterizam-se por terem cabeça moderadamente comprida, orelhas do tipo célticas compridas, delgadas e completamente para frente. É uma raça altamente prolífera, precoce e produtiva, têm tido uma aclimatação satisfatória.

A raça Pietrain originária da Bélgica, apresenta pelagem malhada de branco e preto, orelhas médias, eretas, do tipo asiático. Os animais são conhecidos como “dos quatro pernis” por possuírem excelente massa muscular no quarto dianteiro (Cavalcanti, 1984). A maior limitação da raça é a alta frequência do gene Hal, sendo o maior produtor da carne P.S.E. (O'Brien, 1995).

A raça Piau, é considerada a melhor e mais importante raça nacional. Raça melhorada pelo veterinário Teixeira Viana, em São Carlos, São Paulo. A cor é branco-creme com manchas pretas que devem ser bem definidas e proporcionalmente distribuídas sobre o corpo. Há também animais mais escuros. Têm forte tendência a gordura. Existem vários grupos locais, sendo difícil caracterizar um tipo médio da raça (Cavalcanti, 1984).

Os suínos conhecidos como Monteiro são animais domesticados, mas que, se criam na natureza de maneira selvagem, mais especificamente na região do Pantanal. Não há comprovação científica, mas especula-se que esses animais, sendo criados de forma selvagem, talvez tenham se cruzado com o javali, (parente próximo dos suínos), isso porque os Monteiro se assemelham bastante com essa espécie: apresentam bastante pêlo, maxilares longos, dentes proeminentes (Comunicação pessoal: Prof. Isaú Gouveia Arantes, UNESP-Jaboticabal). Os animais sem raça definida não passaram por nenhum programa de melhoramento genético, portanto não possuem raça apurada, o que pode explicar os baixos índices de produtividade expressos na prolificidade, precocidade e qualidade de carcaça, sendo animais mais apropriados para produção de banha.

No ano de 1995, em uma revisão sobre a frequência do gene halotano nas raças de suínos, O'Brien fornece uma idéia sobre a distribuição do Hal nas populações do Canadá, Inglaterra e EUA, o que pode ser observado na Tabela 2 parcialmente transposta.

Tabela 2. Frequências dos genótipos Hal nas raças Pietrain, Poland China, Landrace, Duroc e Large White nos EUA, Canadá e Inglaterra.

Raça	País	Nº testes	% NN	%Nn	%nn	Frequência do gene Hal
Pietrain	Canadá	6	00,0	50,0	50,0	0,750
	USA	66	03,0	53,0	43,9	0,705
Poland	USA	30	20,0	60,0	20,0	0,500
China						
	Canadá	2885	67,5	29,5	03,0	0,177
Landrace	USA	1519	60,4	38,1	01,5	0,205
	Inglaterra	1954	58,5	38,2	03,3	0,224
Duroc	Canadá	1100	85,0	14,8	00,2	0,076
	USA	682	64,7	34,6	00,7	0,180
	Inglaterra	98	99,0	01,0	00,0	0,005
Large White	Canadá	606	82,8	17,0	00,2	0,087
	USA	183	77,0	21,9	01,1	0,120
	Inglaterra	1850	77,4	22,2	00,4	0,115

(O'Brien, 1995, modificado).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foram utilizadas para realização deste trabalho amostras de sangue de 428 suínos distribuídos em três raças puras (73 Large White/LW, 298 Landrace/LD e 57 Pietrain/PI), três linhas cruzadas: LWxPI com 28 animais, LWxLD, 32 e LW/LD/PI com 30 suínos, além de um grupo de 30 animais sem raça definida, 8 animais Piau e por fim 9 Monteiros. Totalizando um número igual a 565 animais. O sangue dos animais puros e cruzados foram cedidos pela estação de melhoramento genético da empresa Rezende Alimentos S/A, localizada no município de Uberlândia, enquanto que, dos animais sem raça definida foram coletados na Fazenda Barreiro Arantes, no município de Campina Verde, Triângulo Mineiro. Os Piau foram provenientes da Fazenda Cruzeiro do Sul (município de Uberaba) e os Monteiros, foram coletados na região do rio Taquari, Fazenda Santa Cecília, município de Corumbá, estado de Mato Grosso.

3.2. Extração e quantificação do DNA

Todos os animais tiveram de 3 a 5 ml de sangue coletado por meio da punção da veia marginal da orelha, em tubos de coleta à vácuo (agulha descartável) contendo citrato de sódio como anticoagulante. O sangue foi, então, homogeneizado lentamente, sem agitação vigorosa, para evitar

hemólise. Após homogeneização, que também tinha como propósito evitar a formação de coágulos, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e enviados ao Laboratório de Genética Molecular-UFU, onde, já devidamente identificados, foram mantidos a uma temperatura de 4°C por 72 horas (para sedimentação da camada de leucócitos), em seguida, procedeu-se a extração, realizada de acordo com o método descrito em: A Workshop on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources (1992) com modificações: Foram tomados 500 µl de sangue na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação. Inicialmente, o volume de sangue foi adicionado a um tubo de microcentrifuga de 2 ml, então adicionou-se 1 ml de tampão de lise não diluído (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, pH 7.5, 640 mM de sacarose, 10 mM de MgCl₂ e 4% de Triton X-100);agitou-se lentamente e incubou-se em gelo por 5-10 minutos. Procedeu-se uma primeira centrifugação à 4000 g (8000 rpm) por 5 minutos, seguida por mais 2-3 lavagens com tampão de lise diluído duas vezes, intercaladas por 10-15 minutos de incubação em gelo. Após a obtenção de um precipitado livre de hemoglobina, adicionou-se 200 µl de 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, sarcosyl 1% e 10 µl de proteinase K (10 mg/ml) e incubou-se durante a noite a 50°C. Acrescentou-se então, 500 µl de 8 M de guanidina-HCl e 0,49 M de acetato de amônia, agitou-se por 1-2 horas e adicionou-se 800 µl de isopropanol à temperatura ambiente, agitando-se suavemente até precipitar o DNA. Centrifugou-se dessa forma, a 4000 g por 5-10 minutos, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se mais duas lavagens do precipitado de DNA (centrifugações a 4000 g por 1-2 minutos) com isopropanol 60% ou etanol 70%. Secou-se sob vácuo e diluiu-se em 100 - 500 µl de 10 mM Tris-HCl, 1mM de EDTA (de acordo com o tamanho do precipitado visível). Normalmente, foi necessário um período de 1-4 horas de incubação a 65°C para completa diluição do precipitado.

