

**JANE DE OLIVEIRA PEIXOTO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA  
E CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**JANE DE OLIVEIRA PEIXOTO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA  
E CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 30 de julho de 2004.

---

Prof. Paulo Sávio Lopes  
(Conselheiro)

---

Prof. Robledo Almeida Torres  
(Conselheiro)

---

Prof. Aldrin Vieira Pires

---

Prof. Martinho de Almeida e Silva

---

Prof<sup>ª</sup>. Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Orientadora)

À minha família pelo estímulo em todos os momentos, sobretudo nas horas de desânimo, pela compreensão, pelo tempo de ausência, pela atenção que não lhes foi devidamente dada, pelas datas que não pudemos comemorar e pelas alegrias e tristezas que não compartilhamos.

“Se não existissem os erros, a humanidade jamais saberia que a perfeição é Divina.”

## AGRADECIMENTO

A DEUS, por tudo e por todos que fazem parte da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Simone Eliza Facioni Guimarães, pela amizade, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão e pela grande ajuda.

Ao professor Martinho de Almeida e Silva, pelo suporte, pelas sugestões e pelo exemplo de ética e dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao professor Robledo de Almeida Torres, pela orientação na iniciação científica, pela consideração e também pelos ensinamentos e pelo apoio durante toda minha formação acadêmica.

Ao professor Paulo Sávio Lopes, pela disponibilidade, pelo apoio e pelas contribuições neste trabalho.

Ao professor e amigo Aldrin Vieira Pires, pela grande ajuda neste trabalho.

Aos professores Ana Lúcia, Bajá e Juquinha, pelos momentos de alegria e pela participação em minha formação acadêmica.

Ao meu pai, João Peixoto (*in memorian*), pelo seu eterno amor.

À minha mãe Edna, minha irmã Vânia, meu irmão João e minha sobrinha Milene, por tornarem minha existência mais feliz.

À tia Tininha, pelo acolhimento, pelo suporte e pelo amor, minha eterna gratidão.

Aos meus avós Sebastião (*in memoriam*) e Maria pelos ensinamentos.

Especial agradecimento aos amigos Danielle e Samuel, pelo carinho, simpatia, pelos momentos difíceis superados e por tantas alegrias vividas.

À velha-guarda do Labtec, Amauri, Fausto e Maria Amélia, pelos ensinamentos transmitidos e pela convivência agradável.

Aos amigos do LABTEC, Ana Paula, Bruna, Cristina, Cristiana, Daianny, Daniele Serra, Débora, Isabela, Júlio, Kleibe, Mário, Patrícia, Paulinha, Priscila e Virgínia pela vivência nestes anos.

Aos amigos de graduação e de sempre, Alex, Antonio, Bruno, Fabrício, Fernanda, Fred, George, Jú Precateira, Leidi, Lídson, Luciano, Mário, Mônica, Nini Precata, Polyana, Rafael, Ricardo, Tigrão, Vinícius, Will e aos demais amigos da ZOO 98.

Aos colegas do Melhoramento Animal, André, Adriana, Band, Claudinho, Eliana, Elizangela, Fernanda, Giselle, João, Júnior, Kécya, Lindemberg, Luciara, Marcos Vinícius, Marcelo, Paulinho, Peloso, Policarpo, Ricardinho e Urbano, pela convivência nestes anos.

Aos amigos, Aline, Ana Cláudia, Carla, Dani, Fernanda da cantina, Karla, Luana, Marcos, Lú, Rodrigo, Yve e Viviane, pelos bons momentos.

Aos amigos Gustavo, Rachel, Leandro e Rodolphinho pela amizade e pela ajuda durante a iniciação científica.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento Genético de Suínos/DZO, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial, Adilson, Edson, Celeste, Márcia, Monteiro, Raimundo, Rosana e Venâncio pelo apoio e agradável convívio.

Aos meus tios, primos e amigos, pelos momentos de carinho, amizade, muita alegria e tormenta.

## CONTEÚDO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Marcadores Genéticos Moleculares .....	3
2.2. Seleção Assistida por Marcadores.....	5
2.3. Delineamentos experimentais .....	7
2.4. Detecção de genes que controlam características quantitativas .....	8
2.4.1. Estudo de genes candidatos .....	9
2.4.2. Vantagens e limitações do uso de genes candidatos .....	10
2.5. Leptina .....	11
2.5.1. Ações da Leptina.....	12
2.5.2. Polimorfismos no gene da Leptina.....	16
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO I – ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM SUÍNOS</b> .....	<b>25</b>
<b>ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS ON THE LEPTIN CANDIDATE GENE AND PERFORMANCE TRAITS IN SWINE</b> .....	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
2.1. Obtenção dos dados e população de estudo.....	28
2.2. Banco de dados e características avaliadas .....	29
2.3. Extração de DNA .....	29
2.4. Polimorfismos estudados .....	30
2.5. Construção dos <i>primers</i> .....	30

2.6. Análise de restrição por PCR – RFLP .....	31
2.7. Análises estatísticas .....	32
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO II – ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, CORTES DE CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM SUÍNOS .....</b>	<b>43</b>
<b>ASSOCIATION OF LEPTIN CANDIDATE GENE POLYMORPHISMS AND CARCASS, CARCASS CUTS AND MEAT QUALITY TRAITS IN SWINE.....</b>	<b>44</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>46</b>
2.1. Obtenção dos dados e população de estudo.....	46
2.2. Banco de dados e características avaliadas .....	46
2.3. Polimorfismos e região estudada.....	49
2.4. Análises laboratoriais .....	49
2.5. Análises estatísticas .....	51
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
3.1. Análise de associação.....	53
3.2. Análise dos efeitos médios da substituição alélica e de dominância.....	64
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## RESUMO

PEIXOTO, Jane de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004.  
**Associação entre polimorfismos no gene candidato Leptina e características quantitativas em suínos.** Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães. Conselheiros: Paulo Sávio Lopes e Robledo de Almeida Torres.

