

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**POLIMORFISMO Hinf I DO GENE OBESE EM SUÍNOS
PIETRAIN E LARGE WHITE APÓS SELEÇÃO
DIVERGENTE**

Ana Carolina Portella Silveira
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**POLIMORFISMO Hinf I DO GENE OBESE EM SUÍNOS
PIETRAIN E LARGE WHITE APÓS SELEÇÃO
DIVERGENTE**

Ana Carolina Portella Silveira

Orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes
Co-orientadora: Msc. Juliana Almeida Franco

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2008**

“Eu quero ficar perto de tudo que acho certo até o dia em que eu mudar de opinião. A minha experiência, meu pacto com a ciência, meu conhecimento é minha distração... Coisas que eu sei são coisas que antes eu somente não sabia... Agora eu sei!”

Dudu Falcão

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Julio, minha mãe Lú, minha irmã Fernanda, meu cunhado Léo e meu sobrinho/afilhado Gustavo (Guguzito), por todo apoio moral e financeiro, sem os quais eu não teria conseguido.

Às amigas Giovana Aparecida Franzoi e Sueli Cristina Almeida Ribeiro, pela confiança depositada em mim ao me indicarem nas cartas de apresentação de ingresso ao mestrado.

Ao Prof. Dr. Robson Carlos Antunes, por aceitar me orientar, mesmo sem conhecer a mim ou meu trabalho e por todo o carinho e dedicação despendidos durante este percurso.

À Juliana Almeida Franco, em especial, pela co-orientação, pela paciência com todas minhas perguntas básicas sobre tudo e todos, pelas respostas desses questionamentos, pela realização do meu experimento e pela companhia em Iturama, MG.

Ao professor Ednaldo Carvalho Guimarães, por todas as estatísticas realizadas neste e em outros trabalhos.

Ao Thiago Braga e a Aline César, por toda a colaboração no experimento e na revisão bibliográfica e na compra dos materiais do experimento, além da amizade, das pizzas e vales de churrascaria.

Ao Paulo Fernando Alves de Freitas, pelas disciplinas cursadas juntos, pelo apoio e incentivo nos momentos de estresse (e também financeiro) e, principalmente por ser o namorado mais perfeito e lindo de todos.

E àqueles que contribuíram indiretamente na realização deste trabalho: Luis Ricardo Goulart, Maurício Machaim e Nilander Oliveira.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
1. Genética na Suinocultura	02
2. Genes candidatos	04
3. Caracterização do gene da leptina	07
4. Gene da leptina em suínos	14
5. Raça Pietrain	19
6. Raça Large White	20
Referências	22
CAPÍTULO 2 – POLIMORFISMO Hinf I DO GENE OBESE EM SUÍNOS PIETRAIN E LARGE WHITE APÓS SELEÇÃO DIVERGENTE	35
Resumo	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
<i>Procedimentos laboratoriais</i>	39
<i>Análise estatística</i>	43
Resultados e Discussão	43
<i>Genotipagem</i>	43
<i>Frequências genotípicas e alélicas</i>	44
<i>Sexo X gene da obesidade</i>	46
<i>Linhagens materna e paterna de suínos da raça Pietrain X Gene da Obesidade</i>	47
<i>Linhagens paternas de Pietrain e Large White X Gene da Obesidade</i>	48
Conclusões	50
Referências	51

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Por Cento

μL – Microlitro

°C – Graus Celsius

χ^2 – Qui-quadrado

ABIEPCS – Associação Brasileira dos Produtores e Criadores de Suínos

A-FABP – *Adipocyte-specific Fatty Acid Binding Protein*

cAMP – Adenosina Mono Fosfato Cíclico

cDNA – DNA Complementar

cM – centiMorgans

db – diabetes

db/db – Diabético

DNA – Ácido Dexosiribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético

FAO – *Food and Agriculture Organization*

g - Gramas

g/dia – Gramas por Dia

GO – Goiás

GPD – Ganho de peso diário

h – Hora

H-FABP – *Heart-specific Fatty Acid-Binding Protein*

ID100 – Idade para atingir 100 kg

INGEB – Instituto de Genética e Bioquímica

Kcal – Quilocalorias

KDa – QuiloDalton

Kb – Quilobase

Kg – Quilograma

Km – Quilômetro

LEPR – Receptor de leptina

MAS – *Marker Assisted Selection* ou Seleção Assistida por Marcadores

MG – Minas Gerais

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min – minuto

mm – milímetros

ng/ml – nanograma por mililitro

NPY – Neuropeptídeo Y

OB ou Ob – Obese

Ob/ob – obeso

OB-R – receptor do gene obese

pb – Pares de bases

PCR – ou Reação de Polimerase em Cadeia

pH_{2h} – potencial hidrolétrico medido duas horas após a sangria

PSE – *Pale Soft Exsudative* ou Pálido Mole e Exsudativo

QTLs – *Quantitative Traci Loci* ou Locos de Caracteres Quantitativos

RFLP – *Restriction Fragment Lenght Polymorfism* ou Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos

RN – Rendimento Nápole

RNA – Ácido Desoxiribonucleico

RNA_m – Ácido Desoxiribonucleico mensageiro

SNC – Sistema Nervoso Central

TBE – Tri-Boro-EDTA

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UFV – Universidade Federal de Viçosa

USDA – *United States Department of Agriculture*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Alguns QTLs e genes candidatos identificados e usados pela indústria
– Página 6

TABELA 2 – Desempenho e características de carcaça e da carne de suínos das raças Large White e Pietrain, dos 35 aos 90kg de peso vivo – Página 21

TABELA 3 – Protocolo para o tampão utilizado na lise celular durante o processo de extração de DNA para genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White – Página 40

TABELA 4 – Protocolo para o Master Mix utilizado durante o processo de extração de DNA para genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White – Página 41

TABELA 5 – Condições ótimas da reação de PCR realizada para a genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White – Página 41

TABELA 6 – Programação do termociclador utilizado para a reação de PCR realizada na genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White – Página 42

TABELA 7 – Condições da restrição enzimática realizada durante a genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White – Página 42

TABELA 8 – Determinação das frequências genotípicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna) – Página 44

TABELA 9 – Determinação das frequências alélicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna) – Página 45

TABELA 10 – Comparação das frequências genotípicas para as raças Large White e Pietrain encontradas por Borges e outros (1998) e as deste trabalho – Página 45

TABELA 11 – Comparação das frequências alélicas para as raças Large White e Pietrain encontradas por Stratil e outros (1997); Borges e outros (1998) e as deste trabalho – Página 46

TABELA 12 – Relação das frequências genotípicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna) e o sexo – Página 46

TABELA 13 – Relação entre as frequências genotípicas do gene da obesidade de 66 suínos das linhagens materna e paterna da raça Pietrain – Página 47

TABELA 14 – Relação entre as frequências genotípicas do gene da obesidade de 82 suínos da linhagem paterna das raças Pietrain e Large White – Página 49

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

QUADRO 1 – Seqüência de bases gerada a partir do cDNA de um segmento do gene da leptina. As seqüências estão na linha superior e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão posicionados logo abaixo destes – Página 19

FIGURA 1 – Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com respectivas bandas e pesos moleculares (TT – banda 152pb; TC – bandas 152, 84 e 68pb; CC – bandas 84 e 68pb) – Página 43

FIGURA 2 – Gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com respectivas bandas e pesos moleculares (TT – 152pb; TC – 152, 84 e 68pb; CC – 84 e 68pb). M. Marcador de peso molecular. 1. Amostra padrão de genótipo TT. 2. Amostra padrão de genótipo TC. 3. Amostra padrão de genótipo CC. 4, 5, 6, 7, 9. Amostras TT. 8. Amostra TC – Página 44

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. GENÉTICA NA SUINOCULTURA

A carne de suínos é a mais produzida no mundo, atingindo, segundo Roppa (2007), 104 milhões de toneladas, ou seja, 39% de toda a produção cárnea em 2007. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial, tendo produzido neste mesmo ano, de acordo com dados da ABIPECS (2008), mais de três milhões de toneladas, ficando atrás apenas da China, União Européia e Estados Unidos. Os números de consumo e comercialização de carne suína no país, em 2007, confirmam uma tendência de fortalecimento e da versatilidade do uso desta na alimentação humana, seja no preparo de cortes “in natura” ou na fabricação de um grande número de embutidos, salgados e defumados, que deverá garantir, ao longo dos próximos anos, a sua liderança mundial de consumo em relação às carnes de outras espécies.

De acordo com Roppa (1998), desde 1980 o suíno perdeu 31% de sua taxa de gordura, 14% de calorias e 10% de colesterol. O percentual de carne magra na carcaça, que era de 50%, subiu para 62% e apenas 30% da gordura se encontra localizada fora de sua pele (toucinho), sendo que no interior dos músculos há somente 1,1 a 2,4% de gordura; o que é o mesmo que no frango e ainda menor que nas carnes bovina (2,5%) e ovina (6,5%). A porcentagem de gorduras insaturadas (65%) é maior que a de saturadas (35%) no suíno atual, assim como o nível de colesterol contido na carne de um suíno moderno é semelhante ao de outras carnes (bovinos e aves). Mesmo quanto ao nível de calorias, as carnes suínas atualmente disponíveis ao consumidor atendem à demanda de um mercado consumidor cada vez mais exigente: ao consumir 150 gramas de lombo cozido, ingere-se cerca de 270kcal, o que equivale a menos que meio hambúrguer (300kcal); 150 gramas de batatas-fritas (400kcal) ou uma fatia de 120g de pizza de calabresa (345kcal).

Por ser grande produtor de grãos e pelos avanços tecnológicos alcançados, tanto na área genética quanto industrial, o Brasil ganha cada vez mais importância seja na produção de suínos, no consumo ou nas exportações. A indústria e os produtos brasileiros têm recebido relevantes contribuições dos programas de melhoramento genético. Entretanto, a eficiência dos sistemas de produção de suínos é, freqüentemente, reduzida devido às falhas na reprodução ou doenças, com

conseqüente aumento dos custos para os produtores e para o mercado consumidor (SILVA, 2003a). Ainda, há a necessidade de produzir animais a custos mais baixos e, ao mesmo tempo, mais saudáveis, seguros e criados sob condições de bem-estar animal, pois o modo como a sociedade vê a produção animal também inclui questões como impacto ambiental, sustentabilidade, ética e origem (SILVA, 2003b). Para que as indústrias brasileiras mantenham o nível de competitividade no mercado será imprescindível a incorporação de novas técnicas moleculares como ferramentas nos programas tradicionais de melhoramento genético para que maiores progressos sejam obtidos, já que é difícil a solução destes problemas usando somente a genética convencional. O seqüenciamento do genoma dos suínos traz novas perspectivas para a moderna produção animal (NINOV, 2006).

O genoma suíno é composto de 18 pares cromossômicos mais os sexuais, com comprimento de cerca de três bilhões de pares de bases de DNA, o que gera, tal como em humanos, um mapa em torno de 3.000 cM (centimorgans). O *PigMap Project* iniciou-se na Europa, financiado pela Comunidade Econômica Européia. Conta com cerca de 20 laboratórios europeus, além de outros na América do Norte, Ásia e Oceania. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) deu início a dois processos: um desenvolvido no *Meat Animal Research Center no Clay Center*, Nebraska; o outro é o *National Animal Genome Research Program*, desenvolvido sob direção do USDA a partir de 1993. Este foi desenhado para promover uma estrutura que estimule a colaboração para o mapeamento genético em todas as espécies, incluindo suínos. A partir de então, cientistas de entidades privadas e governamentais criaram o *Swine Genome Technical Committee*. Além destes, outros projetos têm sido desenvolvidos, e um resumo de cada um deles pode ser verificado no site www.genome.iastate.edu/maps/recent/QTL_proj.html. A associação destes projetos fez com que o status do mapa genético suíno evoluísse rapidamente, sendo um dos mais completos (GUIMARÃES et al., 2001).

A biotecnologia, por meio da identificação de genes associados às características de interesse econômico, principalmente aquelas de difícil mensuração ou de baixa herdabilidade, tem permitido avanços nos programas de melhoramento, por meio de uma seleção mais efetiva. Suas diversas técnicas

contribuem para o desenvolvimento de mapas genéticos saturados e a identificação de locos controladores de características quantitativas (QTL's) (NINOV, 2006).

2. GENES CANDIDATOS

Para o desenvolvimento de marcadores moleculares, duas estratégias vêm sendo utilizadas, uma de certa forma aleatória e a outra dirigida. A primeira tem como objetivo inicial a identificação de um mapa genético para a espécie em questão. Nessa estratégia, marcadores são desenvolvidos para cobrir todo o genoma, para que, em uma segunda fase, sejam conduzidos estudos de correlação entre esses marcadores e as características desejáveis. Nos animais domésticos, o mapa está baseado principalmente em marcadores micros-satélites. A segunda estratégia baseia-se na detecção de polimorfismos associados a genes sabidamente importantes para as características que se pretende estudar (COUTINHO; REGITANO, 2001).

No caso do melhoramento animal, uma estratégia para identificação de genes que controlem características de interesse é feita por meio de estudos utilizando-se genes candidatos; que são genes de seqüência e ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma determinada característica de interesse (BRYNE; MCMULLEN, 1996); cujas mutações possam ser associadas a uma determinada característica.

Os estudos destes têm baixos custos e apresentam vantagens como: alto poder estatístico, ampla aplicabilidade, simplicidade operacional e conveniente aplicação à seleção assistida por marcadores (MAS – Marker Assisted Selection) (ROTHSCHILD; SOLLER, 1999). Pereira (2000) afirma que a técnica de marcadores genéticos possibilita não apenas fixar alelos desejáveis em uma população, em curto espaço de tempo, como também diferenciar produtos dentro de uma mesma linha genética, para um nicho específico de mercado, deixando flutuante a frequência de cada alelo; e, que características anteriormente não incluídas nos programas de seleção, como o caso da resistência a doenças, passarão a ser contempladas por meio de uso de marcadores genéticos.