Após a diluição do DNA, uma alíquota de 50 µl da amostra foi diluída em 950 µl de água ultrapura, seguindo-se a quantificação em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 260 nm (nanômetros). Foi tomada também a absorbância a 280 nm para o cálculo da relação DNA/proteína

por meio da fórmula A_{260}/A_{280} (onde a faixa proporcional ótima deve encontrar-se entre 1,6 e 2,0). A concentração do DNA foi verificada segundo a fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ em } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 50^* \times f,$$

onde, A_{260} é absorvância a 260 nm e f é o fator de diluição, neste caso 1000/50.

* 1 unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 50 μ g/ml de DNA.

3.3. Amplificação do DNA

O DNA foi amplificado por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (SAIKI et. al.; 1985 e 1988).

Foram utilizados neste trabalho dois pares de *primers* (desenhados por BORGES et al., 1997), cujas seqüências podem ser visualizadas na Tabela 3. Estes oligonucleotídeos amplificam uma região específica do genoma que codifica para a proteína rianodine.

Tabela 3. Seqüência nucleotídica dos *primers* usados na amplificação do DNA.

Primer	Seqüência	Tamanho do fragmento gerado
REZSUI 1 REZSUI 2	5' CCC ATC CAG AAC CTC GTC TTG GTC TCC 3' 3' GCT CTG CCT TTC CGT TTT TCC TGC GTA 5'	862 pb*
SUI 1 SUI 2	5' CCT GGG ACA TCA TCC TTC TG 3' 3' GCT TAG AAC CCT CCA CCA CC 5'	282 pb

pb: pares de bases.

As reações de amplificação sofreram inicialmente um processo de otimização para cada par de *primers*, isto é, por meio da variação da concentração de reagentes da PCR, conseguiu-se obter uma combinação onde a amplificação foi ótima. Estas variações podem ser contempladas na Tabela 4. (Obs: a quantidade de dNTPs foi mantida constante e igual a 8 nmoles por reação.)

Tabela 4. Otimização da PCR para os *primers* REZSUI 1 e 2 e SUI 1 e 2.

Reações	MgCl₂ (mM)	Primers REZSUI 1 e 2 (pmoles)	DNA (ng)	Taq (U)
1	1	5	25	0,5
2	1	5	25	1
3	1	5	50	0,5
4	1	5	50	1
5	1	10	25	0,5
6	1	10	25	1
7	1	10	50	0,5
8	1	10	50	1
9	1	15	25	0,5
10	1	15	25	1
11	1	15	50	0,5
12	1	15	50	1
Reações	MgCl₂ (mM)	Primers SUI 1 e 2 (pmoles)	DNA (ng)	Taq
1	1	10	50	1
2	2	10	50	1
3	3	10	50	1
4	1	15	50	1
5	2	15	50	1
6	3	15	50	1

Para o *primer* REZSUI a amplificação foi realizada segundo o programa:

- Passo 1: 94°C por 5 minutos para desnaturação a dupla fita
- Passo 2: 62°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers*
- Passo 3: 72°C por 40 segundos para extensão
- Passo 4: 94°C por 1 minuto
- Passo 5: ir para o passo 2 por mais 4 vezes
- Passo 6: 60°C por 1 minuto
- Passo 7: 72°C por 1 minuto
- Passo 8: 94°C por 50 segundos
- Passo 9: ir para o passo 6 por mais 9 vezes
- Passo 10: 62°C por 1 minuto
- Passo 11: 72°C por 1 minuto
- Passo 12: 94°C por 50 segundos
- Passo 13: ir para o passo 10 por mais 9 vezes
- Passo 14: 63°C por 1 minuto

Passo 15: 72°C por 1 minuto e 20 segundos

Passo 16: 94°C por 1 minuto

Passo 17: ir para o passo 14 por mais 8 vezes

Passo 18: 63°C por 1 minuto

Passo 19: 72°C por 10 segundos

Passo 20: 4°C por tempo indeterminado,

O REZSUI é responsável pela amplificação de um fragmento de 862 pares de bases (pb). Já o *primer* SUI amplifica uma região de 282 pb utilizando os seguintes ciclos no termociclador:

Passo 1: 95°C por 5 minutos

Passo 2: 94 °C por 20 segundos

Passo 3: 56 °C por 30 segundos

Passo 4: 72 °C por 30 segundos

Passo 5: ir para o passo 2 por mais 35 vezes

Passo 6: 72 °C por 30 segundos para extensão final

Passo 7: 4 °C por tempo indeterminado

Vale ressaltar, que o cálculo da temperatura e duração de cada ciclo são obtidos a partir do tamanho e sequência nucleotídica, dos *primers* e do fragmento a ser amplificado.

3.4. Restrição Enzimática

Para a determinação do genótipo dos animais fez-se uso da técnica de PCR associada à RFLP, onde a digestão com as enzimas de restrição Hha I e BsiHKA I nos permitiram identificar os animais normais (NN), heterozigotos (Nn) e recessivos (nn) para a mutação no gene que codifica para a proteína rianodine. Para a restrição enzimática, utilizou-se 4 U de endonuclease para cada reação.