Neste estudo investigou-se a associação entre polimorfismos no gene da Leptina e características quantitativas em suínos produzidos pelo cruzamento divergente entre machos da raça naturalizada brasileira Piau e matrizes comerciais. Foram avaliadas características de desempenho, carcaça, cortes de carcaça e qualidade da carne. Os polimorfismos detectados por seqüenciamento nos animais parentais foram reconhecidos pelas enzimas Pvu II, Dde I, Bam HI, Fok I e Hinf I, respectivamente nas posições do gene 798, 828, 2411, 3266 e 3469 pb. Apenas o polimorfismo T3469C estava localizado em região de *exon*; os demais polimorfismos se encontravam em regiões não-expressas do gene. Os genótipos para cada polimorfismo foram obtidos pela técnica de PCR-RFLP. Nas análises estatísticas de associação entre os polimorfismos e as características foi utilizado o modelo com efeitos fixos de genótipo, sexo, lote, interação genótipo x sexo e efeito aleatório de pai. Foram consideradas diferentes covariáveis para cada grupo de características. As médias dos genótipos foram comparadas pelo teste F ou t. Quando a interação genótipo x sexo foi significativa, realizou-se a comparação entre as médias dos genótipos dentro de sexo por meio do teste t. Os efeitos médios da substituição



alélica e os desvios da dominância dos genótipos foram determinados. O polimorfismo C798T apresentou associações com as características número total de tetas ( $p=0,02$ ), número de tetas esquerdas ( $p=0,03$ ), espessura de toucinho UL ( $p=0,06$ ), comprimento de intestino ( $p=0,02$ ) e peso total de carré ( $p=0,01$ ). O sítio polimórfico C828T esteve associado a variações nas características peso da banda direita ( $p=0,06$ ) e banda esquerda ( $p=0,06$ ), peso da copa limpa ( $p=0,07$ ), peso total de paleta ( $p=0,03$ ) e peso de bacon ( $p=0,03$ ). O polimorfismo T2411C esteve associado a variações nas características espessura de toucinho P2 ( $p=0,06$ ), peso de paleta limpa ( $p=0,06$ ), peso de copa ( $p=0,08$ ), peso do filezinho ( $p=0,01$ ) e peso do rim ( $p=0,01$ ). O polimorfismo T3266G apresentou associações significativas com as características idade ao abate ( $p=0,08$ ), espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar ( $p=0,07$ ), espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar ( $p=0,04$ ), espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar ( $p=0,07$ ), peso de costela ( $p=0,09$ ), peso de copa limpa ( $p=0,08$ ) e peso de bacon ( $p=0,04$ ). O polimorfismo T3469C apresentou associação com as características peso aos 21 ( $p=0,03$ ), 42 ( $p=0,05$ ), 63 ( $p=0,02$ ) e 77 dias de idade ( $p=0,04$ ), peso ao abate ( $p=0,03$ ), consumo de ração ( $p=0,01$ ), ganho de peso médio diário ( $p<0,01$ ), conversão alimentar ( $p<0,01$ ), comprimento de carcaça medido pelos métodos brasileiro ( $p=0,09$ ) e americano ( $p=0,04$ ), índice de vermelho ( $p=0,02$ ) e tonalidade da carne ( $p=0,03$ ). Foi observada a interação entre sexo e os genótipos para muitas características. Os efeitos médios da substituição alélica e os desvios da dominância foram determinados somente para os polimorfismos T828C e T2411C. Os resultados sugerem que os polimorfismos são potenciais marcadores para características produtivas de importância econômica como taxa de crescimento, consumo de ração e espessura de toucinho. No entanto, as associações foram detectadas em população experimental, sendo necessária a validação desses resultados em populações comerciais.

## ABSTRACT

PEIXOTO, Jane de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2004.  
**Association between leptin candidate gene polymorphisms and quantitative traits in swine.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães.  
Committee Members: Paulo Sávio Lopes and Robledo de Almeida Torres.

The association of polymorphisms in the porcine Leptin gene and quantitative traits in pigs produced by initial mating of native Brazilian boars and commercial sows was investigated. Performance, carcass, carcass cuts and meat quality traits were analyzed. The polymorphic sites detected by sequencing parental animals DNA were recognized by the enzymes Pvu II, Dde I, Bam HI, Fok I e Hinf I, respectively observed in the positions 798, 828, 2411, 3266 e 3469 pb. Only T3469C polymorphism was observed in exonic region; the other ones were observed at a not expressed region of Leptin gene. Genotypes were identified by PCR – RFLP. Association analyses were performed using a model that included genotype, sex, group and genotype x sex interaction as fixed effects and sire as random effect. Different covariates were assumed according to different trait groups. Genotypes means were compared by F test or t test. The existence of interaction between genotype and sex was evaluated and genotypes means were compared for each sex by t test. The polymorphism C798T was associated with variation in total number ( $p=0.02$ ) and left number of teats ( $p=0.03$ ), backfat thickness between last and last but one lumbar vertebrae ( $p=0.06$ ), intestine length ( $p=0.02$ ) and total loin