O advento das novas tecnologias, fruto dos conhecimentos da genética molecular e das técnicas de reprodução, tem o potencial de criar um novo paradigma, no qual os ganhos genéticos podem ser substancialmente melhorados e ocorrerem por patamares em vez de lineares (PEREIRA, 2000).

Com o uso da seleção assistida por marcadores, maiores ganhos genéticos seriam obtidos no melhoramento de suínos, quando comparados aos ganhos obtidos pelos métodos tradicionais (DE VRIES; SOSNICKI; PLASTOW, 1998; VISSCHER; PONG-WONG; WHITEMORE, 2000), já que, em programas de melhoramento de suínos, o benefício da MAS estaria relacionado não só ao aumento da acurácia na predição dos valores genéticos (DE VRIES; SOSNICKI; PLASTOW, 1998), mas também ao aumento da intensidade de seleção, para características limitadas pelo sexo, e com a redução do intervalo de gerações, em características de carcaça (VISSCHER; PONG-WONG; WHITEMORE, 2000).

As limitações desse procedimento são: o pequeno número de genes conhecidos que controlam características de interesse, o efeito pleiotrópico de outros genes sobre o gene candidato, o alto custo da etapa inicial e a dificuldade no estabelecimento do efeito do gene candidato. Até que se estabeleça a variante causal do gene responsável pelo efeito quantitativo, sempre haverá a possibilidade de que o gene estudado não seja o que realmente esteja causando a diferença na característica, mas somente esteja ligado ao QTL. Isso pode levar a resultados contraditórios, dependendo da população estudada, pois associações significativas em uma população podem não ser verificadas em outras devido à quebra de ligação durante as recombinações (ROTHSCHILD; SOLLER, 1999).

Dentre as espécies de animais domésticos, a suína é certamente uma das que mais tem se beneficiado destas novas descobertas, tanto pelos investimentos diretos em pesquisas do seu próprio genoma como pela rápida conversão dos conhecimentos adquiridos em ferramentas aplicadas à seleção. Existem mais de 700 QTLs identificados em suínos, sendo mais de 300 deles relativos ao desempenho e à composição de carcaças (HU et al., 2005).

O primeiro deles, o teste para o chamado “gene halotano”, começou a ser utilizado em 1991 (FUJII et al., 1991). O gene RN (Rendimento Napole) ou da carne ácida, inicialmente era pesquisado usando o teste de potencial de glicogênio

(MONIN; SELLEIER, 1985). Anteriormente, achava-se que mutação RN era limitada à raça Hampshire (MILAN et al., 2000). Entretanto, foi verificado que vários outros alelos com efeitos sobre a qualidade de carne são segregados em outras linhagens comerciais (CIOBANU et al., 2001). Foi demonstrado que os genes A-FABP e H-FABP afetam a gordura intramuscular, com impacto limitado sobre a espessura de toucinho. Isto permite a seleção para aumento da gordura intramuscular, que melhora o gosto e a maciez, sem aumentar a espessura de toucinho, característica geneticamente correlacionada e indesejável (DEKKERS; ROTHSCILD; MALEK, 2001). Em especial, sobre características de gordura, cinco regiões foram identificadas nos cromossomos 1, 2, 5, 7 e X (MILAN et al., 2002). Um polimorfismo no gene do receptor do estrogênio (ESR) tem mostrado um aumento no tamanho da leitegada (SHORT et al., 1997) (Tabela 1). Desde então, vários outros foram desenvolvidos ou estão em fase de validação, como é o caso do gene da obesidade (ou da leptina).

TABELA 1. Alguns QTLs e genes candidatos identificados e usados pela indústria

QTLs	
Crescimento	Cromossomos 1, 4, 6, 7, 13
Obesidade	Cromossomos 4, 6, 7, 13, 18
Comprimento intestinal	Cromossomo 4
Resposta imune	Cromossomos 1, 4, 6
Genes candidatos e principais	
RXR1	Síndrome do estresse suíno
ECF18R	Diarréia
KIT	Cor da pelagem (branco dominante)
MC1R	Cor de pelagem (vermelho/preto)
HFABP e AFABP	Gordura intramuscular
Teste da indústria	
Teste de paternidade	
Teste do halotano	Qualidade de carne
ESR	Tamanho da leitegada
MC1R	Cor vermelha/preta
Testes não disponíveis	
Várias características	
Fonte: Rothschild; Plastow, 1999	

3. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA LEPTINA

Por muitos anos cientistas procuraram por um possível mensageiro (hormonal ou metabólico) que sinalizaria ao cérebro e outros tecidos o estado das reservas energéticas do corpo. Este sinal permitiria mudanças apropriadas no consumo de alimento, no gasto de energia e na participação dos nutrientes para manter o balanço energético.

Kennedy (1953) foi o primeiro a propor a teoria lipostática da regulação do peso corporal. Segundo ela, quando a massa adiposa expande, a concentração circulante da molécula sinal pode aumentar e atuar nos circuitos neurais do cérebro controlando o consumo e balanço de energia. Alguns trabalhos realizados posteriormente deram suporte a esta idéia.

A existência de um fator circulante no controle do consumo alimentar foi evidenciada nos experimentos de parabiose entre dois camundongos geneticamente obesos, nos quais os sistemas circulatórios de camundongos obesos e magros foram cirurgicamente unidos. Assim, houve troca de 1% de fluxo sanguíneo entre os camundongos. Os resultados indicaram que o aumento da massa gordurosa produziu um fator circulante, o qual, em contato com o camundongo magro, atuou induzindo a saciedade (HERVEY, 1959; COLEMAN, 1973).

Com tais descobertas, já com os recursos de biotecnologia, Zhang e outros (1994) identificaram e caracterizaram o gene obeso (OB) de camundongo e o seu homônimo em humano. Mais tarde, o gene da obesidade, também conhecido como gene da leptina, foi clonado em outras espécies como suínos (RAMSAY; YAN; MORRISON, 1998), frangos (TAOUI et al., 1998) e bovinos (JI et al., 1998).

A leptina (do grego “leptos” que significa delgado (DIO et al., 2002)) foi caracterizada como uma proteína codificada pelo gene Obese (ZHANG et al., 1994), produzida, quase que exclusivamente, no tecido adiposo, de peso molecular de 16 kDa, e composta por 167 aminoácidos (TERMAN, 2005). Pequenas quantidades foram encontradas na glândula mamária (CASABIELL et al., 1997), no músculo esquelético (WANG et al., 2002), na hipófise (JIN; ZHAN; BURGUERA, 2000), em tecidos fetais (MÜHLHÄUSLER, 2002) e na mucosa gástrica (PICO et al., 2003). Na placenta, a presença desta proteína parece ser espécie-específica (ALTMAN; VON

BOREL, 2007). Foi detectada em ratos (KAWAI et al., 1997) e humanos (SAGAWA, 2002). Já em ruminantes e camundongos foram encontrados níveis insignificantes da mesma (BISPHAM et al., 2003; ZHAO et al., 2003). É circulante no sangue, com exceção dos primeiros 21 aminoácidos que a compõem, que funcionam como uma seqüência sinal e são eliminados antes de entrarem na corrente sanguínea (ALTMAN; VON BOREL, 2007). A leptina madura é monomérica com duas cisteínas formando uma ligação dissulfídica intramolecular (ZHANG et al., 1994). É secretada pela célula adiposa em resposta ao aumento da massa gordurosa e age no hipotálamo ventro-medial, onde diminui a biossíntese e a secreção do NPY (neuropeptídeo Y), reconhecido como mais potente modulador do apetite (DIO et al., 2002).

Estudos demonstram que a leptina está envolvida no controle do apetite e na modulação da secreção da insulina pelo pâncreas (SALMAN, 2007). Em uma ação autócrina, exerce um efeito inibitório sobre a captação de glicose estimulada pela insulina, reduz a lipogênese e estimula a lipólise no tecido adiposo. De maneira endócrina, estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio pelas células do tecido muscular, além de acelerar a taxa de oxidação de ácidos graxos neste (CEDDIA et al., 1999).

Funciona como “fator saciedade”, controlando o peso corporal por meio de um sistema feedback e mantendo a estabilidade da massa de gordura corporal. Uma inanição, por exemplo, leva a um decréscimo da proteína que, em resposta, cria um estado de balanço energético positivo, no qual a ingestão de alimentos excede o gasto de energia. Já, um aumento na adiposidade leva a um incremento nos níveis de leptina e um estado de balanço energético negativo, sendo assim, o gasto de energia excede a ingestão alimentar (FRIEDMAN, 1997). A concentração de leptina no plasma diminui rápida e profundamente como resultado de privação alimentar e balanço energético negativo (BARB; HUASMAN; HOUSEKNECHT, 2001). Já foram descritas funções da leptina sobre a atividade reprodutiva (BARASH et al., 1996; SILVA, 2003a; TERMAN, 2005), fertilidade (SMITH; JACKSON; FOSTER, 2002) e estímulo da secreção do hormônio do crescimento (BARB; HUASMAN; HOUSEKNECHT, 2001; BARATTA et al., 2002).

Além dos mecanismos periféricos, acredita-se que a ação da leptina sobre a ingestão e o metabolismo energético seja mediada via sistema nervoso central (SNC), por meio da inibição da síntese e secreção do neuropeptídeo Y (SALMAN, 2007). Como o NPY estimula a ingestão e diminui a termogênese de gordura marrom e está relacionado com o aumento dos níveis plasmáticos de insulina e de corticoesteróides, acredita-se que o mesmo sirva como mediador em algumas ações da leptina no hipotálamo (HOSSNER, 1998).

A síntese da leptina é influenciada por ingestão alimentar, prenhez, sexo, atividade física, infecções, temperatura ambiente (CHILLIARD; DELAVAUD; BONNET, 2005; KULCSÁR et al., 2005) ou fase de desenvolvimento (BARB; KRAELING, 2004). Em geral, os adipócitos não estocam a leptina e sim, secretam este hormônio continuamente à medida que é sintetizado (CAMMISOTTO et al., 2006). Lee e Fried (2006) afirmam que a leptina pré-formada e a pequena reserva intracelular são usados quase que imediatamente e mudanças na secreção desta proteína não dependem do RNAm intracelular. Além disso, lisossomos e proteossomos realizam a degradação da leptina e influenciam sua quantidade no tecido adiposo.

Os níveis plasmáticos de leptina são altamente correlacionados com a massa de tecido adiposo e cai, tanto em humanos quanto em camundongos, a partir da perda de peso (MAFFEI et al., 1995). Essa proteína está presente no soro de roedores normais, aumentada com a obesidade e ausente no soro dos camundongos ob/ob (FREDERICH et al., 1995). Em suínos essa correlação foi encontrada por Cameron, Penman e McCullough (2000), Berg e outros (2003) e Fabian e outros (2003). Independente da sua localização, os níveis de RNA mensageiro parecem ser maiores onde os depósitos de gordura também o são (TRAYHURN et al., 1995). Porém, de acordo com Cumin, Baum e Levens (1996), os níveis plasmáticos de leptina permanecem constantes, sugerindo que a leptina seja secretada continuamente a partir dos adipócitos, sendo a sua velocidade de remoção igual à taxa de produção (VILÀ et al., 1998). O rim é o maior sítio de catabolismo da leptina, removendo 80% de toda a leptina do plasma humano (MEYER et al., 1997).

A liberação de leptina pelos adipócitos é regulada por hormônios e fatores regulatórios. Por exemplo, glicocorticóides (SLIEKER et al., 1996; De VOS et al., 1995; MURAKAMI; IIDA; SHIMA, 1995) e insulina (SALADIN et al., 1995; LEROY et al., 1996) estimulam a secreção de leptina. Entretanto, receptores agonistas β 3-adrenérgicos (TRAYHURN et al., 1995) inibem diretamente a secreção de leptina. Nakazato e outros (2001) sugerem que a grelina, um novo peptídeo, pode antagonizar a ação da leptina por meio da regulação do NPY. Porém, os autores observaram que maiores investigações quanto à função da grelina auxiliariam compreender o mecanismo fisiológico do balanço energético e suas disfunções.

Pouco é conhecido sobre a interação da leptina com proteínas transportadoras na corrente sanguínea. Sinha e outros (1996), trabalhando com leptina marcada, verificaram que ela se liga a macromoléculas circulantes específicas, de maneira reversível. Em indivíduos magros, com 21% ou menos de gordura corporal, 60 a 98% da leptina total foi encontrada na forma ligada. Os estudos sugerem que, em indivíduos obesos, a maioria da leptina circula na forma livre e, assim, estes seriam resistentes a leptina livre. Houseknecht e outros (1998) e Sinha e outros (1996) acreditam que a proteína ligadora do plasma seja a forma sólida do receptor da leptina.

Após a descoberta e caracterização da leptina, a busca pelo seu receptor foi iniciada. O RNA do receptor da leptina (OB-R) foi primeiramente isolado do plexo cardíaco de camundongo. Estudos *in situ* mostraram que a leptina se liga com alta afinidade nesta região, sugerindo que este seja o local de expressão do receptor da leptina (TARTAGLIA et al., 1995). Além deste, o gene do receptor da leptina também é fortemente expresso pelas leptomeninges e região central do hipotálamo, como o núcleo arqueado, núcleo ventral pré-mamilar, núcleo ventro-medial e núcleo paraventricular (MERCER et al., 1996). Há presença de receptores da leptina nos ovários, testículos e útero, indicando que esta proteína tenha funções no crescimento e reprodução dos animais (TERMAN, 2005).

Seis isoformas do receptor da leptina foram descritas: Ra, Rb, Rc, Rd, Re e Rf. As Rd e Rf foram descritas somente em camundongos e ratos, respectivamente. Já, Ra, Rb e Rc foram encontrados em, pelo menos, duas espécies sugerindo que

estas promovam funções essenciais, visto que não são exclusivas de uma única espécie (LEE et al., 1996).