O sítio de restrição de cada enzima, juntamente com a temperatura em que cada uma atinge sua atividade ótima e o tempo necessário para que não ocorra restrição parcial são mostrados na Tabela 5. Veja na Figura 1 um esquema, mostrando os *primers*, e sítios de restrição das endonucleases.

Tabela 5. Endonucleases com seus respectivos sítios de restrição (*), temperatura ótima e tempo de atuação necessários para a completa digestão enzimática.

Enzima	Sítio de Restrição	Temperatura ótima (°C)	Tempo necessário (hora)
Hha I	5'...GCG* C...3' 3'...C* GCG...5'	37	1
BsiHKA I	5'...GT/AGCT/A* C...3' 3'...C* A/TCGA/TG...5'	65	4

```

CCCGGCCATC CAGAACCTCG TCTTGGTCTC CGTGCTCTCG CACTGACCCG GCCTTTCACT
CTTGCCTCCG ACTTCTCACC CCTTGCTCCC GTCTCTCCTT TCCTCCTCTG CTGATGCCCCG
ATCCCATCCC TCACAGCCCC CTGCGTCTCA CCAGACCTTT CTCTTTGACC TTGATCTCCC
TGTGTCATCC CTGACCTCC CGCTTTCACC ACCTCTTCTC AGTCACATCC CCACCTCCCA
CCTGGGACA TCATCCTTCT GGCTTCCAC CCTGGGTCTT CCATGGACCA CACCCTCCCC
GCAAGTGCCC TCACACCTG ACCTCTGACC TTGACCCCTA GGTGCTGGAT GTCCTGTGTT
CCCTGTGTGT GTGCAATGGT GTGGCCGTG G CT CCAACCA AGATCTCATT ACTGAGAACT
TGCTCCCTGG CCGCGAGCTT CTGCTGCAGA CAAACCTCAT CAACTATGTC ACCAGGTCTG
GCCCCCAAC CTTTGACCCC AGAGCTTAGA ACCCTCCACC ACCCCGCCCC GACTCAGAGA
CTCCACTCCG GTGAATGGCC CTTCTCCGT CCCCCACCCC CGGACTTAAT GCCAGTCCCC
ACCCCTGTCG TGCTTGTCCC AGCTTGTCCC TGGCTTCTTA CTTCTCTTAC CCTCTTCCC
CAAACTCTTT CTCCCTCTGT CTCTTCTCTT TTCTCTCTTT CTGTGTTGC TCTCTTTGTC
TGTCTAGCTA TTTCTCCTCC ATCTCTTTT TAGGTCTTTC TCTCATCTCT CTCTCTGTC
TTTTACGTC TCTCTGCTG TCTGCCCTG CTTCTCTCT CTGTGTCTCT GTCTCCATGG
CTCTGCCTTT CCGTTTTTCC TCGGATGGTG TCTCTTGTG TTTTCCCTC TCCCCCCCAG

```

Figura 1. Parte da sequência do gene RYR1 ou Hal (GeneBank acesso M91456), com os respectivos primers indicados: **REZSUI 1 e 2**, em vermelho e **SUI 1 e 2**, em verde. Em rosa é mostrado o nucleotídeo **C** onde ocorre a mutação (C→T) e, na “tesoura” amarela (*) o sítio de restrição da enzima Hha I no indivíduo normal (C) e na “tesoura” azul (T) o sítio da enzima Bsi HKA I no mutante (T).

3.5. Eletroforese e coloração

Após a restrição com Hha I ou BsiHKA I, foram adicionados aos tubos 5 μ l de *Load Dye* (azul de bromofenol, xileno cianol) e, em seguida, 10 μ l de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 2% (para fragmento amplificado com SUI 1 e 2) ou 1% (para fragmento gerado a partir de REZSUI 1 e 2) sob voltagem constante de 100 V em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato 10mM, EDTA 1mM) por cerca de 1 hora.

Seguindo-se a técnica de eletroforese, os géis foram corados por brometo de etídio (Sambrook et al., 1989), o que possibilitou a visualização do padrão de bandas por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da reação

Como o processo de extração apresentou-se bastante otimizado, dispensou-se o uso do espectrofotômetro e fez-se a utilização direta de 2µl de DNA diluído em Tris-EDTA, sem que este estivesse sido previamente quantificado. Dessa forma, a quantidade de DNA em cada reação variou de 50 a 200 ng. O que, no presente trabalho não representou um fator limitante para a reação em cadeia da polimerase.

É importante mencionar que parte da amostra teve o processo de extração de DNA inviabilizado, o que é atribuído à coagulação do sangue, comprometendo a amplificação.

Para realizar a amplificação do fragmento de interesse do DNA genômico extraído de cada animal, foi necessário, anteriormente, a otimização da reação. Após o processo de otimização para os *primers* REZSUI, pode-se observar pela Figura 2, que as reações das colunas número 6, 7 e 8 apresentaram bons resultados, assim escolheu-se a melhor amplificação com os menores gastos de reagentes. Dessa forma, todas as reações com os *primers* REZSUI foram realizadas sob as seguintes condições (coluna 8): 1 U de Taq DNA Polimerase, 1 mM de MgCl₂, 8 nmoles de dNTPs e 10 pmoles de cada *primer*, num volume total de 20 µl. Observou-se ainda, que nas 4 últimas reações, onde utilizou-se uma maior quantidade de

primers (15 pmoles), houve formação de produtos de dimerização, o que pode confundir o diagnóstico correto dos animais.

Observou-se ainda, a formação de dímeros também na coluna 6 (Figura 2), reação que consiste de 10 pmoles de *primers*, 1 U de Taq DNA Polimerase e uma menor quantidade de DNA, condição a que se atribui a formação dos dímeros de *primers*.