(bone-in) weight ( $p=0.01$ ). The polymorphic site C828T was associated with variation on right half carcass weight ( $p=0.06$ ), left half carcass weight ( $p=0.06$ ), boston shoulder weight ( $p=0.07$ ), picnic shoulder weight ( $p=0.03$ ) and bacon weight ( $p=0.04$ ). The polymorphism T2411C was associated with variation in backfat thickness after last rib, at 6.5 cm from the midline ( $p=0.06$ ), skinless and fatless picnic shoulder weight ( $p=0.06$ ), boston shoulder weight ( $p=0.08$ ), sirloin weight ( $p=0.01$ ) and kidney weight ( $p=0.01$ ). The polymorphism T3266G was associated with slaughter age ( $p=0.08$ ), backfat thickness after last rib, at 6.5 cm from the midline ( $p=0.07$ ), backfat thickness after last rib ( $p=0.04$ ), and backfat thickness between last and last but one lumbar vertebrae ( $p=0.07$ ), spareribs weight ( $p=0.09$ ), skinless and fatless boston shoulder weight ( $p=0.08$ ) and bacon weight ( $p=0.04$ ). The T3469C polymorphism was associated with weight at 21 ( $p=0.03$ ), 42 ( $p=0.05$ ), 63 ( $p=0.02$ ) and at 77 days of age ( $p=0.04$ ), slaughter weight ( $p=0.03$ ), feed intake ( $p=0.01$ ), average daily gain ( $p<0.01$ ), feed/gain ratio ( $p<0.01$ ), carcass length by the Brazilian carcass classification method ( $p=0.09$ ) and by the American carcass classification method ( $p=0.04$ ), redness ( $p=0.02$ ) and hue ( $p=0.03$ ). Association between genotype and sex was observed for many traits. Allelic substitution and dominance effects were estimated for polymorphisms T828C and T2411C. The observations suggest that these Leptin polymorphisms may be considered potential molecular markers for economically important production traits such as feed intake, growth rate and back fat in swine. However, associations need to be confirmed in commercial populations.

## 1. INTRODUÇÃO

Os últimos anos têm sido marcados por grandes avanços na pesquisa genômica, envolvendo desde o mapeamento genômico até a análise de expressão gênica e a manipulação de genomas, gerando informações promissoras para auxiliar o melhoramento genético e a produção animal. Atualmente a biotecnologia é uma realidade na agropecuária, e um exemplo disso é a procura de locos responsáveis por variações nas características quantitativas (Quantitative Trait Loci – QTLs). Experimentos para mapeamento de QTL estão sendo conduzidos em muitas espécies com o objetivo de identificar e mapear locos que poderão ser utilizados em programas de melhoramento pela seleção assistida por marcadores (MAS).

Inicialmente, havia expectativa exagerada em relação à aplicação das novas técnicas da genética molecular, tanto por parte de pesquisadores em todo o mundo quanto por parte da indústria. Acreditava-se que essas técnicas iriam revolucionar a agropecuária e o melhoramento genético, possibilitando mudanças muito rápidas nas características de importância econômica. Assim, a década de 1990 ficou marcada por enorme expansão do estudo da genética molecular, caracterizada principalmente pelo progresso no conhecimento dos genomas de várias espécies. Entretanto, observou-se que a identificação dos genes de interesse e, principalmente, a estimação de seus efeitos não são questões simples de se resolver. O grande entrave nas pesquisas é a natureza

quantitativa que governa a maioria das características produtivas, cuja expressão depende da ação e da interação de muitos genes entre si e com o ambiente. Dessa forma, é difícil isolar qualquer gene que tenha efeito significativo sobre a expressão da característica (Major gene).

Dentre as espécies de animais domésticos, a espécie suína é uma das que mais têm se beneficiado das novas técnicas moleculares. Um dos motivos que têm levado a investimentos na pesquisa do genoma dos suínos é a importância comercial da atividade suinícola (PEREIRA, 2000). Os suínos destacam-se como espécie de grande expressão comercial e econômica, sendo a carne suína a mais consumida no mundo, respondendo por cerca de 38% de toda a carne comercializada (<http://www.porkworld.com.br/porkworld>).

Outro fator que tem motivado o estudo do genoma de suínos é que esta espécie foi escolhida como modelo animal para o estudo de doenças humanas, apresentando potencial para utilização em xenotransplantes.

As duas principais formas de análise genômica abordadas no melhoramento animal visando ao mapeamento gênico são a identificação de QTLs por meio de estudos de associação envolvendo genes candidatos e a identificação de QTLs por meio de varreduras genômicas. A aplicação desses métodos resultou na identificação de vários genes e regiões genômicas que influem nas características de interesse econômico. Isso inclui a identificação de seqüências funcionais, genes candidatos e regiões de QTL, gerando dados que poderão ser incorporados na seleção genética dos animais.

Plastow (2000) relata que existem poucos marcadores genéticos em uso nos programas de seleção. Por outro lado, é grande o número de marcadores conhecidos e em fase de validação. Espera-se maior aplicação dessas técnicas no futuro próximo com avanços no conhecimento e no uso dos marcadores genéticos. A extensão dos impactos da genética molecular no melhoramento vai depender da efetividade, da praticidade e do custo operacional destas tecnologias, que podem viabilizar a sua aplicação nos sistemas produtivos.