A comparação entre todas as isoformas revela que o domínio extracelular comum é a porta do domínio citoplasmático, variável. A forma Re codifica a proteína curta, na qual falta o domínio transmembrana. As outras quatro variantes incluem, além deste último, o "box" JAK (tirosina quinase). A isoforma Rb contém o "Box" STAT (transdutoras e ativadoras de sinal de transcrição), o qual não é encontrado nas outras variantes, sendo esta a forma predominante no hipotálamo (CHEN et al., 1996; LEE et al., 1996). É de consenso geral que a forma longa do receptor da leptina (OB-Rb ou simplesmente Rb) seja a forma mais competente em ativar as vias de sinalização no interior da célula.

A forma OB-Ra é encontrada em altas concentrações no plexo coronário de camundongos (GHILARDI et al., 1996), podendo funcionar como uma proteína de transporte que permite a passagem da leptina do soro através da barreira sangue-cérebro para dentro do fluxo ciorraquideano (BANKS et al., 1996).

A mutação recessiva do gene da leptina, tanto no camundongo obeso (ob) quanto no diabético (db), resulta em obesidade e diabetes, assemelhando-se obesidade mórbida em humanos. Parabiose entre estes dois camundongos revelou que, enquanto o camundongo db/db não era afetado, o camundongo ob/ob tornou-se hipofísico e morreu de inanição. Isto sugeriu que ambos apresentaram mutações em genes distintos, resultando em fenótipos similares, com o camundongo db/db produzindo um fator circulante no soro, o qual regula o consumo de alimento em camundongos ob/ob. Assim, o camundongo ob/ob reage a um sinal de saciedade, que é inefetivo nos camundongos db/db (NINOV, 2006).

Uma mutação de CGA para TGA (C? T), nos camundongos ob/ob, resulta em mudança de uma arginina na posição 105 para um códon de finalização, formando uma proteína inacabada, que não é liberada na corrente sanguínea.

De acordo com Frederich e outros (1995) uma mutação no gene da leptina causa severa obesidade em roedores e sugere que a sua função fisiológica seja evitar a obesidade durante o consumo excessivo de alimento. Entretanto, Ahima e outros (1996) descrevem que a obesidade (como processo patológico) tem fenótipo recente no decurso da evolução biológica e o consumo de alimento pode ter ocorrido

de forma intermitente, sendo que a adaptação a uma situação de desnutrição pode ter oferecido maiores vantagens. A leptina pode estar envolvida como um fator para manter a homeostase energética e a quantidade de reservas compatíveis com a vida. Entre as características observadas em animais submetidos a condições de desnutrição severa, limitação da competitividade reprodutiva (HAMMOUND, 1955 apud FRISCH, 1984; AHIMA et al., 1996) e a redução dos níveis de hormônios tireoidianos, os quais se tornam normalizados quando os níveis de leptina são corrigidos. Estas respostas poderiam ter valor na sobrevivência do animal durante períodos prolongados de falta de alimento, o que poderia ser a função dominante deste hormônio (AHIMA et al., 1996).

Gong e outros (1996) obtiveram a sequência da região 5' não traduzida do gene OB de humano. Além de duas seqüências repetidas (MER11 e ALU) e da região "TATA box" e potenciais elementos regulatórios, estavam presentes (C/EBP, CCAAT/ "enhancer" de ligação protéica; GRE, elemento de resposta aos glicocorticóides; CREB, elemento de resposta ao cAMP e SP-1). Mason e outros (1998) encontraram uma região (LP-1) que se liga a um fator trans-ativador presente nas células adiposas, mas não em outras células examinadas.

A proteína OB recombinante, purificada da *Escherichia coli*, quando injetada em camundongos ob/ob reduz o peso corporal, a porcentagem de gordura, o consumo de alimento, a concentração de glicose e a insulina do soro (PELLEYMOUNTER et al., 1995), sendo que a redução do peso corporal parece ser dose-dependente (CAMPFIELD et al., 1996). Em camundongos normais, a redução do peso foi menor (PELLEYMOUNTER et al., 1995; HALAAS et al., 1995; CAMPFIELD et al., 1996).

Os camundongos ob/ob apresentaram maior resposta a ação da leptina do que animais magros. A ausência desta durante o crescimento e desenvolvimento poderia ser a causa de alta sensibilidade à proteína extra (HARRIS et al., 1998). Barrachina e outros (1997) examinaram o efeito agudo de uma injeção intraperitoneal de leptina recombinante, em camundongos magros, sobre o consumo e esvaziamento gástrico. A máxima redução no consumo ocorreu cinco horas a partir da administração da dose. Este efeito parece não estar relacionado ao sinal de saciedade do esvaziamento gástrico.

A associação de polimorfismos com características de interesse econômico tais como crescimento corporal e deposição de gordura são de grande relevância para os programas de melhoramento genético (NINOV, 2006). Uma mutação no receptor da leptina causa o fenótipo observado nos camundongos db/db, os quais também apresentam severa obesidade, como a observada nos camundongos ob/ob (CHEN et al., 1996). A mutação envolve a mudança de uma base em um *intron*, alterando um sítio de "splice". Na proteína trans-membrana resultante, faltam aproximadamente 270 aminoácidos no domínio citoplasmático (LEE et al., 1996). Assim como as outras formas curtas do receptor, esta mutação o tornaria incapaz de ativar as proteínas STATs (GHILARDI et al., 1996; VAISSE et al., 1996).

A administração de leptina recombinante em camundongos ob/ob reduz a massa adiposa por meio do efeito no consumo e no gasto de energia, mas não tem efeito sobre o camundongo db/db (PELLEYMOUNTER et al., 1995; HALAAS et al., 1995; CAMPFIELD et al., 1996), mostrando, então que a proteína mutada perde a função.

Além do "splicing" anormal verificado no gene do receptor da leptina de camundongos db/db, outras alterações já foram detectadas. Campfield e outros (1996) encontraram uma mutação no gene dos camundongos fa/fa, que também apresenta obesidade, hipercolesterolemia, hiperlipidemia e hiperglicemia. Os autores encontraram uma única substituição de nucleotídeos (A? C) na posição 880 do cDNA, de uma região que é comum a todos os receptores conhecidos.

Alterações na posição 668 do cDNA (A? G) do receptor da leptina humana levam a substituição de glutamina por uma arginina na posição 223 da proteína, sugerindo que a resistência da leptina, observada em humanos obesos, não seja decorrente do defeito no receptor da leptina (CONSIDINE et al., 1995).

Stephens e outros (1995) investigaram o gene do receptor da leptina em uma família com nove irmãos, sendo que três deles apresentavam obesidade mórbida. Estes indivíduos apresentaram substituição de base (G? A) no sítio de "splice" do gene 16. Os pais e quatro irmãos não afetados foram heterozigotos. Os afetados não apresentaram puberdade e a secreção dos hormônios de crescimento e tireotrofina estava reduzida.

Identificou-se polimorfismo no receptor da leptina de suínos (KOPECNY; STRATIL; CEPICA, 1997). *Primers* foram desenhados para amplificar um fragmento de 380pb. A observação de sua mobilidade em gel de eletroforese revelou a existência de dois fragmentos diferentes: alelo/variante A (mais lento) e alelo/variante B (mais rápido). Quando as duas variantes estavam presentes na mesma amostra, uma banda ainda mais lenta foi observada. Esta banda extra foi resultante de um heteroduplex. Em animais não relacionados de diferentes linhagens (Landrace, Large White, Black Pied Prestice, Pietrain, Duroc, Hampshire, Czech Meat Pig e Meishan), somente alelo/variante B foi observado. O alelo/variante A foi detectado somente em Pietrain.

Soares (2001), utilizando-se do cDNA gerado a partir do mRNA de tecido adiposo dentro do experimento executado na Universidade Federal de Viçosa, identificou a expressão do gene do receptor da leptina em tecido adiposo de famílias suínas comerciais e machos da raça nativa Piau. A ação central da leptina por intermédio de receptores hipotalâmicos já é bem conhecida (STEPHENS et al., 1995; SCHWARTZ et al., 1996; ERICKSON et al., 1996; SAHU, 1998; FRIEDMAN, HALAAS, 1998). A leptina atuaria ativando vias específicas de sinalização dentro da célula, sendo a forma longa do receptor a que poderia ativar tais vias (CHEN et al., 1996; LEE et al., 1996).

Alguns pesquisadores têm sugerido que a atuação da leptina sobre o tecido gorduroso seja em resposta a presença de receptores nestes tecidos (SCARPACE; NICOLSON; MATHENY, 1998; RAMSAY; YAN; MORRISON, 1998), o que foi confirmado por Soares (2001).

4. GENE DA LEPTINA EM SUÍNOS

Os suínos já eram considerados como modelos para a obesidade pela sua propensão natural a engordar, a qual pode ser maior pela composição da dieta e sua ingestão. Atualmente o gene da OB está clonado nesta espécie (BIDWEL et al., 1997). Existem experimentos que afirmam que a expressão do gene varia de acordo com a propensão do tecido adiposo (RAMSAY; YAN; MORRISON, 1998).

O gene obese de suínos está localizado no cromossomo 18q13-q21 (NEUENSCHWANDER et al., 1996). Bidwell e outros (1997) obtiveram um RNA mensageiro, expresso no tecido adiposo desses animais, de 3.100 pares de base (pb). A análise da seqüência indicou três *exons* e dois *introns* neste gene. Uma curta seqüência não traduzida foi identificada como *exon 1* e a seqüência codificadora de aminoácidos estava localizada nos segundo e terceiro *exons*. A expressão do gene OB foi investigada em múltiplos tecidos de animais machos e em glândulas mamárias de fêmeas lactantes e não lactantes e apenas o tecido adiposo apresentou expressão do gene da obesidade. A seqüência de bases do gene pode ser acessada pelo *GenBank* (U66254) e o tamanho do primeiro *intron*, assim como o *exon 1*, não pôde ser determinada.

Ao comparar a leptina de diversas espécies (humano, gorila, chimpanzé, orangotango, macaco rhesus, cavalo, vaca, porco e camundongo) encontrou-se 67% de similaridade entre as seqüências (ZHANG et al., 1997). Neuenschwander e outros (1996), ao compararem a seqüência de cDNA de suínos com de camundongo e humano, encontraram de 84 e 86% de semelhança, respectivamente. Ramsay, Yan e Morrison (1998) obtiveram um clone de cDNA de toda a região codificadora da leptina de suíno (gene de acesso no *GenBank* U59894). Este apresentou 85% de homologia com a seqüência de rato ou camundongo e 88% com a de humano. A mais alta homologia foi observada com a seqüência de bovino (92%). A mesma comparação foi feita por Bidwell e outros (1997), que encontraram similaridade de 89, 92 e 95%, respectivamente. Doyon e outros (2001) encontraram 85% de homologia com os humanos. Szydlowski e outros (2004) e Peixoto e outros (2006) sugerem que signifiquem uma alta conservação do gene da leptina na evolução.

Ramsay, Yan e Morrison (1998) verificaram que o gene da leptina de suíno codificava um sítio transcrito de RNA mensageiro com aproximadamente 4,4kb, similar em tamanho ao RNA mensageiro de humano. Robert e outros (1998) isolaram um RNA mensageiro de 2.477pb do gene OB de suínos, o qual inclui a seqüência codificadora completa, como também a seqüência 5' e 3' não traduzida.

O RNA mensageiro da leptina em abundância se correlaciona com a porcentagem de gordura corporal (SPURLOCK et al., 1998; ROBERT et al., 1998). Os níveis de RNA mensageiro de leptina apresentam-se 4,1 vezes mais altos na

gordura lombar Landrace gordos, quando comparados aos magros. Os estudos de Bidwell e outros (1997) mostraram que a abundância de RNA mensageiro em suínos na fase de terminação (136 kg) foi 68% maior que em animais em crescimento (60 kg).

Ao dosarem a proteína do soro de suínos obesos, selecionados para maior espessura de toucinho, Ramsay, Yan e Morrison (1998) constataram que a quantidade era de aproximadamente 306% maior que os níveis presentes no soro de contemporâneos com pouca espessura de toucinho, obtidos no cruzamento Landrace x Yorkshire.

Os níveis de leptina são mais elevados em leitões do que em matrizes e estas apresentaram os níveis mais altos que os machos (ROBERT et al., 1998). Por este motivo, sugere-se que a leptina seja um sinalizador entre o *status* metabólico, o controle neuroendócrino do apetite, o crescimento e a reprodução em suínos (BARB; HUASMAN; HOUSECKNECHT, 2001). Também foram relatadas diferenças nos níveis de leptina circulante entre raças de suínos, estando às maiores concentrações nas raças Berkshire (6.58ng/ml), Poland China (6.45ng/ml) e Landrace (4.77ng/ml), quando comparadas as Chester White, Duroc (3.49ng/ml) e Yorkshire (3.96ng/ml), (FISHER; MALLETT; HOFFMAN, 2000).

Sasaki, Clutter e Pomp (1996) amplificaram um fragmento de aproximadamente, 2.200 pb, o qual inclui as regiões de *exon* do gene OB. A digestão do fragmento com a enzima *Acil* revelou um polimorfismo com um novo par de alelos segregantes: AA, com aproximadamente 850 pb e BB, com aproximadamente 600 pb. O genótipo AB apresentou os dois fragmentos. Foram genotipados 91 animais resultantes de cruzamentos entre "Wild Boar" com Large White e Meishan com Large White.

Com base na seqüência de Neuenschwander e outros (1996), Stratil e outros (1997) usaram *primers* específicos para o gene da leptina e encontraram o primeiro polimorfismo relatado, sendo este uma substituição T? C na posição 3469 do *exon* 3. O produto amplificado resultou em um fragmento de 152pb, que foi digerido com a enzima de restrição *Hinf* I, sendo detectados dois alelos: alelo T (fragmento com 152pb, não cortado) e alelo C (resultante de um sítio de restrição, produzindo dois fragmentos, um com 68pb e outro com 84pb). Assim, três diferentes genótipos

puderam ser observados. Foram genotipados sete animais da raça Meishan, 14 Large White, 12 Landrace, seis Pietran, sete “Black Pied Poestice”, seis Hampshire e 11 “Czech Meat Pig”, sendo que o alelo C estava fixado nos animais da raça Meishan e o alelo T, provindo da fixação nas outras raças.