Já para os *primers* SUI, o melhor resultado foi obtido na seguinte reação: 1 U de Taq DNA Polimerase, 2 mM de MgCl₂, 8 nmoles de dNTPs e 10 pmoles de cada *primer*, no mesmo volume final da reação anterior, (coluna 2, na Figura 3). Nesse caso, em nenhuma das condições de otimização, houve formação de dímeros. Provavelmente pelo fato de ser um oligonucleotídeo menor e com menor número de sequências complementares.

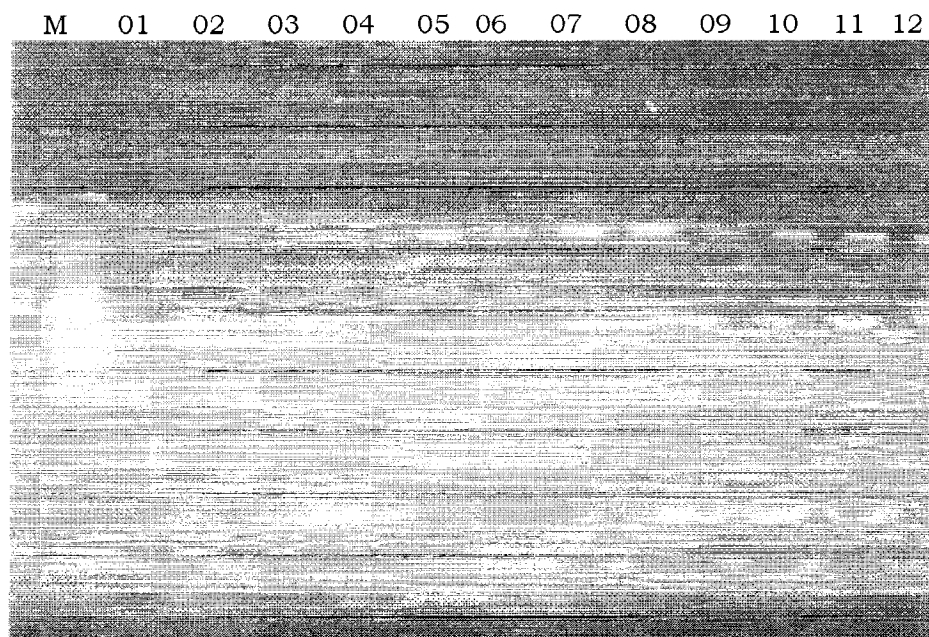


Fig.2. Reação de otimização para o *primer* REZSUI, onde M=marcador, e coluna 8 apresentou melhor amplificação do fragmento de 862 pb, observar dímeros (ver texto).

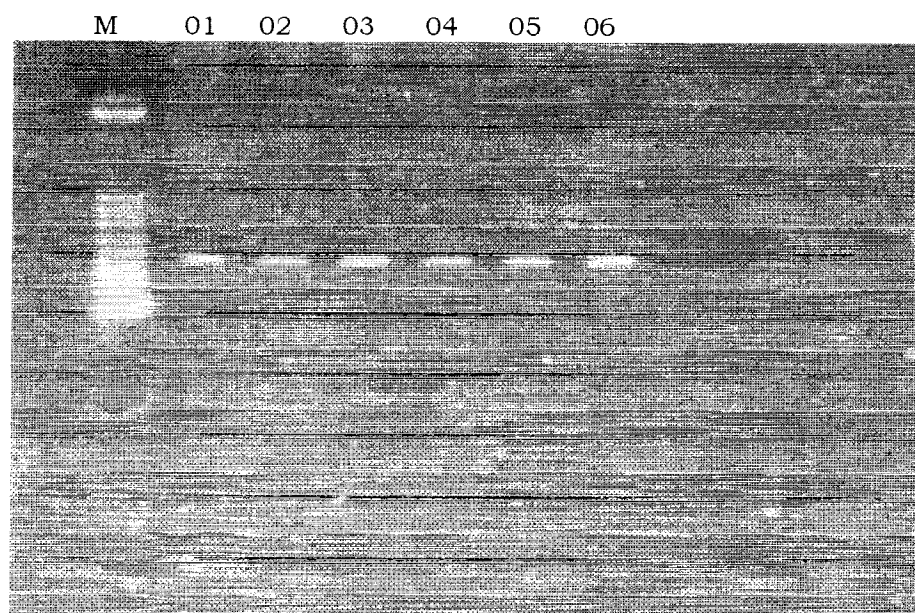


Fig.3. Reação de otimização para o *primer* SUI, onde M=marcador, e coluna 2 apresentou melhor amplificação do fragmento de 282 pb (ver texto).

4.2. Restrição enzimática

De acordo com os sítios de restrição apresentados anteriormente, percebe-se que indivíduos com a mutação (1843: C→T) perdem seu sítio de restrição para a endonuclease Hha I, enquanto que, inversamente, ganham o mesmo para a BsiHKA I. Portanto, a primeira enzima cliva o indivíduo normal, enquanto que a segunda o indivíduo mutante.

Considerando um indivíduo **normal**, a restrição enzimática por Hha I de um produto de amplificação dos *primer* REZSUI, gera dois fragmentos: de 477 e 385 pb, enquanto que para os *primers* SUI são gerados fragmentos de 150 e 132 pb. Para a enzima BsiHKA I, praticamente fragmentos de mesmos tamanhos são gerados para os produtos de amplificação dos *primers* REZSUI e SUI, respectivamente, só que desta vez para o indivíduo **mutante** (Figura 4).

Os fragmentos gerados pelos *primers* SUI (150 e 132 pb), geralmente não podem ser distinguidos no gel, portanto, são visualizados como uma única banda, que na verdade são duas bastante próximas.