Neste estudo, investigou-se a associação entre polimorfismos nucleotídicos no gene candidato Leptina e características quantitativas medidas em uma população de suínos F2, produzida por cruzamentos entre raças geneticamente divergentes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Marcadores Genéticos Moleculares**

Diante do grande e concentrado esforço no desenvolvimento de mapas genômicos para os animais domésticos, principalmente suínos, bovinos, ovinos e aves, o uso de marcadores moleculares no melhoramento animal vem se popularizando. O grande progresso e as inúmeras possibilidades do uso dos marcadores moleculares devem-se à implementação e ao uso conjunto de novas técnicas moleculares.

Os marcadores genéticos podem ser divididos em marcadores protéicos e isoenzimáticos e marcadores moleculares ou de DNA. Os marcadores moleculares surgiram em razão da necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares são seqüências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos. Uma característica importante dos marcadores é que podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética. Guimarães (2001) considera que as principais qualidades de um bom marcador são alto grau de polimorfismo, herança mendeliana e baixa taxa de mutação.

Dentre os tipos de marcadores moleculares com grande potencial para uso em programas de melhoramento estão: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – BOSTEIN et al., 1980), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – WILLIAMS et al. 1990), Microsatélites (LITT e LUTTY, 1989) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – VOS et al., 1995). Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

Quanto à posição em relação aos locos de características quantitativas (QTLs), os marcadores podem ser divididos em marcadores diretos e marcadores indiretos. Os marcadores diretos são os que estão posicionados dentro do loco de interesse, não havendo possibilidade de recombinação entre o marcador e o QTL. Já os marcadores indiretos são os que estão em desequilíbrio de ligação com os locos de interesse e, portanto, estão sujeitos a uma probabilidade de recombinação entre marcador e QTL. Essa probabilidade de recombinação aumenta quando o marcador está mais distante do QTL. De uma forma prática, Clutter (1998) classifica os polimorfismos dentro de genes candidatos como marcadores diretos, enquanto os marcadores microsatélites são considerados indiretos.

Segundo McCouth e Xiao (1998), os marcadores podem ajudar na estimativa do número de locos que controlam um fenótipo, na localização de cada loco, assim como na estimação da magnitude de seus efeitos. Os marcadores podem possibilitar a caracterização da ação gênica, dos efeitos pleiotrópicos e das interações epistáticas.

Marcadores moleculares de DNA têm ampla aplicação em estudos biológicos, na avaliação e caracterização de germoplasma, e em estudos de variabilidade e diversidade genética. Especificamente no melhoramento genético animal, os marcadores vêm permitindo o desenvolvimento de mapas genéticos, visando a seleção assistida por marcadores e a introgressão gênica. Eles também são utilizados na confirmação de pedigrees e estimativas da relação de parentesco entre indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Além disso, vêm encontrando novos campos de aplicação, como na rastreabilidade de animais ou nos testes de identidade de produtos específicos.

## 2.2. Seleção Assistida por Marcadores

Segundo Martinez et al. (2002), a seleção clássica é baseada no fenótipo do indivíduo e, em muitas situações, o fenótipo não é indicação precisa do genótipo, pois as características produtivas dependem da variação alélica em um grande número de locos, sendo a expressão gênica destes locos é altamente influenciada por fatores de ambiente.

Na genética quantitativa a seleção é realizada, de forma eficiente, sem o conhecimento do número de genes que atuam na característica de interesse e nem do efeito de cada um destes genes. De acordo com Montaldo e Meza-Herrera (1998), a seleção é baseada em modelo simplificado da ação gênica, em que se enfatiza a média dos efeitos gênicos (efeito aditivo). Assim, o valor genético do indivíduo é estimado usando para isso informações fenotípicas do próprio indivíduo ou de seus parentes.

Os métodos quantitativos levaram à obtenção de animais de alta produtividade. Contudo, algumas características ainda têm seus ganhos potenciais limitados por deficiências nos métodos de seleção, pois a eficiência dos métodos quantitativos decresce diante de características de difícil mensuração, características de baixa herdabilidade, características de expressão tardia na vida do animal, características limitadas ao sexo ou características com correlação genética desfavorável (MONTALDO e MEZA-HERRERA, 1998).

A incorporação de informações oriundas de marcadores genéticos em programas de melhoramento constitui o método conhecido por seleção assistida por marcadores (Marker Assisted Selection – MAS). Nesse tipo de seleção, os indivíduos que possuem alelos favoráveis para os genes que controlam as características em questão seriam selecionados com base na avaliação direta de seu DNA. Os marcadores moleculares permitem a determinação direta do genótipo, sem grande interferência do ambiente. Quando se utilizam marcadores moleculares, busca-se maior aproximação entre fenótipo e genótipo (COUTINHO, 1998).

Em teoria, esses procedimentos podem aumentar as taxas de ganho genético por meio do aumento na acurácia da seleção e redução do intervalo



de gerações, permitindo a seleção precoce dos genótipos superiores, assim como em animais cujo sexo não permite a expressão da característica, ou para características que dependem do abate do animal para serem mensuradas (VISSCHER, 1998).