O estudo do gene da leptina em animais domésticos tem crescido nos últimos anos e, em alguns deles, a busca por polimorfismos neste gene procura responder se as alterações encontradas podem estar correlacionadas com características produtivas e reprodutivas (NINOV, 2006). Vários estudos sugerem relação entre polimorfismo e características de interesse econômico (BORGES et al., 1998; JIANG; GIBSON, 1999; CHEN et al. 2004; VAN DER LENDE et al., 2005). Outros encontraram pouca ou nenhuma significância estatística entre eles (MALEK et al., 2001; KENNES et al., 2001; SZYDLOWSKI et al., 2004; Terman, 2005).

Esta busca por correlações entre os polimorfismos com características de interesse econômico mostrou que estes na posição 3.469 (T? C) podem estar associados ao acúmulo de gordura e ganho de peso diário em animais das raças Piau (BORGES et al., 1998), Landrace (KENNES et al., 2001) e Large White (JIANG; GIBSON, 1999) e, juntamente com o polimorfismo (A? T) na posição 2.845, ao consumo de alimento e à velocidade de crescimento em Landrace (KENNES et al., 2001).

Robert e outros (1998) identificaram dois diferentes cDNAs, que divergem pela existência ou não de um códon (CAG) na posição 49, que codifica o aminoácido glutamina. Os autores observaram, por intermédio de análise com enzima de restrição do gene da leptina em populações de Landrace, polimorfismo relacionado ao fenótipo magro. O polimorfismo encontrado com as enzimas Bgl II e Hind III somente foi observado em indivíduos magros, enquanto polimorfismos observados com Xba I foi detectado em animais magros e gordos.

Jiang e Gibson (1999) encontraram quatro polimorfismos diferentes em suínos, envolvendo pares de base isolados: C? T, A? G, C? T, e G? T. Estas substituições estavam nas posições 867, 1.112, 3.469 e 3.714, respectivamente. Foram genotipados 29 animais da raça Duroc, 29 Hampshire, 30 Landrace, 32 Large White e 30 animais da raça chinesa Erhualian, para possibilitar a comparação com as raças européias. Os dois primeiros polimorfismos ocorreram em *intron*. Os dois

próximos ocorreram na região codificadora, mas ambas eram silenciosas. Entretanto, as três últimas mutações mudaram o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição Taq I, Hinf I e Pst I, respectivamente. Os autores sugeriram uma possível associação entre o polimorfismo na posição 3.649 e a deposição de gordura em suínos, mas as evidências não foram conclusivas, pois o alelo C nesta posição do gene estava fixado na população chinesa e o alelo T ocorreu com maior frequência nos animais da raça Large White, selecionados para maior espessura de toucinho.

No Brasil, a partir de 1998, iniciou-se, no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, a construção de uma população segregante de suínos utilizando como animais parentais fêmeas da linhagem comercial (composto branco) e machos da raça nativa brasileira (Piau). Estes cruzamentos permitiram a formação da geração F2 com 620 exemplares. Alguns genes têm sido escolhidos como candidatos tendo como base suas funções fisiológicas, para serem estudados nestas famílias (GUIMARÃES et al., 2001) e estes têm sido seqüenciados e avaliados em painéis de enzimas de restrição para identificação de polimorfismos, entre eles estão os da Leptina e o Receptor de Leptina (SOARES, 2001).

Dentre as alterações identificadas por Soares (2001), no gene da Leptina, em um dos machos nativos da geração parental, foi encontrada uma substituição T → C na posição 3.469 pb. Este polimorfismo reconhecido pela endonuclease Hinf I, esta tendo sua frequência levantada nos animais da geração F2, para que possa ser avaliado se apresenta algum efeito fenotípico, pois apesar de se encontrar em região extra não traz mudanças na composição dos aminoácidos.

A seqüência de bases geradas pelo seqüenciamento automático do cDNA da leptina (Quadro 1), gerada a partir de mRNA extraído de tecido adiposo de fêmeas parentais comerciais e dos machos parentais Piau não diferenciou da seqüência relatada por Ramsay, Yan e Morrison (1998) e Robert e outros (1998). A comparação das seqüências geradas pelo estudo citado, com a seqüência publicada por Neuenschwander e outros (1996) mostrou haver divergência em seis bases. O mesmo número de diferenças também foi relatado por Robert e outros (1998). Ramsay, Yan e Morrison (1998) encontraram variação em sete bases em relação à seqüência de Neuenschwander e outros (1996).

seqüência aminoácido	TCC S	TAC Y	GTT V	GAA E	GCC A	GTG V	CCC P	ATC I	TGG W	AGA R	GTC V	CAG Q
seqüência aminoácido	GAT D	GAC D	ACC T	AAA K	ACC T	CTC L	ATC I	AAG K	ACG T	ATT I	GTC V	ACC T
seqüência aminoácido	AGG R	ATC I	AGT S	GAC D	ATT I	TCA S	CAC H	ATG M	CAG Q	TCT S	GTC V	TCC S
seqüência aminoácido	TCC S	AAA K	CAG Q	AGG R	GTC V	ACC T	GGT G	TTG L	GAC D	TTC F	ATC I	CCT P
seqüência aminoácido	GGG G	TCT L	CAT H	CCT P	GTC V	CTG L	CGT S	TTG L	TCC S	AAG K	ATG M	GAC D
seqüência aminoácido	CAG Q	ACC T	CTG L	GCG A	ATC I	TAC Y	CAA Q	CAG Q	ATC I	CTC L	ACC T	AG

QUADRO 1 – Seqüência de bases gerada a partir do cDNA de um segmento do gene da leptina. As seqüências estão na linha superior e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão posicionados logo abaixo destes

A contribuição individual do gene da leptina em características produtivas e reprodutivas é ainda desconhecida, pois o crescimento e a composição de carcaças são controlados por vários genes e influenciados pelo meio (SZYDLOWSKI et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006).

5. RAÇA PIETRAIN

A raça Pietrain foi encontrada pela primeira vez, em 1920, no vilarejo de Pietrain, próximo à cidade de Brabant, Bélgica (PORTER, 1993; ROTHSCCHILD; RUVINSKY, 1998). Existem várias teorias sobre sua origem, sendo todas baseadas em raças de constituição larga, forte e musculosa (PORTER, 1993). Os suínos Pietrain possuem pelagem cinza e branca com manchas pretas largas e irregulares, circuladas por um anel de pêlos brancos na pele pigmentada. As orelhas são eretas e voltadas para frente.

A raça caracteriza-se por alta porcentagem de carne magra, baixos índices de gordura, grande área de olho de lombo e maior conformação de carcaça nos pernis (ROTHSCCHILD; RUVINSKY, 1998). Entretanto, os cruzamentos com Pietrain caracterizam-se pela deterioração da qualidade da carne, aumentando os valores de pH_{2h}, perda por exsudação e cor. De acordo com Antunes e Borges (1997), estes

resultados estão correlacionados com o gene halotano, que constitui uma característica herdável do tipo autossômica e faz com que os animais em homozigose recessiva apresentem PSE, sigla internacional para denominar carne de coloração pálida, de textura mole e exsudativa; causando prejuízos à indústria de embutidos já que cor, consistência e capacidade de retenção de água são afetadas.

Durante a II Guerra Mundial, devido ao aumento da demanda de gordura da época, a espécie esteve quase extinta (ROTHSCHILD; RUVINSKY, 1998). Porém, após este período, a procura por carne suína magra aumentou rapidamente em todo o mundo.

Assim sendo, o aprimoramento genético da linhagem paterna da raça Pietrain veio ao encontro das necessidades de um mercado cada vez mais exigente em termos de qualidade de carcaça. As vantagens constitucionais desta raça oferecem menor teor de gordura e espessura de toucinho, dianteiro e pernil avantajados e um lombo maior. Em função da crescente tecnificação da suinocultura e da redução da mão-de-obra, as pesquisas também têm focado o desenvolvimento de habilidades maternas nessa raça, como docilidade das matrizes, alta produção leiteira e vitalidade dos leitões (PORTER, 1993).

6. RAÇA LARGE WHITE

A raça foi descrita pela primeira vez na Inglaterra, em Yorkshire e outros condados próximos, em 1868. Uma das raças de maior rebanho no Brasil dentre as raças puras. Destas, foi a última a ser introduzida no país, no início da década de 1970 e, pelo desempenho apresentado, vem aumentando anualmente a sua participação. É bastante utilizada na reprodução e miscigenação (PORTER, 1993).

Possui cabeça moderadamente longa, cara ligeiramente côncava, focinho largo e direcionado para cima, orelhas eretas e longas e corpo comprido; levemente arqueado para trás. A pelagem é branca, assim como a pele que também é fina, sem enrugamentos ou manchas (PORTER, 1993).

Caracterizada por sua robustez, fácil adaptação ao sistema intensivo de produção, prolificidade, excelentes rendimento de carcaça, produção de presunto e

bacon e rápido crescimento, são muito usados em cruzamentos com Landrace. Os varrões são fortes e as matrizes possuem boa habilidade materna e vitalidade de leitões (PORTER, 1993). De acordo com Pires e outros (2002), os Large White apresentam as melhores médias para GPD (ganho de peso diário) e ID100 (idade para atingir 100 kg) em relação às raças Duroc e Landrace. Fonseca e outros (2005) também observaram diferenças entre estas raças suínas, quando trabalharam com características reprodutivas e em cruzamentos as fêmeas Large White contribuíram com alelos favoráveis para as características GPD e ID100.

De acordo com Tibau e outros (1997), a raça Large White oferece um ganho de peso diário e crescimento máximo maiores e menor idade (em dias) aos 90 kg em relação aos animais Pietrain, sendo consideradas linhagens de crescimento rápido e lento, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2 – Desempenho e características de carcaça e da carne de suínos das raças Large White e Pietrain, dos 35 aos 90kg de peso vivo

	Crescimento máximo (kg)	Ganho de peso diário (g/dia)	Idade aos 90 kg (dias)	Carne magra (%)	Gordura Intramuscular (%)
Large White	90-100	1000	145	54,5	0,89
Pietrain	80	800	168	66,3	0,61

FONTE: Tibau et al., 1997.

Essas observações sugerem que o gene Obese pode ser candidatos para marcar características de relevância econômica, como consumo de alimento, espessura de toucinho, crescimento e reprodução. Assim, diferenças na sequência de DNA nesses genes poderão oferecer mais uma estratégia nos programas de seleção de suínos (SOARES et al., 2006), por meio de marcadores moleculares.

O capítulo 2, intitulado **“Polimorfismo Hinf I do gene obese em suínos das raças Pietrain e Large White após seleção divergente”** objetivou identificar polimorfismos pela técnica de PCR-RFLP no gene da obesidade e compará-los nas linhagens materna e paterna em suínos da raça Pietrain e na linhagem paterna de Large White, que sofreram seleção genética divergente por mais de 30 anos.

REFERÊNCIAS

ABIPECS, 2008. **Carne suína brasileira em 2007**. Disponível em: www.abipecs.org.br. Acesso em: 12 fev 2008.

AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, Seattle, v.382, p.250-252, 1996.

ALTMAN, M.; VON BORELL, E. Leptin as na indicator for carcass composition in farm animals. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.78, p.449-459, 2007.

ANTUNES, R.C.; BORGES, M. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético dos suínos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, p. 28 – 29, 1997.

BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; HUANG, W.; JASPAN, J.B.; MANESS, L.M. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, London, v.17, p.305-311, 1996.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the Reproductive System. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.137, n.7, p.3144-3147, 1996.

BARATTA, M.; SALERI, R.; MAINARDI, G.L.; VALLE, D.; GIUSTINA, A.; TAMANINI, C. Leptin regulates GH gene expression and secretion and Nitric Oxide Production in pig pituitary cells. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.143, n.2, p.551-557, 2002.

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

BARB, C.R.; KRAELING, R.R. Role of leptin in the regulation of gonadotrophin secretion in farm animals. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v.82-83, p.155-167, 2004.

BARRACHINA, M. D.; MARTINEZ, V.; WEI, J.Y.; TACHE, Y. Leptin-induced decrease in food intake is not associated with changes in gastric emptying in lean

mice. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.272, p.1007-1011, 1997.

BERG, E.P.; MCFADIN, E.L.; MADDOCK, K.R.; GOODWIN, R.N.; BAAS, T.J.; KEISLER, D.H. Serum concentrations of six genetic lines of swine and relationship with growth and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, p.167-171, 2003.

BIDWELL, C.A.; JI, S.; FRANK G.R.; CORNELIUS, S.G.; WILLIS, G.M.; SPURLOCK, M. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Animal Biotechnology**, West Lafayette, v.8, n.2, p.191-206, 1997.

BISPHAM, J.; GOPALAKRISHNAN, G.S.; DANDREA, J.; WILSON, V.; BUDGE, H.; KEISLER, D.H.; BROUGHTON PIPKIN, F.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, M.E. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.144, p.3575-3585, 2003.

BORGES, G.S.N.; SANTANA, B.A.A.; FRANCO, M.M.; BORGES, M.; ANTUNES, R.C.; GOULART, L.R. Determinação das frequências alélicas do gene da obesidade em diferentes raças suínas. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, p.89, 1998.

BRYNE, P.F.; McMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and candidate gene approach. **Probe**, Bethesda, v.7, p.24-27, 1996.

CAMERON, N.D.; PENMAN, J.C.; MCCULLOUGH, E. Serum leptin concentration in pigs selected for high or low daily food intake. **Genetical Research**, Cambridge, v.74, p.209-213, 2000.

CAMMISOTTO, P.G.; BUKOWIECKI, L.J.; DESAIES, Y.; BENDAYAN, M. Leptin biosynthetic pathway in white adipocytes. **Biochemical Cellular Biology**, v.84, p.207-214, 2006.

CAMPFIELD, L.A.; SMITH, J.F.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Hormone and Metabolic Research**, Mont-Saint-Aignan, v.28, n.12, p.619-632, 1996.

CASABIELL, X.; PINEIRO, V.; TOME, M.A.; PEINO, R.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, Charlotte, n.82; v.12; p.4270-4273, 1997.