	Hha I			BsiHKA I		
	NN	Nn	nn	NN	Nn	nn
REZSUI						
862 pb		■	■	■	■	
477 pb	■	■			■	■
385 pb	■	■			■	■
	Hha I			BsiHKA I		
	NN	Nn	nn	NN	Nn	nn
SUI						
282 pb		■	■	■	■	
150 pb	■	■			■	■
132 pb	■	■			■	■

Fig. 4. Esquema do padrão de bandas geradas pelas endonucleases Hha I e BsiHKA I na restrição dos produtos de amplificação dos *primers* REZSUI e SUI. NN=homozigoto normal, Nn= heterozigoto, nn= homozigoto recessivo

4.3. Genotipagem dos animais

Os resultados iniciais de amplificação do *primer* REZSUI foram satisfatórios (Figura 5). No entanto, posteriormente, a eficiência foi bastante comprometida. Acredita-se que os problemas com a amplificação sejam resultado da baixa qualidade do DNA extraído, já que o *primer* amplifica uma região relativamente extensa do DNA (862 pb)

Quanto ao par de *primers* SUI 1 e 2, foi obtida uma alta eficiência de amplificação, observando-se que este oligonucleotídeo gera um fragmento de 282 pb (bem menor que o *primer* anterior). Após a otimização da reação, este *primer* foi adequadamente utilizado para exame rotineiro de detecção do genótipo Hal (Figura 6).

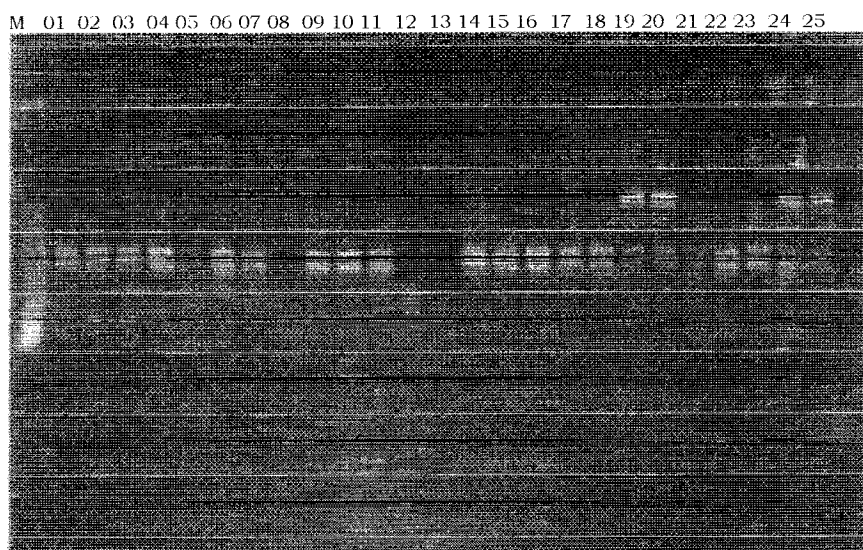


Fig.5. Genotipagem de suínos da raça Landrace com o *primers* REZSUI e restrição com a enzima Hha I, onde: M=marcador de peso molecular, onde, colunas 1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,14,15,16,17,18,21,22,23 são NN; e 19,20,24 e 25 são Nn, colunas 8,12 e 13 não amplificaram (sangue coagulado).

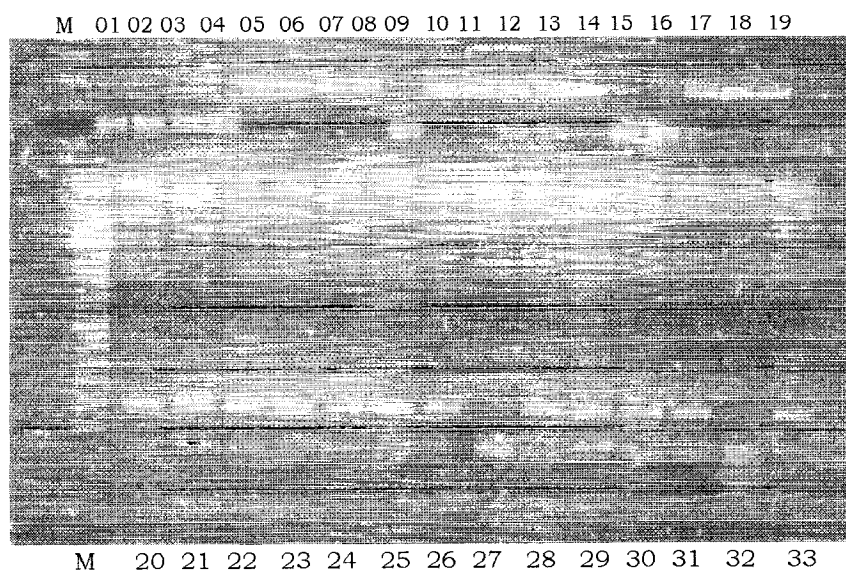


Fig.6. Genotipagem de suínos Pietrain (1-4), Large White (5-8), Landrace (9-12), Cruzados LW/PI (13-33), com o *primers* SUI e restrição com enzima BsiHKA I, onde: M=marcador de peso molecular e colunas 5,6,7,8,10, e 11 são NN; 12,13,14,17,18,19,20,21,22,23,24, 25,26,28,29,30,31 e 33 são Nn e 1,2,3,4,9,15,16,27 e 32 são nn.

Estabelecida a utilização dos *primers* SUI nas reações rotineiras do laboratório, é necessário, atentar para o fato de que com a restrição enzimática (Hha I ou BsiHKA I) o indivíduo heterozigoto (Nn) produz 3 fragmentos: um de 282 pb (trata-se do fragmento normal - N - na digestão com BsiHKA I ou do fragmento mutante - n - na digestão com Hha I), um fragmento de 150 e outro de 132 pb (n - BsiHKA I ou N - Hha I), que geralmente não podem ser individualizados. Exatamente pelo fato de se tratar de 2 bandas distintas (embora próximas), estas, apresentam intensidade de fluorescência bastante inferior à intensidade do fragmento de 282 pb (Figura 6). Com isso, ao diagnosticar os animais heterozigotos faz-se necessário alta precisão no gel, para detectar além do fragmento evidente de 282 pb, os outros dois (150 e 132 pb) de menor fluorescência, caso não seja possível, é preciso repetir a reação ou a eletroforese para se distinguir melhor os fragmentos e não correr riscos de diagnosticar erroneamente o indivíduo.