Hays (2003) considera que a implementação da seleção assistida por marcadores pode ser dividida em quatro passos: busca de marcadores genéticos; estabelecimento de mapas de ligação; detecção de associação entre os marcadores e as regiões que influem nas características quantitativas; e implementação dos marcadores nos programas de melhoramento animal.

De acordo com Davis e Denise (1998), na fase de avaliação, os marcadores são testados em populações-alvo para determinar se o QTL está segregando nestas populações. Na fase de implementação, os marcadores são utilizados dentro e entre famílias, a fim de gerarem um banco de dados genotípicos que serão então combinados com as informações fenotípicas e de pedigree na avaliação do mérito genético dos indivíduos dentro de uma população.

Plastow (2000) afirma que vários testes utilizando a genética molecular já estão sendo usados pela indústria de suínos, incluindo os de paternidade, qualidade de carne, tamanho de leitegada, cor de pele, crescimento, carcaça, espessura de toucinho, gordura intramuscular e resistência a doenças.

Alguns exemplos de marcadores moleculares com aplicação comercial são: receptor de estrogênio em suínos, associado à alta prolificidade; receptor de rianodina, associado à alta capacidade de desenvolvimento muscular e pior qualidade de carne; musculatura dupla em bovinos; além de marcadores para algumas doenças em várias espécies animais. O contínuo avanço da pesquisa na área de marcadores moleculares deverá proporcionar número crescente de marcadores, que poderão ser utilizados em programas de melhoramento animal (COUTINHO, 1998).

Segundo Freitas (2000), os programas de melhoramento genético deverão aliar os métodos quantitativos à seleção assistida por marcadores. Ainda segundo este autor, a aplicação da genética molecular irá possibilitar mudanças mais rápidas nas características economicamente importantes.

### 2.3. Delineamentos experimentais

Martinez (2001) apresenta grande número de delineamentos experimentais e de metodologias estatísticas para detectar genes que influem nas características quantitativas, com o auxílio de marcadores moleculares. A maioria dos estudos realizados para a detecção de QTLs tem sido baseada em populações experimentais resultantes de cruzamentos planejados. De acordo com Churchill e Doerge (1998), uma população experimental é obtida pelo cruzamento entre linhagens parentais consangüíneas.

Liu (1998) considera que o delineamento dos acasalamentos, em genética de populações e quantitativa, é feito para simplificar o fracionamento e a interpretação dos componentes de variância genética, esclarecendo a interpretação genética e a análise de dados genômicos.

A criação de uma população para pesquisa genômica envolve a escolha dos parentais e a determinação do tipo de acasalamento. Os parentais de uma população para mapeamento devem apresentar variação na seqüência de DNA e no fenótipo das características de interesse. Se os pais têm grande variação fenotípica nas características, então é grande a chance de existir variação genética. Os tipos de acasalamento mais comumente usados são F2 e retrocruzamento (LIU, 1998).

Segundo Andersson et al. (1998), o delineamento F2 consiste no cruzamento de duas linhagens ou raças parentais geneticamente divergentes, no qual se espera que grande parte dos alelos esteja fixada ou próxima de fixação. Desse cruzamento são obtidas a geração F1, com indivíduos altamente heterozigotos, e, por meio do intercruzamento de indivíduos F1, a geração F2.

De acordo com Guimarães e Lopes (2000), nos projetos de mapeamento genômico de suínos tem sido utilizado cruzamento entre raças comerciais e raças naturalizadas ou selvagens. Nos EUA, as raças chinesas têm sido utilizadas, enquanto as equipes européias têm usado o porco selvagem europeu em seus cruzamentos divergentes.

Segundo Andersson et al. (1998), a estratégia do intercruzamento de linhagens divergentes de animais domésticos, adaptados a diferentes

condições ambientais ou sistemas de produção, proporciona oportunidade única para mapeamento de locos de características fenotípicas. Estes autores apresentaram como vantagens do cruzamento entre populações divergentes a segregação dos alelos de grande efeito e o aumento do poder nas análises estatísticas, em razão da alta heterozigose dos QTLs. Para eles, a grande limitação do uso do cruzamento divergente é de que os QTLs encontrados podem não ser responsáveis por variações genéticas na população comercial.

De acordo com Guimarães (2001), o mapeamento de QTLs em animais comerciais também tem sido feito por meio de pedigrees comerciais, porque estes possuem vastos dados experimentais. Nesse caso, como a variação fenotípica é pequena, qualquer QTL encontrado é de grande efeito. A grande vantagem do uso de pedigrees comerciais é que os QTLs detectados são aplicados mais facilmente aos programas de melhoramento. Contudo, uma limitação desse tipo de mapeamento é a baixa variabilidade genética e fenotípica nestas populações. Assim, grande número de animais é exigido nas análises. Paterson (1998) afirma que, no mapeamento molecular de germoplasmas elites, em muitas espécies, há dois desafios principais. O primeiro seria pelo fato de os níveis de polimorfismo de DNA serem baixos nessas populações, o que dificulta a detecção de locos marcadores para os quais os genótipos carreguem diferentes alelos. Outro desafio seria a inexpressiva variação fenotípica, em razão de os genótipos elites serem freqüentemente selecionados para um grupo comum de critérios. Esse autor argumentou que esses desafios são evidências da necessidade de se usar germoplasma exótico na ampliação das bases genéticas das espécies comerciais, a fim de facilitar o mapeamento molecular.