CEDDIA, R.B.; WILLIAM JR, W.N.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Modulation of insulin secretion by leptin. **General Pharmacology**, Berkeley, v.32, n.2, p.233–237, 1999.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L.A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S.J. Evidences that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, Cambridge, v.84, p.491-495, 1996.

CHEN, M.; WANG, A.; FU, J.; LI, N. Different allele frequencies of MC4R gene variants in Chinese pig Breeds. **Archiv Für Tierzucht**, Dummerstorf, v.47, n.5, p.463-468, 2004.

CHILLIARD, Y.; DELAVALD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, Athens, v.29, n.1, p.3-22, 2005.

CIOBANU, D.; BASTIAANSEN, J.; MALEK, M.; HELM, J.; WOOLLARD, J.; PLASTOW, G.; ROTHSCCHILD, M. Evidence for New Alleles in the Protein Kinase Adenosine Monophosphate-Activated 3-Subunit Gene Associated With Low Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle and Improved Meat Quality. **Genetics**, Pittsburgh, n.159, p.1151-1162, 2001.

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

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R.; OHANNESIAN, J.P.; MARCO, C.C.; MCKEE, L.J.; BAUER, T.L.; CARO, J.F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.334, n.5, p.292–295, 1996.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. **Biologia Molecular aplicada à produção animal**: Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2001. 215p : il. ; 26cm.

CUMIN, F.; BAUM, H.P.; LEVENS, N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, London, v.20, n.12, p.1120-1126, 1996.

DE VOS, P.; SALADIN, R.; AUWERX, J.; STAELS, B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.27, .15.958-15.961, 1995.

DE VRIES, A.A.; SOSNICKI, J.P.G.; PLASTOW, G.S. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, Matieland, v. 49, p. s245, 1998. Supplement.

DEKKERS, J.C.M; ROTHSCILD, M.F.; MALEK, M.M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, **Anais...**, Via Internet, 2001.

DIO, R.D.; BARBERIO, J.C.; PRADAL, M.G.; MENEZES, A.M.S. Leptina: fisiologia dos mecanismos mantenedores do peso “versus” fisiopatologia da obesidade – **Informativo CRIESP**, São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.criesp.com.br/inform/inabr96.htm>. Acesso em: 02 mar. 2007.

DOYON, C.; DROUIN, G.; TRUDEAU, V.L.; MOON, T.W. Molecular evolution if leptin. **General and Comparative Endocrinology**, Bethesda, v.124, p.188-198, 2001.

ERICKSON, J.C.; CLEGG, E.K.; PALMITER, R.D. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. **Nature**, Seattle, v.38, p.415 – 418, 1996.

FABIAN, J.; CHIBA, L.I.; KUHLEERS, D.L.; FROBISH, L.T.; NADARJAH, K.; MCELHENNEY, W. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibility, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, p.1142-1149, 2003.

FREDERICH, R.C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature Medicine**, London, v.1, n.12, p.1311–1314, 1995.

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

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, Seattle, v.395, p.763-770, 1998.

FUJI, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; KHANNA, V.; WEILER, K.; BRIEN, P.; MACLENNAN, D. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v.253, p.448-451, 1991.

GHILARDI, N.; ZIEGLER, S.; WIESTNER, A.; STOFFEL, R.; HEIM, M.H.; SKODA, C. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.6231-6235, 1996.

GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; WENCESLAU, A.A.; PIRES, A.V.; SOARES, M.A.M.; CARMO, F.M.S. O genoma dos suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba, **Anais...** p.612 - 619.

GONG, D.W.; BI, S.; PRATLEY, R.E.; WEINTRAUB, B.D. Genomic Structure and Promoter Analysis of the Human obese Gene. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v.271, n.8, p.3971-3974, 1996.

HALAAS, J.M.; GAJIWALA, K.S.; MAFFEI, M.; COHEN, S.L.; CHAIT, B.T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, S.K.; BURLEY, S.K.; FRIEDMAN, J.M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, Washington, v.269, n.5223, p.543-546, 1995.

HAMMOUND, J. Progress in the physiology of farm animals. V.2, Butterworths, London.1955. Citado por FRISCH, R.E. Body fat, puberty and fertility. **Biological Reviews**, Cambridge, v.59, p.161-188, 1984.

HARRIS, R.B.S.; ZHOU, J.; REDMANN JR, S.M.; SMAGIN, G.N.; SMITH, S.R.; RODGERS, E.; ZACHWIEJA, J.J. A Leptin Dose-Response Study in Obese (ob/ob) and Lean (+/?) Mice. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.139, n.1, p. 8-19, 1998.

HOSSNER, K. L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: potential application in animal production. **Canadian journal of animal science**, Sherbrooke, v.78, n.4, p.463-472, 1998.

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

HU, Z.-L.; DRACHEVA, S.; JANG, W.; MAGLOTT, D.; BASTIAANSEN, J.; ROTHSCCHILD, M.F.; REECY, J.M. A QTL resource and comparison tolls for pigs: PigQTLDB. **Mammalian Genome**, New York, v.15, p.792-800, 2005.

JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R.; SPURLOCK, M.E. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**, West Lafayette, v.9, p.1-14, 1998.

JIANG, Z.H.; GIBSON, J.P. Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, New York, v.10, p.191-193, 1999.

JIN, L.; ZHAN, S.; BURGUERA, B. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cell. **Endocrinology**, Chevy Chase, n.141, p.333-339, 2000.

KAWAI, M.; YAMAGUSHI, M.; MURAKAMI, T.; SHIMA, K.; MURATA, Y.; KISHI, K. The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Bethesda, v.240, p.798-802, 1997.

KENNEDY, G.C. The role of depot fat in hypothalamic control of food intake in the rat. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v.140, p.578-592, 1953.

KENNES, Y.M.; MURPHY, B.D.; POTHIER, F., PALIN, M.F. Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. **Animal Genetics**, Oxford, v.32, p.215-218, 2001.

KOPECNY, M.; STRATIL, A.; CEPICA, S. Polymorphism at the porcine LEPR gene detected by PCR-DGGE. **Animal Genetics: Molecular Genetic Markers**, Oxford, v.28, n.6, p.461, 1997.

KULCSÁR, M.; JÁNOSI, S.; LEHTOLAINEN, T.; KÁTAI, L.; DELAUAUD, C.; BALOGH, O.; CHILLIARD, Y.; PYÖRÄLÄ, S.; RUDAS, P.; HUSZENICZA, G. Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, Athens, v.29, n.1, p.214-226, 2005.

LEE, G.H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.M.; CARROLL, K.M.; DARVISHZADEH, J.G.; LEE, J. I.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, Seattle, v.379, n.6566, p.632-635, 1996.

LEE, M.J.; FRIED, S.K. Multilevel regulation of leptin storage, turnover, and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 47, p.1984-1993, 2006.

LEROY, P.; DESSOLIN, S.; VILLAGEOIS, P.; MOON, B.C.; FRIEDMAN, J.M.; AILHAUD, G.; DANI, C. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, n.5, p.2.365-2.368, 1996.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, London, v.1, n.11, p.1155-1161, 1995.

MALEK, M.; DEKKERS, J.C.M.; LEE, H.K.; BAAS, T.J.; ROTHSCCHILD, M.F.; P.A. KERN, P.A.; FRIEDMAN, J.M. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. **Mammalian Genome**, New York, v.12, p.630-636, 2001.

MASON, M.M.; HE, Y.; CHEN, H.; QUON, M.J.; REITMAN, M. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.139, n.3, p.1013-1022, 1998.

MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L. M.; LAWRENCE, C. B.; HANNAH, L. T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mrna and the long form splice variant (ob-rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS letters**, Amsterdam, v.387, n.2-3, p.113-116, 1996.

MEYER, C.; ROBSON, D.; RACKOVSKY, N.; NADKARNI, V.; GERICH, J. Role of the kidney in human leptin metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.273, n.5, p.903-907, 1997.

MILAN, D.; JEON, J.T.; LOOFT, C.; AMARGER, V.; ROBIC, A.; THELANDER, M.; ROGEL-GAILLARD, C.; PAUL, S.; IANNUCELLI, N.; RASK, L.; RONNE, H.; LUNDSTRÖM, K.; REINSCH, N.; GELLIN, J.; KALM, E.; LE ROY, P.; CHARDON, P.; ANDERSSON, L. A Mutation in PRKAG3 Associated with Excess Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle. **Science**, Washington, v. 288, n. 5469, p. 1248–1251, 2000.

MILAN, D.; BIDANEL, J.-P.; IANNUCELLI, N.; RIQUET, J.; AMIGUES, Y.; GRUAND, J.; LE ROY, P.; RENARD, C.; CHEVALET, C. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. **Genetic Selection Evolution**, Edinburgh, v.34, p.705-728, 2002.

MONIN, G.; SELLIER, P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate postmortem period: The case of the Hampshire breed. **Meat Science**, Matieland, v.13, p.49-63, 1985.

MÜHLHÄUSLER, B.S.; ROBERTS, C.T.; MCFARLANEC, J.R.; KAUTERA, K.G.; MCMILLENA, I.C. Fetal Leptin Is a Signal of Fat Mass Independent of Maternal Nutrition in Ewes Fed at or above Maintenance Energy Requirements. **Biology of Reproduction**, Madison, n.67, v.2, p.493-499, 2002.

MURAKAMI, T.; IIDA, M.; SHIMA, K. Dexamethasone Regulates Obese Expression in Isolated Rat Adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Tokyo, v.214, n.3, p.1260-1267, 1995.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, Seattle, v. 409, p.194-198, 2001.

NEUENSCHWANDER, S.; RETTENBERGER, G.; MEIJERINK, E.; JOEIG, H.; STRANZINGER, G. Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to chromosome 18 by somatic cell hybrids. **Animal Genetics**, Oxford, v.27, p.275-278, 1996.

NINOV, K. Identificação de polimorfismos no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça. **Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz**, Piracicaba, SP. Dissertação (mestrado), 2006. 90p: il.

PEIXOTO, J. O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; BARBOSA, M.V.G.; TORRES, R.A.; SILVA, M.A. Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. **Journal of Animal Breeding Genetics**, Jokioinen, v.123, p.378-383, 2006.

PEREIRA, F.A. Melhoramento Genético de Suínos. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa. **Anais...**, Viçosa, p.9-15, 2000.

PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, Washington, v.269, n.5223, p.540–543, 1995.

PICO, C.; OLIVER, P.; SANCHEZ, J.; PALOU, A. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.90, p.735-741, 2003.

PIRES, A.V.; FONSECA, R.; COBUCI, J.A.; ARAÚJO, C.V.; CORRÊA DA COSTA, A.R.; LOPES, P.S.; ALMEIDA TORRES, R.; FREDERICO EUCLYDES, R. Estudo da divergência genética entre as raças suínas Duroc, Landrace e Large White, utilizando técnicas de análise multivariada. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Viçosa, v.10, n.2, 81-85, 2002.

PORTER, V. **PIGS: A Handbook of the Breeds of the World**. New York: Cornell University, 1993. p.128-130.

RAMSAY, T.G.; YAN, X.; MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **The Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.484-490, 1998.

ROBERT, C.; PAULIN, M.F.; COULOMBS, N.; ROBERGE, C.; SILVERSIDES, F.G.; BANKEL, B.F.; MCKAY, R.M.; PELLETIER, G. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.78, p.473-482, 1998.

ROPPIA, L. **Atualização sobre os níveis de Colesterol, Gordura e Calorias da Carne Suína**, 1998. Disponível em:
< www.sips.com.br/manual_download.php?id_arquivo=274&>. Acesso em: 12 fev 2008.

ROPPA, L. **Brasil:** características do 4º maior produtor e exportador mundial de carne suína, 2007. Disponível em: < www.porkexpo.com.br/index.php/pasta/18/>. Acesso em: 12 fev 2008.

ROTHSCHILD, M.F.; PLASTOW, G.S. Advances in pig genomics and industry applications. **AgBiotechnet**, Oxon, v.1, feb, 1999.

ROTHSCHILD, M.F.; RUVINSKY, A. **The Genetics of the Pig**. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1998. 622 p.

ROTHSCHILD, M.F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1, **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1999, p. 219-242.

SAGAWA, N.; YURA, S.; ITOH, H.; KAKUI, K.; TAKEMURA, M.; MUAMAH, M.A.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; NAKAO, K.; FUJII, S. Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. **Endocrine**, Kansas, v.19, p.64-71, 2002.

SAHU, A. Leptin Decreases Food Intake Induced by Melanin-Concentrating Hormone (MCH), Galanin (GAL) and Neuropeptide Y (NPY) in the Rat. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.139, n.11, p. 4739-4742, 1998.

SALADIN, R.; DE VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAEELS, B.; AUWERX, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, Seattle, v.377, p.527-529, 1995.

SALMAN, A.K.D. Gene da Leptina em Ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Málaga, v.8, n.12, 2007.

SASAKI, S.; CLUTTER, A.C.; POMP, D. Assignment of the porcine obese (leptin) gene to chromosome 18 by linkage analysis of a new PCR-based polymorphism. **Mammalian Genome**, New York, v.7, p.471-472, 1996.

SCARPACE, P.J.; NICOLSON, M.; MATHENY, M. UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. **Journal of Endocrinology**, Bradley Stoke, v.159, n.2, p.349-357, 1998.

SCHWARTZ, M.W.; SEELEY, R.J.; CAMPFIELD, L.A.; BURN, P.; BASKIN, D.G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.98, n.5, p.1101-1106, 1996.

SHORT, T.H.; ROTHSCCHILD, M.F.; SOUTHWOOD, O.I.; MCLAREN, D.G.; DE VRIES, A.; VAN DER STEEN, H.; ECKARDT, G.R.; TUGGLE, C.K.; HELM, J.; VASKE, D.A.; MILEHAM, A. J.; PLASTOW, G.S. Effect of the Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Production Traits in Four Commercial Pig Lines, **Journal of Animal Science**, Savoy, n.75, v.12, p.3138, 1997.

SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.; ALMEIDA TORRES, R. Utilização de marcadores genéticos em suínos. I. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Viçosa, v.11(1), p. 1-10, 2003a.

SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.; ALMEIDA TORRES, R. Utilização de marcadores genéticos em suínos. II. Características de desempenho e de qualidade da carne. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Viçosa, v.11(1), p. 11-20, 2003b.

SINHA, M.K.; OPENTANOVA, I.; OHANNESIAN, J.P.; KOLACZYNSKI, J.W.; HEIMAN, M.L.; HALE, J.; BECKER, G.W.; BOWSHER, R.R.; STEPHENS, T.W.; CARO, J.F. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.98, n.6, p.1277-1282, 1996.

SLIEKER, L.J.; SLOOP, K.W.; SURFACE, P.L.; KRIAUCIUNAS, A.; LAQUIER, F.; MANETTA, J.; BUE-VALLESKEY, J.; STEPHENS, T.W. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, n.10, p.5301-5304, 1996.

SMITH, G.; JACKSON, L.M.; FOSTER, D.L. Leptin regulation of reproductive function and fertility . **Theriogenology**, Bethesda, v.57, n.1, p.73-86, 2002.

SOARES, M.A.M. Estudo do gene da obesidade e de seu receptor em suínos 2001. 108f. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SOARES, M.A.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; EUCLYDES, P.S.; LOPES, P.S.; PEIXOTO, J.O.; GUIMARÃES, M.F.M.; WENCESLAU, A.A.; PIRES, A.V.; BENEVENUTO JÚNIOR, A.A. Novos polimorfismos no gene da obesidade em raças divergentes de

suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.401-407, 2006.

SPURLOCK, M. E.; RANALLETTA, M. A. ; CORNELIUS, S. G.; FRANK, G. R.; WILLIS, G. M.; JI, S.; GRANT, A. L.; BIDWELL, C.A. Leptin expression in porcine adipose tissue is not increased by endotoxin but is reduced by growth hormone. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, v.18, p.1051–1058, 1998.

STEPHENS, T.W.; BASINSKI, M.; BRISTOW, P.K.; BUE-VALLESKEY, J.M.; BURGETT, S.G.; CRAFT, L.; HALE, J.; HOFFMAN, J.; HSIUNG, H.M.; KRIAUCIUNAS, A.; MACKELLER, W.; ROSTECK, P.R.; SCHONER, B.; SMITH, D.; TINSLEY, F.C.; ZHANG, X.Y.; HEIMAN, M. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product . **Nature**, Seattle, v.377, n.12, p.530-532, 1995.

STRATIL, A.; PEELMAN, L.; POUCKE, M.V.; CEPICA, S. A Hinf I PCR-RFLP at the porcine leptin (LEP) gene. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p.371-372, 1997.

SZYDLOWSKI, M.; STACHOWIAK, M.; MACKOWSKI, M.; KAMYCZEK, M.; ECKERT, R., ROZYCKI, M.; SWITONSKI, M. No major effect of the leptin gene polymorphism on porcine production traits. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Oxford, v.121, p.149-155, 2004.

TAOUI, M.; CHEN, J.; DAVIAUD, C.; DUPONT J.; DEROUET M.; SIMON J. Cloning the chicken leptin gene. **Gene**, Bethesda, v.208, p.239-42, 1998.

TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; NANHUA, D.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; FREDERICK, T.C.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; MONROE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. **Cell**, Cambridge, v.83, p.1263-1271, 1995.

TERMAN, A. Effect of the polymorphim of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP) genes on litter size in Polish pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetic**, Oxford, v.122, p.400-404, 2005.

TIBAU, J.; PUIGVERT, X.; SOLER, J.; TRILLA, N.; DIESTRE. A.; GISPERT, M.; FERNÁNDEZ, J. & MANTECA, X. Incidencia de factores genéticos y de comportamiento en la eficiencia del crecimiento, la composición y la calidad de la

canal y de la carne en distintas razas porcinas. In: **PROYECTO INIA SC95048**. 1997.

TRAYHURN, P.; DUNCAN, J.S.; RAYNER, D.V. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. **Biochemical Journal**, London, v.311, p.729-733, 1995.

VAISSE, C.; HALAAS, J.L.; HORVATH, C.M.; DARNELL, J.E.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J.M. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild- type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nature Genetics**, New York, v.14, p.95-97, 1996.

VAN DER LENDE, T.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; LIEFERS, S.C. Leptin polymorphisms and their phenotypic associations. **Vitamins and Hormones**, Bethesda, v.71, p.373-404, 2005.

VILÀ, R., ADÁN, C.; RAFECAS, I., FERNÁNDEZ-LOPES, J.A., REMESAR, X., ALEMANY, M. Plasma leptin turnover rates in lean and obese Zucker rats. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.139, p.4466-4469, 1998.

VISSCHER, P.; R. PONG-WONG, C.; WHITTEMORE, C.H. Impact of biotechnology on (cross) breeding programmes in pigs. **Livestock Science**, Bethesda, v.65(1-2), p.57, 2000.

WANG, Y.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B.M. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v.75, p.971-977, 2002.

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

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, Seattle, v.372, p.425-32, 1994.

ZHAO, J.; KUNZ, T.H.; TUMBA, N.; SCHULZ, L.C.; LI, C.; REEVES, M.; WIDMAIER, E.P. Comparative analysis of expression and secretion of placental leptin in mammals. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.285, p.438-446, 2003.

CAPÍTULO 2
POLIMORFISMO Hinf I DO GENE OBESE EM SUÍNOS PIETRAIN E LARGE
WHITE APÓS SELEÇÃO DIVERGENTE

Polimorfismo Hinf I do gene obese em suínos Pietrain e Large White após seleção divergente

RESUMO

Objetivou-se identificar a existência de polimorfismos no gene da leptina em 112 suínos e compará-los entre as linhagens materna e paterna das raças Pietrain e Large White que sofreram seleção divergente por mais de 30 anos. Amostras de DNA extraído do sangue dos animais foram amplificadas por PCR e genotipadas por RFLP por meio da enzima de restrição Hinf I. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste qui-quadrado. Identificou-se 87,5% de genótipos TT e 12,5% TC. Não foi observado nenhum suíno CC. Ao relacionar o genótipo e sexo dos animais, independentemente de raça ou linhagem, não se obteve diferença estatisticamente significativa. Comparando as frequências genotípicas das linhagens materna e paterna de Pietrain não foi possível afirmar que o gene da obesidade tenha se fixado na linhagem materna. Já entre as linhagens paternas de Pietrain e Large White verificou-se diferença estatística significativa, sugerindo que o alelo C esteja associado ao crescimento e ganho de peso diário e, a baixa frequência deste nos Pietrain, esteja relacionada ao baixo índice de gordura corporal característico desta raça.

PALAVRAS-CHAVE: linhagem materna, linhagem paterna, marcadores moleculares, leptina, gene da obesidade, PCR-RFLP

INTRODUÇÃO

O gene obese (OB) codifica uma proteína de 16 kDa denominada leptina (do grego “leptos” que significa delgado (DIO et al., 2002)). Esta é produzida e secretada quase que exclusivamente pelos adipócitos e circula no sangue (ZHANG et al., 1997; FAROOQI et al., 1998; BARB; HUASMAN; HOUSEKNECHT, 2001). Tem sido proposto que esse hormônio tenha funções de controle do peso corporal por meio de um sistema de *feedback* (FRIEDMAN, 1997); sensor de balanço energético (HOUSEKNECHT et al., 1998); aumento da taxa metabólica geral e dos níveis de atividade, enquanto diminui o apetite (BARASH et al., 1996); influência sobre a atividade reprodutiva (BARASH et al., 1996; SILVA, 2003; Terman, 2005) e fertilidade (SMITH; JACKSON; FOSTER, 2002); regulação da secreção do hormônio do crescimento, estimulando-o (BARB; HUASMAN; HOUSEKNECHT, 2001; BARATTA et al., 2002).

Nos suínos, o gene da leptina foi clonado por Bidwell e outros (1997) e está localizado no cromossomo 18 (NEUENSCHWANDER et al., 1996; CAMBELL, 2001). Sua sequência consta no *GenBank* (# U66354), assim como seu mRNA (# U59894) (RAMSAY; YAN; MORRISON, 1998) e é considerado um gene candidato para marcar características de relevância econômica, como consumo de alimento, espessura de toucinho, crescimento e reprodução (LAGONIGRO et al., 2003).

Desta forma, a busca por polimorfismos neste gene procura responder se as alterações encontradas podem estar correlacionadas com características produtivas e reprodutivas. Em suínos, foram descritos sete polimorfismos no gene da leptina: C/T, A/G, C/T, G/T, A/T, T/C e G/A nas posições: 867, 1112, 3469, 3714, 2845, 3996 e 2728, respectivamente (STRATIL et al., 1997; ROBERT et al., 1998; JIANG; GIBSON, 1999; KENNES et al., 2001). Soares e outros (2006) relatam que, em alguns trabalhos como os de Robert e outros (1998) e Jiang e Gibson (1999), há sugestão de relação entre o polimorfismo e as características de interesse econômico. Outros encontraram pouca ou nenhuma significância estatística entre eles (MALEK et al., 2001; KENNES et al., 2001; SZYDLOWSKI et al., 2004; Terman, 2005).

Peixoto e outros (2006) afirmam que a contribuição individual do gene da leptina em características produtivas e reprodutivas é ainda desconhecida, pois o crescimento e a composição de carcaças são controlados por vários genes e influenciados pelo meio.

Essas diferenças na seqüência de DNA no gene da leptina poderão oferecer mais uma estratégia nos programas de seleção de suínos por marcadores moleculares (MAS) (SILVA, 2003), por meio dos aumentos da acurácia na predição dos valores genéticos (DE VRIES; SOSNICKI; PLASTOW, 1998) e da intensidade de seleção, para características limitadas pelo sexo, e com a redução do intervalo de gerações, em características de carcaça (VISSCHER; PONG-WONG; WHITEMORE, 2000). Reis Filho (2007) afirma que haplótipos intragênicos compostos por várias mutações neutras tendem a estar em forte desequilíbrio de ligação com variantes alélicas funcionais nos sítios determinando variação funcional no gene. Conseqüentemente, qualquer polimorfismo encontrado dentro do gene e em suas seqüências regulatórias é útil para análise de genes candidatos, independentemente os sítios são funcionais ou não.

De um modo geral, a estratégia adotada por laboratórios, para construção de mapas de ligação e análise e detecção de QTLs, explora a divergência genética e fenotípica entre as raças suínas. As raças de suínos usadas para os cruzamentos de referência são de três tipos: raças comerciais européias ou americanas (Large White, Landrace e/ou Pietrain), raças chinesas (principalmente Meishan) e o porco selvagem europeu (ELLEGREN et al., 1995; REIS FILHO, 2007).

Assim sendo, neste trabalho utilizou-se a raça Pietrain, cujo aprimoramento genético da linhagem paterna veio ao encontro das necessidades de um mercado cada vez mais exigente em termos de qualidade de carcaça, apresentando como vantagens constitucionais: menor teor de gordura e espessura de toucinho, dianteiro e pernil avantajados e um lombo maior e, em função da crescente tecnificação da suinocultura e da redução da mão-de-obra, as pesquisas também têm focado o desenvolvimento de habilidades maternas nessa raça, como docilidade das matrizes, alta produção leiteira e vitalidade dos leitões (PORTER, 1993). E a raça Large White, que oferece maior ganho de peso diário, menor idade ao atingir 90 kg em relação aos animais Pietrain (TIBAU et al., 1997), sendo consideradas linhagens

de crescimento rápido e lento, respectivamente.

O objetivo deste estudo foi o de identificar e comparar a frequência dos polimorfismos dos genes *obese* nas linhagens paterna e materna da raça Pietrain e nas linhagens paternas de Pietrain e Large White, que sofreram seleção divergente por mais de 30 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 112 suínos, sendo 36 da linhagem paterna de Pietrain (08 machos e 28 fêmeas); 30 da linhagem materna de Pietrain (11 machos e 19 fêmeas) e 46 da linhagem paterna de Large White (11 machos e 35 fêmeas) de uma granja núcleo de uma empresa de melhoramento genético, localizada em Rio Verde – GO.

Coletaram-se amostras de sangue destes animais, por punção da veia jugular, utilizando agulhas de 1,2 mm x 40 mm (BD Precisionglide) e seringas de 10 ml (BD Plastpak). O acondicionamento realizou-se em Vacutainers com 7 ml de volume contendo solução anti-coagulante (EDTA).

O sangue foi transportado em uma caixa de isopor, contendo gelo reciclável para o resfriamento e conservação do material durante um percurso de aproximadamente 400 km da granja núcleo em Rio Verde, GO até a empresa Biogenetics, localizada em Uberlândia, MG, onde se realizou a extração do DNA.

Procedimentos laboratoriais

A extração do DNA sangue foi realizada por meio do protocolo Master Mix:

- a) Centrifugar o sangue total a 5000rpm por 40min para formar a camada de leucócitos entre o plasma e a parte sólida do sangue;
- b) Remover uma alíquota de 500µl da camada de leucócitos, colocar em um tubo de 2ml e adicionar 1ml de tampão de lise celular (Tabela 3) gelado;
- c) Vortexar cuidadosamente por 10s para ressuspender as células e completar a lise;
- d) Centrifugar a 8.000rpm durante 5min para precipitação dos núcleos;

- e) Descartar o sobrenadante cuidadosamente. Adicionar 1ml de tampão de lise celular e repetir os passos c e d até que o pellet adquira uma cor branca;
- f) Adicionar 400µl de Master Mix (Tabela 4) a cada tubo e pipetar “up and down” até que o pellet se desfça. Adicionar 20µl de proteinase K;
- g) Incubar as amostras a 55°C overnight ou deixar a 65°C por 2h;
- h) Centrifugar a 13.000rpm durante 5min para precipitação dos debris celulares;
- i) Recolher o sobrenadante em um tubo limpo e adicionar 200µl de cloreto de lítio 7,5M ou cloreto de sódio saturado (7M) a cada uma das amostras. Vortexar por 5 s e incubar as amostras em gelo por 10min;
- j) Centrifugar por 15min a 13.000rpm para precipitação de proteínas e outros contaminantes;
- l) Recolher o sobrenadante em um tubo limpo e adicionar 1ml de etanol absoluto; misturar por inversão até que os flocos de DNA se tornem visíveis (deixar overnight se o pellet for pequeno);
- m) Centrifugar os tubos a 13.000rpm por 10min para precipitar o DNA. Adicionar 1ml de etanol 70% sem desfazer o pellet;
- n) Centrifugar os tubos a 13.000rpm por 10min. Retirar o etanol, deixar secar o pellet durante pelo menos 30min e ressuspender em 200µl de água.
- Obs: a quantidade de água depende do tamanho do pellet formado.