Após a genotipagem dos 565 animais, foram obtidas as frequências genotípicas e alélicas que podem ser visualizadas na Tabela 6.

Na Tabela 7, comparou-se as frequências genotípicas observadas nos animais cruzados, com as frequências esperadas, as quais foram calculadas a partir dos dados de frequências das raças parentais.

Tabela 6. Frequências genóticas e alélicas dos grupos animais genotipados

Raça	Genótipos						Frequência alélica
	NN		Nn		nn		
	n° de testes	%	n° de testes	%	n° de testes	%	
Large White	60	82,2	12	16,4	1	1,4	N= 0,904 n= 0,096
Landrace	235	78,8	58	19,5	5	1,7	N= 0,885 n= 0,115
Pietrain	-	-	-	-	57	100,0	N= 0,000 n= 1,000
LW/PI	-	-	24	85,7	4	14,3	N= 0,452 n= 0,548
LW/LD	28	87,5	4	12,5	-	-	N= 0,895 n= 0,105
LW/LD/PI	16	53,3	13	43,3	1	4,0	N= 0,673 n= 0,327
S.R.D.	30	100,0	-	-	-	-	N= 1,000 n= 0,000
PIAU	8	100,0	-	-	-	-	N= 1,000 n= 0,000
MONTEIRO	9	100,0	-	-	-	-	N= 1,000 n= 0,000

Podemos observar pelos dados obtidos, que a frequência do gene Hal na raça Large White aproxima-se bastante daquelas encontradas no Canadá, Inglaterra e EUA, citadas por O'Brien (1995) (ver revisão bibliográfica). No

caso da raça Landrace, foi encontrada uma frequência um pouco menor que naqueles países. Todos os animais Pietrain genotipados foram homozigotos para o gene Hal, o que também difere da frequência no Canadá e EUA, que, segundo O'Brien (1995), gira em torno de 75,0 e 70,5 %, respectivamente. A análise estatística realizada para comparar as frequências genóticas dos respectivos países e as frequências encontradas no trabalho, baseada no teste do Qui-Quadrado (X^2), determinou que mais de 90% dos desvios ocorreram devido ao acaso para as raças Large White e Landrace, ao passo que para Pietrain, segundo o teste, o acaso foi responsável por 50 a 70% das variações encontradas entre o Brasil e os países citados.

Esse desvio um pouco maior na raça Pietrain, principalmente, ao se levar em conta que todos os indivíduos apresentaram o genótipo recessivo, sugere que talvez os animais importados apresentassem apenas o gene n (uma vez que este, já é o gene de maior frequência nessa raça).

Tabela 7. Frequências genóticas esperadas e observadas para os animais cruzados

Animais Cruzados	Frequências	Genótipo			X^2	P
		NN	Nn	nn		
LW/PI	F. O .	0,000	0,857	0,143	0,025	0,985
	F. E .	0,000	0,904	0,096		
LW/LD	F. O .	0,875	0,125	0,000	0,04	0,980
	F. E .	0,800	0,189	0,011		
LW/LD/PI	F. O .	0,533	0,433	0,040	0,06	0,970
	F. E .	0,405	0,537	0,058		

F.O . é a frequência observada nos cruzamentos e F. E. a frequência esperada
P é a probabilidade de que os desvios entre F.O . e F.E. sejam devido ao acaso

A análise estatística feita para avaliar a distribuição dos genótipos nos animais cruzados, com base no teste do Qui-Quadrado (X^2), determinou que em todos os cruzamentos, mais de 97% dos desvios, isto é, a variação entre as frequências genotípicas esperada e a observada, ocorreram devido ao acaso, indicando que a frequência observada não difere significativamente da esperada. Portanto, os cruzamentos não estão sendo selecionados em relação ao gene Halotano.

De acordo com vários autores (Elizondo et al., 1976; Webb & Jordan, 1978; Simpson & Webb, 1989; Aalhus et al., 1991; Zhang et al., 1992; Antunes, 1997), os animais que possuem o gene mutante apresentam melhor rendimento de carne magra na carcaça (além de menor espessura de toucinho e melhor conversão alimentar), o que é uma das principais características desejadas pela indústria, e, portanto, altamente selecionada. Daí, discute-se a real ligação do gene Hal com essas características de carcaça, pois, como mostram os dados, não há seleção para o gene, mas de acordo com os programas de melhoramento, há seleção para as características que estão ligadas ao gene, logo, deveria consequentemente estar ocorrendo mudança nas frequências alélicas e genotípicas. Como esse fato não foi observado, questiona-se a intensidade da pressão de seleção exercida sobre esses animais com relação às características de rendimento de carcaça, ou ainda, supõe-se que talvez, a ligação desse marcador com genes determinantes de maior porcentagem de carne magra não seja tão forte, permitindo que haja recombinação, com isso perde-se o referencial de que o gene Hal esteja relacionado a fatores desejáveis na carne suína.

Apesar dessa incerteza, pesquisadores têm encontrado forte relação entre características de carcaça interessantes para a indústria e o gene Hal. Zhang et al. (1992) mencionam os benefícios que esse gene pode trazer à indústria, mas alertam para uma aplicação cuidadosa, pois, os efeitos indesejáveis do mesmo (P.S.E.) podem também se fixar na população.