#### **2.4. Detecção de genes que controlam características quantitativas**

As grandes metas dos estudos de marcadores moleculares são mapear e, ao mesmo tempo, manipular locos associados com a expressão das características qualitativas e quantitativas (GUIMARÃES e EUCLYDES, 1997).

Segundo Rothschild e Soller (1999), os métodos de identificar genes que controlam características incluem o método geral de busca de QTL (genome

scan) e a análise de genes candidatos. Mapeamento de QTL é basicamente uma inferência genômica do relacionamento entre os valores fenotípicos das características quantitativas e os genótipos do QTL. Esse relacionamento inclui número e posição dos QTL, além de seus efeitos, interação dentro dos alelos do QTLs (dominância) e entre os alelos de locos de QTL (epistasia), além de efeitos pleiotrópicos e interação com o ambiente.

#### **2.4.1. Estudo de genes candidatos**

Rothschild e Soller (1999) definem genes candidatos para dada característica como genes seqüenciados, cuja ação biológica seja conhecida e que estejam envolvidos no desenvolvimento ou na fisiologia da característica considerada. Esses genes podem ser estruturais ou de uma via regulatória ou bioquímica, que influem na expressão da característica. Uma vez comprovado que o gene candidato está explicando proporção significativa da expressão da característica, este passa a ser considerado major gene. De Vries et al. (2000) consideram que um major gene deve imprimir diferença igual ou superior a um desvio fenotípico entre os valores médios da característica entre indivíduos homocigotos para o gene, em relação à média daqueles que não são portadores.

Três metodologias de estudo podem ser usadas na escolha do gene candidato: fisiológica, comparativa e posicional. A metodologia fisiológica é baseada no conhecimento biológico e fisiológico do sistema estudado. A estratégia comparativa toma como ponto de partida locos em que polimorfismos são conhecidos por apresentarem efeito fenotípico em uma espécie e os exploram como candidatos em outras. Na metodologia posicional, o ponto de partida para a escolha do gene é uma região identificada por varredura genômica (CLUTTER, 1999).

Os principais passos no desenvolvimento de genes candidatos seriam a escolha dos genes, a obtenção dos *primers* para amplificar o gene, busca dos polimorfismos, desenvolvimento de técnicas práticas de genotipagem em larga escala e a busca de associações entre o gene candidato e a característica fenotípica. Os efeitos dos genes candidatos podem ser identificados por meio

de testes de associação, examinando o efeito dos diferentes alelos, como os determinados por um único sítio polimórfico, ou como haplótipos que possuem vários sítios polimórficos. Isso é feito usando modelos lineares, em que os efeitos fixos são os alelos ou os genótipos (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999).

Os marcadores presentes em genes candidatos podem se encontrar em três fases visando ao uso em programas de seleção assistida por marcadores (MAS): desenvolvimento, validação e a fase final de implementação do marcador no contexto econômico do sistema de produção.

#### **2.4.2. Vantagens e limitações do uso de genes candidatos**

Santos (2002) considera como vantagens da metodologia dos genes candidatos o grande poder estatístico obtido com menor número de famílias e indivíduos em relação às varreduras genômicas (genome scans); a aplicação em populações comerciais, dispensando o conhecimento do pedigree dos animais avaliados, podendo também ser aplicada em cruzamentos de linhagens divergentes; o custo mais baixo, após a identificação dos polimorfismos; a estabilidade do gene candidato sobre a característica; e a aplicação imediata em programas de melhoramento animal.

Entre as limitações dessa abordagem estariam os altos custos iniciais e a necessidade do conhecimento prévio do gene, incluindo o mecanismo de ação de seu produto. No entanto, grande parte das limitações no estudo dos genes candidatos se deve à natureza poligênica que governa a maioria das características produtivas. Assim, há dificuldades na diferenciação do efeito do gene candidato e do efeito de outros genes ligados, sujeitos a uma probabilidade de recombinação. Outro grande problema é a possibilidade de interação entre esses poligenes. Essa interação pode ser de dominância, quando ocorre entre genes de um mesmo loco, ou interações epistáticas quando envolve genes em diferentes locos. Além da interação entre os genes, também há o efeito da interação desses genes com o ambiente. Diante dessas interações, um resultado encontrado ao ser estudada determinada raça não deve ser extrapolado para outras raças, pois a expressão gênica pode variar

consideravelmente entre grupos genéticos distintos (MONTALDO e MEZA-HERRERA, 1998).

Para Muir (1999), algumas limitações em relação aos genes candidatos seriam a frequência dos alelos favoráveis, que podem ser raros em populações altamente selecionadas, e a existência de efeito pleiotrópico negativo.

Montaldo e Meza-Herrera (1998) consideram que um aspecto fundamental para o uso eficiente de genes candidatos na seleção assistida por marcadores (MAS) seria a estimação precisa do efeito e da frequência alélica do marcador. Assim, o acúmulo de estudos sobre a mesma região permite verificar a consistência do efeito de um loco de características quantitativas, distinguindo se o efeito é real ou apenas uma associação falso-positiva.

Apesar das limitações, os dados obtidos sugerem que os genes candidatos serão poderosa ferramenta para o melhoramento, especialmente em se tratando de características de baixa herdabilidade, limitadas ao sexo e de difícil mensuração, como características reprodutivas, de qualidade da carne e de resistência a doenças.