TABELA 3 – Protocolo para o tampão utilizado na lise celular durante o processo de extração de DNA para genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White

Reagente	Estoque	Trabalho
Sacarose 320mM	100%	43,81g
Tris-HCl 10mM, pH 7,5	1M	4,0ml
MgCl ₂ 5mM	1M	2,0ml
Triton X-100	100%	4,0ml
Água		Completar para 400ml

TABELA 4 – Protocolo para o Master Mix utilizado durante o processo de extração de DNA para genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White

Reagente	Estoque	Trabalho
Tris-HCl 10mM, pH 7,5	1M	2,0ml
EDTA 10mM	0,5M	4,0ml
NaCl 10mM	3,0M	667µl
SDS 0,5%	10%	10ml
Água		Completar para 200ml

Após a extração dos ácidos nucleicos, a PCR-RFLP foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia-MG.

Para estimar o volume necessário à realização da PCR, verificou-se a quantidade de DNA obtida por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio.

Em seguida, realizou-se uma reação em cadeia de Polimerase (PCR). Utilizou-se a mesma sequência do par de *primers* de Stratil e outros (1997) (5'TGCAGTCTGTCTCCTCCAAA3' (forward) - 5'CGATAATTGGATCACATTTCTG3' (reverse)) que amplificava uma seqüência de 152 pares de bases (pb) dentro do gene *obese* no suíno (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5 – Condições ótimas da reação de PCR realizada para a genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White

Reagentes	Quantidade por amostra
DNA	0,5µL
Taq DNA Polimerase	0,2µL
<i>Primer</i>	0,8µL
dNTP	0,5µL
MgCl ₂	1,2µL
Tampão da enzima	2,0µL
Água MiliQ estéril	14,8µL
TOTAL	20,0µL

TABELA 6 – Programação do termociclador utilizado para a reação de PCR realizada na genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White

Ação	T °C/Tempo
Desnaturação inicial	95 °C - 2min
Desnaturação	95 °C - 1min
Anelamento	55 °C - 1min
Extensão	72 °C - 1min
Ciclos de amplificação	34 vezes
Extensão Final	72 °C - 10min
Incubação	4°C – 1h

Com a conclusão da PCR, o produto amplificado foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 1,5% - TBE 0,5X, corado com brometo de etídio.

Para a verificação de polimorfismo entre os animais, foi realizada uma restrição enzimática com Hinf I (Tabela 7), a qual cliva uma sequência constituída por GANTC (N= A, C, T ou G). O gene *obese* possui uma região GAGTT e foi realizada a clivagem quando havia uma troca da base T interna por C, levando à formação de dois fragmentos no mutado, compostos de 84 e 68 pares de base cada. Para tal, o produto da PCR necessitou ficar em *overnight* a 37°C.

TABELA 7 – Condições da restrição enzimática realizada durante a genotipagem de 112 suínos de linhagens materna e paternas de Pietrain e Large White

Reagentes	Quantidade por amostra
Produto da PCR	10µL
Enzima HINF1	0,2µL
Tampão da Enzima	1,5µL
Água	3,3µL
TOTAL	15,0µL

Em seguida, o produto da restrição enzimática com eletroforese em gel de agarose 3,5% - TBE 0,5X e corado com brometo de etídio foi visualizado. A genotipagem foi realizada pela visualização dos géis corados em um transiluminador de luz ultravioleta. Os animais considerados TT apresentaram a sequência não-clivada, ou seja, uma banda de 152pb; nos TC havia três bandas, sendo uma de 152pb e as originadas da clivagem na mutação (84 e 68pb) e os suínos CC somente as duas bandas menores (Figura 1).

Marcador	TT	TC	CC
152pb	—	—	
84pb		—	—
68pb		—	—

FIGURA 1 – Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com respectivas bandas e pesos moleculares (TT – banda 152pb; TC – bandas 152, 84 e 68pb; CC – bandas 84 e 68pb)

Análise estatística

Os genótipos obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de χ^2 (Qui-quadrado) a uma significância de 0,05 (SOUNIS, 1985). O mesmo teste foi utilizado para comparação estatística entre os dados deste trabalho e os de Borges e outros (1998) e Stratil e outros (1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Genotipagem

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 a 1,5 μ l), portanto, estipulou-se que as reações subseqüentes seriam realizadas com o menor volume de DNA testado, ou seja, 0,5 μ l, por ser a amostra que apresentou a menor quantidade de resíduos.

O padrão de bandas encontrado seguiu-se de acordo com Stratil e outros (1997), conforme esperado, já que os *primers* utilizados foram os mesmos. A genotipagem dos animais foi feita baseada neste padrão, no qual se pode observar que os indivíduos de genótipo CC apresentam duas bandas próximas (84 e 68 pares de base); os TT somente uma de maior peso molecular (152 pares de base) e os heterozigotos (TC) possuem as três bandas dos demais genótipos (Figura 2).

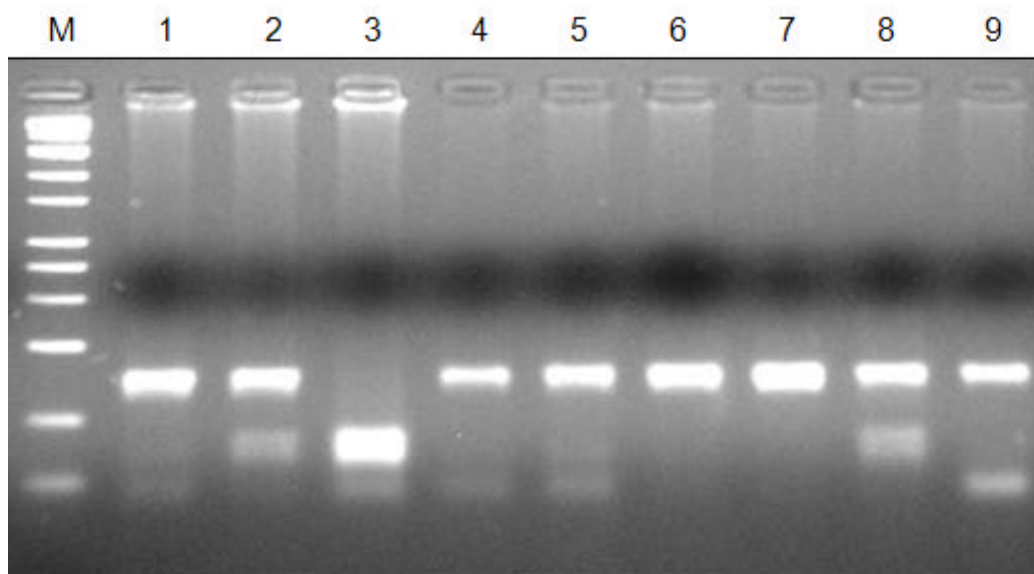


FIGURA 2. Gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com respectivas bandas e pesos moleculares (TT – 152pb; TC – 152, 84 e 68pb; CC – 84 e 68pb). M. Marcador de peso molecular. 1. Amostra padrão de genótipo TT. 2. Amostra padrão de genótipo TC. 3. Amostra padrão de genótipo CC. 4, 5, 6, 7, 9. Amostras TT. 8. Amostra TC.

Freqüências genotípicas e alélicas

Após genotipados os 112 suínos Large White (linhagem paterna) e Pietrain (linhagens materna e paterna), foram determinadas as freqüências genotípicas (Tabela 8) e alélicas (Tabela 9) do gene da obesidade. Observou-se 87,5% de animais com o genótipo TT, sendo 31,25% da linhagem paterna de Large White; 31,25% da linhagem paterna de Pietrain e 25% da linhagem materna de Pietrain. Do genótipo TC, eram 12,5% nos quais 10% eram Large White, 0,5% da linhagem paterna de Pietrain e 2% da linhagem materna da mesma raça, com 0% de CC. Quanto às freqüências alélicas encontrou-se 93,75% de alelos T e 6,25% de C.

TABELA 8 - Determinação das freqüências genotípicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna)

Raças	Freqüências genotípicas							
	TC	%	TT	%	CC	%	Total	%
Pietrain (linhagem materna)	2	1,8	28	25	0	0	30	26,8
Pietrain (linhagem paterna)	1	0,9	35	31,25	0	0	36	32,15
Large White (linhagem paterna)	11	9,8	35	31,25	0	0	46	41,05
TOTAL	14	12,5	98	87,5	0	0	112	100

TABELA 9 – Determinação das freqüências alélicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna)

Raças	Freqüências alélicas					
	T	%	C	%	TOTAL	%
Pietrain (linhagem materna)	58	25,9	2	0,9	60	26,8
Pietrain (linhagem paterna)	71	31,7	1	0,45	72	32,15
Large White (linhagem paterna)	81	36,15	11	4,9	92	41,05
TOTAL	210	93,75	14	6,25	224	100

As freqüências observadas não diferiram estatisticamente das relatadas por Borges e outros (1998), que ao genotiparem 80 suínos Large White observaram 82,5% TT, 17,5% TC e nenhum CC e ao analisar 53 animais Pietrain, obtiveram 90,56% de genótipos TT; 7,54% de TC e 1,88% de CC. (Tabela 10).

TABELA 10 – Comparação das freqüências genotípicas para as raças Large White e Pietrain encontradas por Borges e outros (1998) e as deste trabalho

Raça	Freqüência genotípica					
	Borges et al. (1998)			Dissertação		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Large White	66	14	0	35	11	0
Pietrain	48	4	1	63	3	0

$\chi^2 < 5,9915$ – não significativo

Ao comparar as freqüências alélicas encontradas por esses mesmos autores e os aqui observados também não se encontrou diferença estatística significativa (Tabela 11). Stratil e outros (1997) ao estudarem Large White encontraram 82% de freqüência alélica T e 18% de C, já em Pietrain relataram 75% de T e 25% de C. Borges e outros (1998) relataram 95% de alelos T e 5% de C em Pietrain e 91% de T e 9% de C em Large White. A baixa freqüência do alelo C é consistente ainda com os dados de Kulig; Grzestak e Szatkowska (2001); Korwin-Kossakowska e outros (2001) e Szydlowski e outros (2004) ao estudarem outras raças suínas.

TABELA 11 – Comparação das frequências alélicas para as raças Large White e Pietrain encontradas por Stratil e outros (1997); Borges e outros (1998) e as deste trabalho

Raça	Frequência alélica					
	Stratil et al. (1997)		Borges et al. (1998)		Dissertação	
	T	C	T	C	T	C
Large White	0,82	0,18	0,91	0,09	0,88	0,12
Pietrain	0,75	0,25	0,95	0,05	0,98	0,02

$\chi^2 < 3,8415$ – não significativo

Sexo X Gene da Obesidade

Ao testar o genótipo em relação ao sexo dos suínos, independentemente de raça ou linhagem, obteve-se resultado negativo (Tabela 12), comprovando que o gene OB é autossômico e não está ligado ao sexo. Entretanto, Peixoto e outros (2006) afirmam que as diferenças entre genótipo e sexo representam as distintas condições ambientais, nas quais a leptina se expressa, e os efeitos do genótipo podem ser explicadas pelas diferentes expressões da proteína em machos e fêmeas.

Em humanos, observou-se que as mulheres secretam três vezes mais leptina que os homens. Nestes, a quantidade desta proteína diminui após a puberdade, pois a testosterona é capaz de inibir sua síntese, enquanto que, o estrógeno é capaz de estimulá-la. É possível que haja diferenças entre os sexos também nos suínos, em função da alta similaridade (86%, segundo Neuenschwander e outros (1996)), entre os genes nestas espécies (PEIXOTO, 2006). Esta interação indica que marcadores moleculares podem ter diferentes resultados entre os sexos.

TABELA 12 - Relação das frequências genotípicas do gene da obesidade de 112 suínos das raças Pietrain (linhagens materna e paterna) e Large White (linhagem paterna) e o sexo

Sexo	TC	%	TT	%	Total	%
Machos	4	3,60	26	23,20	30	26,80
Fêmeas	10	8,90	72	64,30	82	73,20
TOTAL	14	12,50	98	87,50	112	100

$\chi^2 < 3,8415$ – não significativo

Linhagens materna e paterna de suínos da raça Pietrain X Gene da Obesidade

Ao comparar as frequências genotípicas das linhagens de Pietrain paterna e materna não se encontrou diferença estatisticamente significativa (Tabela 13). Assim, não é possível afirmar que o gene da obesidade tenha se fixado mais na linhagem materna em relação à paterna. Acreditava-se que este teria se fixado mais na linhagem materna, pois com a crescente tecnificação da suinocultura e da redução da mão-de-obra, as pesquisas focaram o desenvolvimento de habilidades como alta produção leiteira, que está relacionada à gordura corporal das porcas (PORTER, 1993) e o fato das raças chinesas hiperprolíferas, como a Meishan, serem obesas, enquanto que, na linhagem paterna é desejável menor teor de gordura e espessura de toucinho (PORTER, 1993).

Jiang e Gibson (1999) encontraram correlação positiva entre o alelo C e a taxa de gordura corporal na raça Meishan. Borges e outros (1998) sugeriram que o alelo C pode estar associado com o acúmulo de gordura. Posteriormente, Kuryl e outros (2003) concluíram que o genótipo TT pode ser mais vantajoso por estar associado à menor deposição de gordura na carcaça quando comparado ao TC. Trabalhos de Urban e outros (2002) verificaram que animais da raça Landrace, homozigotos (TT) apresentaram menor ganho diário de peso em relação aos heterozigotos (TC); uma associação inversa foi observada por Kennes e outros (2001).