Outro dado interessante e passível de indagações, é a ausência do gene halotano nos animais sem raça definida. A alta frequência do gene halotano na raça Pietrain, sugere que a mutação tenha ocorrido em animais que constituíram essa raça e, portanto, o gene se fixou na população pela

sua ligação a fatores positivos para a indústria suína, ou seja foi concomitantemente selecionados. A partir destas suposições, a ausência do gene halotano nos animais de criação extensiva, pode ser explicada pela falta de cruzamentos com animais portadores (Nn ou nn). Mas, se houve a distribuição do gene para os animais sem raça definida, pode-se discutir os meios de sobrevivência das populações. Em condições naturais, o suíno sofre pressões seletivas diferentes daquelas enfrentadas pelos animais confinados. Acredita-se que na natureza, o gene halotano seria selecionado negativamente, pois, o animal nesse habitat precisa investir energia em busca de alimento e da fêmea, as condições climáticas adversas trazem desconforto, enfim todos esses fatores são extremamente estressantes, propiciando a morte dos animais portadores da mutação (além de que, não há direcionamento nos acasalamentos para produção de animais com melhores carcaças para a indústria, assim o gene Hal não é mantido).

Os animais Monteiro e os Piau também não apresentaram o gene o que talvez se deva às mesmas suposições mencionadas acima ou, pode ser que a amostra não forneceu um número suficiente para se detectar o alelo mutante.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados encontrados e condições em que foi realizado o trabalho, pode-se concluir que:

1. A frequência do gene halotano encontrada na raça Large White foi 0,096; na Landrace: 0,115 e na Pietrain: 1,000; valores semelhantes aqueles encontrados no Canadá, Inglaterra e EUA.
2. A seleção praticada nas raças puras não alteraram a frequência genotípica (com relação ao gene Hal) nos cruzamentos.
3. O conhecimento prévio do genótipo dos animais permite ao criador monitorar os cruzamentos, de forma que, ele possa aumentar a frequência genotípica do animal heterozigoto, considerado por muitos pesquisadores como sendo o mais vantajoso economicamente, pois o gene Hal relaciona-se com aumento de porcentagem de carne magra.
4. Animais sem raça definida criados de forma extensiva, bem como, as populações nativas Piau e Monteiro, não apresentaram o gene mutante para a proteína do canal de cálcio.

5. Os *primers* SUI 1 e 2 podem ser utilizados nas reações de rotina nos laboratórios para diagnosticar a presença ou não do gene halotano.

6. Os *primers* REZSUI não foram eficientes nas ampliações, já que exigem um DNA de alto peso molecular, o que não foi obtido com o processo de extração utilizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALHUS, J. L, JONES, S. D., ROBERTSON, W. M., TONG, A. K. W. and SATHER, A. P. 1991. Growth characteristics and carcass composition of pigs with known genotypes for stress susceptibility over a weight range of 70 to 120 Kg. **British Society of Animal Production** **52**: 347-353.
- ADEOLA, O. and BALL, R. O. 1992. Hypothalamic neurotransmitter concentrations and meat quality in stress pigs offered excess dietary tryptophan and tyrosine. **Journal of Animal Science** **70**: 1888-1894.
- ANTUNES, R. C. 1997. O efeito do genótipo Hal sobre o rendimento de carne em partes da carcaça de suínos cruzados. Universidade Federal de Uberlândia. **Tese de Mestrado Genética e Bioquímica**, 64pp.
- A Workshop on DNA technologies for the conservation and selection of animal genetic resources, 1992. **Practical Manual**. Brisbane, Austrália, June 14th to 26th , compiled and presented by CSIRO Molecular Animal Genetics Centre and th Centre for Molecular Biology and Biotechnology at the University of Queensland: 70-71.
- BOLES, J. A., PARRISH, F. C., HUIATT, T. W. and ROBSON, R. M. 1992. Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar/cytoskeletal proteins. **Journal of Animal Science** **70**: 454-464.
- BORGES, M, ANTUNES, R. C., SANTANA, B. A . A ., FRANCO, M. M., NASCIMENTO, G. S., LUCIANO, R. L. E GOULART, L. R. 1997. Um novo par de *primers* para diagnóstico da mutação de ponto no gene do receptor *ryanodine* (RYR1) de suínos. Resumos do 43º Congresso Nacional de Genética: 263.

- BREING, B. and BREM, G. 1992. Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). **Febs Letters** **298** (2.3): 277-279.
- BRESSAN, M. C., OURIQUE, J. M. R., CULAU, P. O. V. e NICOLAIEWSKY, S. 1993. A qualidade da carne suína no Brasil. **Avicultura & Suinocultura Industrial**: 30-31.
- CAMERON, N. D. 1993. Selection for pork quality. **Pig News and Information** **14** (4): 161-168.
- CAMPBELL, K. P., KNUDSON, C. M., IMAGAWA, T., LEUNG, A. T., SUTKO, J., KAHL, S. D. and RAAB, C. 1987. Identification and characterization of the high affinity (H⁺) ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca⁺⁺ release channel. **The Journal of Biological Chemistry** **262** (14): 6460-6463.
- CARDEN, A. E. HILL, W. G. and WEBB, A. J. 1985. The effects of halothane susceptibility on some economically important traits in pigs. **British Society of Animal** **40**: 351-358.
- CAVALCANTI, S. S. 1984. **Produção de Suínos**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola - ICEA Gráfica e Editora Ltda, Campinas, SP: 453 p.
- ELIZONDO, G., ADDIS, P. B., REMPEL, W. E., MADERO, C., MARTIN, F., ANDERSON, D. B. and MARPLE, D. N. 1976. Stress response and muscle properties in Pietrain (P), Minnesota nº 1 (M) and P x M pigs. **Journal of Animal Science** **43** (5): 1004-10014.
- FELICIO, P. E. 1986. O ABC do PSE/DFD. **Alimentos & Tecnologia** **15**: 1-5.
- FERREIRA JÚNIOR, V. 1997. Presente Merecido. **Suinocultura Industrial** **126**: 14-17.

- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., DE LEON, S., KHANNA, V. K., WEILER, J. E., O'BRIEN, P. J. and MACLENNAN, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science** **253**: 448-451.
- HANSET, R., SCALAIS, L. and GROBET, L. 1985. Du Piétrain classique au Piétrain résistan à l'halothane ou Piétrain réHal. **Ann. Méd. Vét.** **139**: 23-35.
- HOUDE, A., POMMIER, S. A. and ROY, R. 1993. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in prebred swine populations. **Journal of Animal Science** **71**: 1414-1418.
- HUGLES, I. P., MORAN, C. and NICHOLAS, F. W. 1992. PCR genotyping of the ryanodine receptor gene for a putative causal mutation for malignant hyperthermia in Australian pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics** **109**: 465-476.
- JONES, S. D. M., TONG, A. K. W., CAMPBELL, C. and DYCK, R. 1993. The effects of fat thickness and degree of marbling on pork colour and structure. **Canadian Journal of Animal Science**: 155-157.
- KUKOYI, E. A., ADDIS, P. B., MCGRATH, C. J., REMPEL, W. E. and MARTIN, W. E. 1981. Porcine stress syndrome and postmortem muscle characteristics of two purebreds and three specific terminal crosses. **Journal of Animal Science** **52** (2): 278-284.
- MICKELSON, J. R. and LOUIS, C. F. 1996. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca⁺⁺ release channel, and cell Ca⁺⁺ regulation defects. **Physiological Reviews** **76** (2): 573-592.
- MURRAY, A. 1994. Genetic mutation not answer to PSE problem. **International Pigletter** **14** (1): 1-2.

- MURRAY, A. and JONES, S. D. M. 1994. The effect of mixing, feed restriction and genotype with respect to stress susceptibility on pork carcass and meat quality. **Canadian Journal of animal Science** **770**: 587-594.
- O'BRIEN, P. J. 1995. The causative mutation for porcine stress syndrome. **The Compendium: Food Animal**: 257-269.
- O'BRIEN, P. J., BALL, R. O. and MACLENNAN, D., H. 1994. Effects of heterozygosity for the mutation causing porcine stress syndrome on carcass quality and live performance characteristics. **Proceedings of the 13th IPVS International Pig Veterinary Society Congress**: 481.
- O'BRIEN, P. J., KLIP, A., BRITT, B. A. and KALOW, B. I. 1990. Malignant Hyperthermia susceptibility: biochemical basis for pathogenesis and diagnosis. **Can J. Vet. Res.** **54**: 83-92.
- OTSU, K., KHANNA, V. K., ARCHIBALD, A. L. and MACLENNAN, D. H. 1991. Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. **Genomics** **11**: 744.
- POMMIER, S. A. and HOUDE, A. 1993. Effect of the genotype for malignant hyperthermia as determined by a restriction endonuclease assay on the quality characteristics of commercial pork loins. **Journal of Animal Science** **71**: 420-425.
- REMPEL, W. E., LU, M., KANDELGY, S. E., KENNEDY, C. F. H., IRVIN, L. R., MICKELSON, J. R. and LOUIS, C. F. 1993. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for porcine stress syndrome. **Journal of Animal Science** **71**: 1395-1399.

- ROPPA, L. 1996. A Suinocultura em Números. **Suinocultura Industrial** **123**: 24-34.
- ROPPA, L. 1997. Suíno: Mitos e Verdades. **Suinocultura Industrial** **127**: 10-27.
- RUSSO, V., DAVOLI, R., TAGLIAVINI, J., BIGI, D., COSTOSI, E., COSCELLI, M. B. & FONTANESI, L. 1993. Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'alotano a livello di DNA mediante PCR. **Zoot. Nutr. Anim.** **19**: 89-93.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUGHI, R., HORN, G., MULLIS, K. and ERLICH, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **239**: 487-491.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, D., HORN, G., ERLICH, H. and ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. **Science** **230**: 1350-1354.
- SAMBROOK, J., FRISTCH, E. F. and MANIATIS. 1989. **Molecular Cloning. V. I, II and III.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANTORO, P. and FAUCITANO, L. 1996. Stress in pig production. **Pig News and Information** **17** (2): 49-52.
- SELLIER, P. 1995. Genetic of pork quality. **Anais da I Conferência Internacional sobre Ciência e Tecnologia de Produção e Industrialização de Suínos**, Campinas, 24-26 de abril: 1-36.

- SILVEIRA, E. T. F. 1996. Impacto da qualidade na industrialização da carne suína. **Anais da II Conferência Internacional sobre Ciência e Tecnologia de Produção e Industrialização de Suínos**: 99-122.
- SIMPSON, S. P. and WEBB, A. J. 1989. Growth and carcass performance of british Landrace pigs heterozygous at the halothane locus. **British Society of Animal Production** 49: 503-509.
- SWATLAND, H. J. 1995. **On-line evaluation of meat**. A Technomic publication, Lancaster, Pennsylvania: 47.
- TOPEL, D. G., BICKNELL, E. J., PRESTON, K. S., CHRISTIAN, L. L. and MATSUSHIMA, C. Y. 1968. Porcine stress syndrome. **Modern Veterinary Practice** 49: 40-60.
- VAN LAACK, R. L. J. M., FAUSTMAN, C. and SEBRANEK, J. G. 1993. Pork quality and the expression of stress protein Hsp 70 in swine. **Journal of Animal Science** 71: 2958-2964.
- VRIES, A. G., VAN DER WAL, P. G., EIKELENBOOM, G. and MERKS, J. W. M. 1994b. Pork quality: only 20% genetic influence? **Pigs**: 14-15.
- WEBB, A. J. and JORDAN, C. H. C. 1978. Halothane sensitivity as a field test for stress-susceptibility in the pig. **Animal Production** 26: 157-168.
- ZHANG, W., KUHLEERS, D. L. and REMPEL, W. E. 1992. Halothane gene and swine performance. **Journal of Animal Science** 70: 1307-1313.