## **2.5. Leptina**

A Leptina é um hormônio protéico sintetizado principalmente no tecido adiposo, embora também possa ser sintetizado em pequenas quantidades no epitélio intestinal, na placenta e no músculo esquelético (INGVARTSEN e BOISCLAIR, 2001).

Ela age como sinal de saciedade no hipotálamo, atuando sobre o peso corporal e o balanço energético. Esse hormônio ainda influencia a expressão e a secreção de múltiplos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios hipotalâmicos (BARB et al., 2001). Assim, a Leptina modula a expressão de muitos hormônios importantes no desenvolvimento da capacidade produtiva dos animais. Inúmeros fatores metabólicos, endócrinos e ambientais influenciam a produção da Leptina, incluindo a alimentação, a insulina, os glucacorticóides, o hormônio do crescimento (GH) e a testosterona. Esses fatores regulam a transcrição do gene da Leptina nos adipócitos. Por meio do seu receptor, a Leptina influencia diferentes vias metabólicas, atuando sobre a

variação fenotípica de características bastante diferenciadas, como crescimento, reprodução, lactação, resposta imune e formação de ossos. Em razão das funções fisiológicas desempenhadas, o gene da Leptina pode ser considerado como gene candidato que influencia características produtivas em suínos.

O receptor da Leptina (Ob-R) possui alta afinidade para ligar-se a esse hormônio. Mutações no Ob-R resultam em fenótipo obeso idêntico aos camundongos que sofreram mutação no gene da Leptina (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Estudo desse receptor em diferentes tecidos mostrou que ele existe em múltiplas formas, com seqüência extracelular comum e uma porção citoplasmática de comprimento variável. Por meio do splicing alternativo do mRNA do gene Ob-R, são codificadas as isoformas Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re e Ob-Rf. Todas as elas apresentam idêntico domínio de ligação extracelular (HOUSENECKT et al., 1998). A função das isoformas ainda não está clara; aparentemente, estão envolvidas no transporte da Leptina e na barreira entre o cérebro e o sangue (FRIEDMAN e HALAAS, 1998).

### **2.5.1. Ações da Leptina**

A identificação da proteína Leptina, que é secretada pelas células do tecido adiposo em resposta às mudanças no peso corporal ou balanço energético, tem sido relacionada com a regulação da ingestão de alimentos, a energia despendida e o eixo neuroendócrino em roedores e humanos (BARB et al., 2001).

Segundo Schubring et al. (2000), a descoberta do gene da Leptina e da Leptina, seu produto, ofereceu nova visão para o controle da reserva de gordura do corpo, por meio da regulação da ingestão alimentar e coordenação do metabolismo do sistema nervoso autônomo. De acordo com esses autores, o nível de Leptina indica a quantidade de massa gordurosa do corpo ao cérebro. Portanto, esse hormônio parece desempenhar papel-chave no controle do estoque de gordura do corpo por regulação coordenada, envolvendo comportamento alimentício, taxa metabólica e balanço energético corpóreo.

De acordo com Ahima et al. (1996), a regulação do sistema neuroendócrino durante a fome pode ser o papel fisiológico principal da Leptina. Um dos principais efeitos desse hormônio é a inibição da síntese e da liberação do neuropeptídeo -Y (NPY). Ao contrário da Leptina, o NPY é um potente estimulador da ingestão alimentar e inibidor da secreção das gonadotrofinas.

A Leptina age no hipotálamo para controlar, além da ingestão de alimentos, a termogênese e a ação da insulina, por regulação da expressão e secreção de múltiplos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios hipotalâmicos, incluindo neuropeptídeo-Y (NPY), galanina (GAL), hormônio de concentração da melanina (MCH), hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH), hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio de liberação do hormônio do crescimento (GHRH), somatostatina (SS) e hormônio de liberação do TSH (TRH). Ela também regula positivamente a neurotensina (NT); além disso, modula o hormônio luteinizante (LH), o hormônio de crescimento (GH), a prolactina (PRL) e o hormônio estimulador da tireóide (TSH). Também aumenta a oxidação de ácidos graxos e regula de modo positivo a UCP2 e 3 no músculo esquelético e no pâncreas. A síntese de cortisol é inibida por tratamentos com Leptina (BARB et al., 2001). Na Figura 1, estão apresentadas algumas ações da Leptina.

Além dos efeitos no metabolismo de gordura (HOUSEKNECHT et al., 1998), a Leptina tem sido relacionada também com a regulação da função imunológica e hematopoese (BARB et al., 2001). Schubring et al. (2000) consideram-na um sinal molecular de permissão para a indução da puberdade. Recentemente, foi relatado mais um efeito pleiotrópico da Leptina: Elefteriou et al. (2004), caracterizaram-na como um poderoso inibidor da formação dos ossos in vivo. Em razão dos seus efeitos pleiotrópicos variados e funções fisiológicas importantes, o gene da Leptina pode ser considerado como candidato, que influencia características de importância econômica em suínos, como ganho de peso, conversão alimentar, composição da carcaça e características reprodutivas.