TABELA 13 - Relação entre as frequências genotípicas do gene da obesidade de 66 suínos das linhagens materna e paterna da raça Pietrain

Raças	TT	%	TC	%	Total	%
Pietrain (linhagem materna)	28	42,50	2	3,00	30	45,50
Pietrain (linhagem paterna)	35	53,00	1	1,50	36	54,50
TOTAL	63	95,50	3	5,50	66	100

$\chi^2 < 3,8415$ – não significativo

As diferenças entre as linhagens paternas e maternas de suínos têm impacto no crescimento e desenvolvimento desses animais, que podem ser mediadas pelo metabolismo e partição de nutrientes entre tecidos adiposo e muscular (SINCLAIR et al., 1998). Essas variações no metabolismo energético podem ser atribuídas, em

parte, ao perfil endócrino das diferentes linhagens maternas e paternas e às condições ambientais (LEININGER et al., 2000).

Litten e outros (2004) afirmam que as diferenças quanto a crescimento, consumo alimentar e qualidade de carcaça entre as linhagens materna e paterna de raças suínas são, principalmente, devido à genética, com pouca influência de fatores endócrinos desses animais.

Sabe-se que, nos mamíferos, as mães exercem efeito maior que os pais sobre o fenótipo dos descendentes, pois, além da contribuição genética, podem influenciar a progênie por meio do ambiente que lhe proporciona. Assim, as características de crescimento, principalmente até o desmame, são determinadas por dois genótipos: o do próprio animal (efeito genético direto) e o de sua mãe (efeito genético materno). Pesquisadores ainda afirmam que há efeito materno significativo em características que se expressam mais tarde na vida do animal, e concluem que, como foram encontradas correlações genéticas negativas entre o efeito direto e materno para várias características e raças, faz-se necessário incluir o efeito genético materno nos modelos para estimação de parâmetros genéticos e avaliação genética. Já, Pires e outros (2002), ao avaliar tendências genéticas de efeitos diretos e maternos de características de leitegada em suínos, concluíram que as tendências genéticas dos efeitos genéticos maternos apresentaram-se negativas ou praticamente nulas, indicando a inexistência de preocupação com tal efeito nos programas de melhoramento das populações estudadas.

Linhagens paternas de Pietrain e Large White X Gene da Obesidade

Entre linhagens paternas de Pietrain e Large White houve diferença significativa (Tabela 14), na qual os Large White apresentaram mais genótipos TC em relação aos Pietrain, sugerindo que o alelo C está associado ao crescimento e ganho de peso diário, já que o crescimento dos Large White é considerado rápido, enquanto que, dos Pietrain é lento.

TABELA 14 - Relação entre as frequências genotípicas do gene da obesidade de 82 suínos da linhagem paterna das raças Pietrain e Large White

Raças	TT	%	TC	%	Total	%
Large White (linhagem paterna)	35	42,70	11	16,70	46	55,80
Pietrain (linhagem paterna)	35	42,70	1	1,50	36	44,20
TOTAL	70	85,40	12	18,20	82	100

$\chi^2 > 3,8415$ – significativo

Houseknecht e outros (1998) afirmam que a regulação da ingestão do alimento e o balanço energético corporal são importantes para otimizar o crescimento dos animais. Além disso, foi observado que a leptina regula a secreção do hormônio do crescimento, estimulando-o (BARB et al., 1998).

A raça Large White também é associada à alta prolificidade (PORTER, 1993) e melhores médias para ganho de peso diário (GPD) (PIRES et al., 2002). Assim, é possível que o alelo C esteja relacionado ao crescimento e ganho de peso diário e a diferença não significativa encontrada entre as linhagens materna e paterna de Pietrain seja devido ao tamanho da amostra. Porém, Szydlowski e outros (2004) não encontraram associação entre polimorfismo R3469C do gene da leptina e características de gordura intramuscular em Large White analisando 135 animais.

É possível que a baixa frequência do alelo C nos Pietrain esteja associada às características da raça, citados por Rothschild e Ruvinsky (1998) como alta porcentagem de carne magra, baixos índices de gordura, grande área de olho de lombo e maior conformação de carcaça nos pernis. Além disso, Gregory e outros (1977) encontraram maiores níveis de insulina circulante em suínos da raça Large White em relação aos Pietrain, que são mais sensíveis ao estresse e produtores de maior massa magra.

Peixoto e outros (2006) citam duas hipóteses capazes de explicar a associação entre gene da leptina e características produtivas e reprodutivas em suínos; a primeira sugere que os polimorfismos detectados estejam em desequilíbrio com outro SNP, que poderia ser o verdadeiro sítio de causa das variações observadas. A segunda diz que podem existir falsos positivos, por um número limitado de observações para alguns genótipos ou combinações.

CONCLUSÕES

A seleção divergente das linhagens materna e paterna da raça Pietrain não alterou a frequência genotípica e alélica do gene da obesidade, assim como, entre os sexos. Já entre as linhagens paternas das raças Pietrain e Large White o alelo C fixou-se melhor nestes últimos sugerindo que o mesmo esteja associado ao crescimento e ganho de peso diário ou que a baixa frequência encontrada nos Pietrain correlacione-se as características da mesma.

Estudos adicionais serão necessários para verificar se as variações encontradas nos genótipos dos animais estão simplesmente refletindo diferenças entre raças ou se podem estar relacionadas, de alguma forma, com características produtivas ou reprodutivas em suínos.

REFERÊNCIAS

- BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the Reproductive System. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.137, n.7, p.3144-3147, 1996.
- BARATTA, M.; SALERI, R.; MAINARDI, G.L.; VALLE, D.; GIUSTINA, A.; TAMANINI, C. Leptin regulates GH gene expression and secretion and Nitric Oxide Production in pig pituitary cells. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.143, n.2, p.551-557, 2002.
- BARB, C.R.; YAN, X.; AZAIN, M.J.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B.; RAMSAY, T.G. Recombinant porcine leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. **Domestic Animal Endocrinology**, Athens, v.15, n.1, p.77-86, 1998.
- BARB, C.R.; HUASMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K.L.; Biology of leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, Athens, v.21, p.297-317, 2001.
- BIDWELL, C.A.; JI, S.; FRANK G.R.; CORNELIUS, S.G.; WILLIS, G.M.; SPURLOCK, M. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Animal Biotechnology**, West Lafayette, v.8, n.2, p.191-206, 1997.
- BORGES, G.S.N.; SANTANA, B.A.A.; FRANCO, M.M.; BORGES, M.; ANTUNES, R.C.; GOULART, L.R. Determinação das frequências alélicas do gene da obesidade em diferentes raças suínas. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, p.89, 1998.
- CAMBEL, E.M.G.; FAHRENKRUG, S.C.; VALLET, J.L.; SMITH, T.P.L.; ROHER, G.A. An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. **Animal Genetics**, Boston, v.32, p.375-379, 2001.
- DE VRIES, A.A.; SOSNICKI, J.P.G.; PLASTOW, G.S. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, Maitland, v. 49, p. s245, 1998. Supplement.
- DIO, R.D.; BARBERIO, J.C.; PRADAL, M.G.; MENEZES, A.M.S. Leptina: fisiologia dos mecanismos mantenedores do peso “versus” fisiopatologia da obesidade – **Informativo CRIESP**, São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.criesp.com.br/inform/inabr96.htm>. Acesso em: 02 mar. 2007.

ELLEGREN, H. Mutation rates at porcine microsatellite loci. **Mammalian Genome**, New York, v.6, p. 376-377, 1995.

FAROOQI, S.; RAU H.; WHITEHEAD, J.; O'RAHILLY, S. Obese gene mutations and human obesity, **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.57, p. 471-475, 1998.

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

GREGORY, N.G.; LOVELL, R.D.; WOOD, J.D.; LISTER, D. Insulin-secreting ability in Pietrain and Large White pigs. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.89, p.407-413, 1977.

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

JIANG, Z.H.; GIBSON, J.P. Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, New York, v.10, p.191-193, 1999.

KENNES, Y.M.; MURPHY, B.D.; POTHIER, F.; PALIN, M.F. Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. **Animal Genetics**, Boston, v.32, n.4, p.215-218, 2001.

KORWIN-KOSSAKOWSKA, A.; KAMYCZEK, M.; CIÉSLAK, D.; KURY, J. The polymorphism of reproduction-linked genes in Line 990 sows. **Animal Science Papers And Reports**, Jastrzebiec, v.19, p.265-276, 2001.

KULIG, H.; GRZESTAK, W.; SZATKOWSKA, I. Effect of leptin gene polymorphism on growth and carcass traits in pigs. **Archiv Für Tierzucht**, Dummerstorf, v.44, p.291-296, 2001.

KURYL, Y.M.; MURPHY, B.D.; PIERZCHALA, M.; BOCIAN, M.; GRAJEWSKA, S. A relationship between genotypes at the GH and LEP loci and carcass meat and fat

deposition in pigs. **Animal Science Papers and Reports**, Jastrzebiec , v.21, p.15-26, 2003.

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

LEININGER, M.T.; PORTOCARRERO, C.P.; SCHNICKEL, A.P.; SPURLOCK, M.E.; BIDWELL, C.A.; NIELSEN, J.N.; HOUSEKNECHT, K.L. Physiological response to acute endotoxemia in swine: effect of genotype on energy metabolites and leptin. **Domestic Animal Endocrinology**, Athens, v.18, p.71-82, 2000.

LITTEN, J.C.; CORSON, A.M.; HALL, A.D.; CLARKE, L. The relationship between growth performance, feed intake, endocrine profile and carcass quality of different maternal and paternal lines of pigs. **Livestock Science**, Bethesda, v.89, p.33-39, 2004.

MALEK, M.; DEKKERS, J.C.M.; LEE, H.K.; BAAS, T.J.; ROTHSCCHILD, M.F.; P.A. KERN, P.A.; FRIEDMAN, J.M. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. **Mammalian Genome**, New York, v.12, p.630-636, 2001.

NEUENSCHWANDER, S.; RETTENBERGER, G.; MEIJERINK, E.; JOEIG, H.; STRANZINGER, G. Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to chromosome 18 by somatic cell hybrids. **Animal Genetics**, Oxford, v.27, p.275-278, 1996.

PEIXOTO, J. O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; BARBOSA, M.V.G.; TORRES, R.A.; SILVA, M.A. Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. **Journal of Animal Breeding Genetics**, Jokioinen, v.123, p.378-383, 2006.

PIRES, A.V.; FONSECA, R.; COBUCI, J.A.; ARAÚJO, C.V.; CORRÊA DA COSTA, A.R.; LOPES, P.S.; ALMEIDA TORRES, R.; FREDERICO EUCLYDES, R. Estudo da divergência genética entre as raças suínas Duroc, Landrace e Large White, utilizando técnicas de análise multivariada. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Viçosa, v.10, n.2, 81-85, 2002.

PORTER, V. **PIGS**: A Handbook of the Breeds of the World. New York: Cornell University, 1993. p. 128-130.

RAMSAY, T.G.; YAN, X.; MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **The Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.484-490, 1998.

REIS FILHO, J.C. Proposta de avaliação genética de suínos obtidos por cruzamentos entre raças nativas e comerciais. **Suíno.com**: Comunidade de Genética, 2007. Disponível em: http://www.suino.com.br/genetica/noticia.asp?pf_id=32138&dept_id=5. Acesso em: 13 fev 2008.

ROBERT, C.; PALIN, M.F.; COULOMBE, N.; ROBERGE, C.; SILVERSIDES, F.G.; BENKEL, B.F.; MCKAY, R.M.; PELLETIER, G. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.78, p.473-482, 1998.

ROTHSCHILD, M.F.; RUVINSKY, A. **The Genetics of the Pig**. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1998. 622 p.

SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.; ALMEIDA TORRES, R. Utilização de marcadores genéticos em suínos. I. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Viçosa, v.11(1), p. 1-10, 2003.

SINCLAIR, A.G.; CIA, M.C.; EDWARDS, S.S.; HOSTE, S. Response to dietary protein during lactation of Meishan synthetic, Large White and Landrace gilts given food to achieve the same target backfat level at farrowing. **Animal Science**, Cambridge, v.67, p.349-354, 1998.

SMITH, G.D.; JACKSON, L.M.; FOSTER, D.L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. **Theriogenology**, Bethesda, v.57, n.1, p.73-86, 2002.

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

SOUNIS, E. **Bioestatística**. Princípios fundamentais, metodologia estatística. Aplicação às Ciências Médicas, São Paulo, SP: Livraria Atheneu – Rio de Janeiro, 3ª edição, 1985.

STRATIL, A.; PEELMAN, L.; POUCKE, M.V.; CEPICA, S. A Hinf I PCR-RFLP at the porcine leptin (LEP) gene. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p.371-372, 1997.

SZYDLOWSKI, M.; STACHOWIAK, M.; MACKOWSKI, M.; KAMYCZEK, M.; ECKERT, R.; ROZYCKI, M.; SWITONSKI, M. No major effect of the leptin gene polymorphism on porcine production traits. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Oxford, v.121, p.149-155, 2004.

TERMAN, A. Effect of the polymorphism of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP) genes on litter size in Polish pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Oxford, v.122, p.400-404, 2005.

TIBAU, J.; PUIGVERT, X.; SOLER, J.; TRILLA, N.; DIESTRE, A.; GISPERT, M.; FERNÁNDEZ, J. & MANTECA, X. Incidencia de factores genéticos y de comportamiento en la eficiencia del crecimiento, la composición y la calidad de la canal y de la carne en distintas razas porcinas. In: **PROYECTO INIA SC95048**. 1997.

URBAN, T.; KUCIEL, J.; MIKOLÁSÓVÁ. Polymorphisms of genes encoding for ryanodine receptor growth hormone, leptin and MYC protooncogene protein and meat production in Duroc pigs. **Czech Journal of Animal Science**, Praha 2, v.47, p.411-417, 2002.

VISSCHER, P. R.; PONG-WONG, C.; WHITTEMORE, C.H. Impact of biotechnology on (cross) breeding programmes in pigs. **Livestock Science**, Bethesda, v.65, n.1-2, p.57, 2000.

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