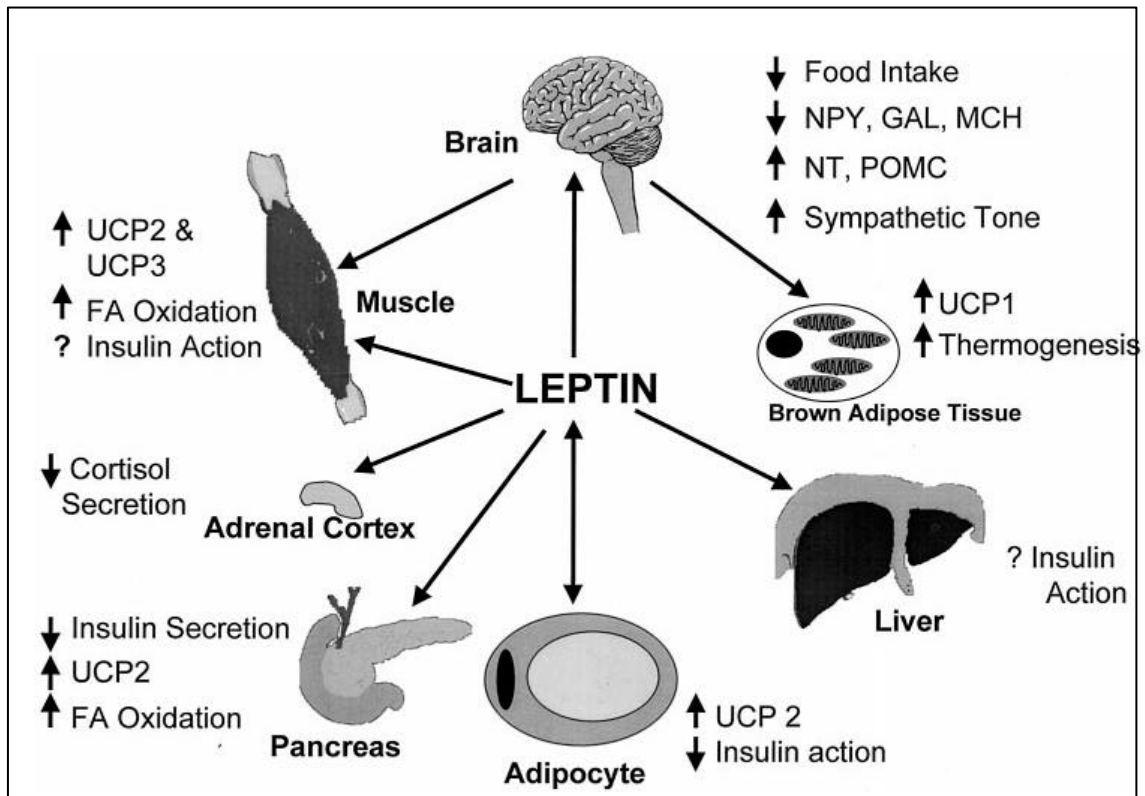


Figura 1 – Ações do hormônio protéico Leptina (BARB et al.,2001).

O gene da Leptina foi primeiramente caracterizado em suínos por Bidwell et al. (1997); esses autores observaram que o gene consiste de três *exons* e dois *introns*, sendo a região codificadora formada pelo segundo e terceiro *exons*. A Figura 2 apresenta o esquema do gene OB de suínos.

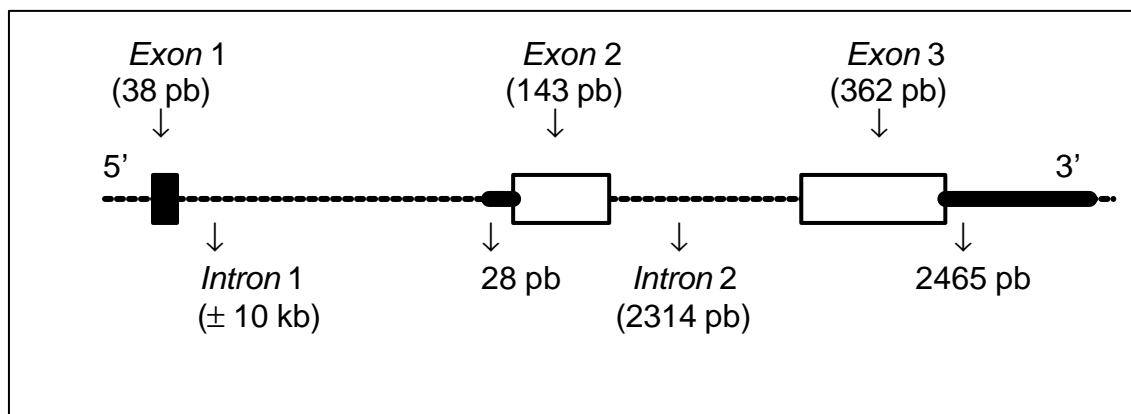


Figura 2 – Esquema do gene OB de suínos, baseado na descrição de Bidwell et al. (1997).

O gene da Leptina, assim como seu produto, apresenta alta homologia entre as espécies. Ramsay et al. (1998), comparando a seqüência do cDNA de

suínos com as seqüências de cDNA de humanos, de ratos e de bovinos, encontraram, respectivamente, 85%, 88% e 92% de homologia.

Neuenschwander et al. (1996) observaram que, em suínos, o gene da Leptina está localizado no cromossomo 18, como apresentado na Figura 3; em seu grupo de ligação estão o gene do neuropeptídeo Y (NPY), o gene do hormônio de liberação do GH (GHRHR), o gene da proteína 3 ligadora do IGF(IGFBP3), o gene do canal de cloro do músculo esquelético (CLCN1) e o gene de uma das subunidades da proteína CAP (CAP2A2).

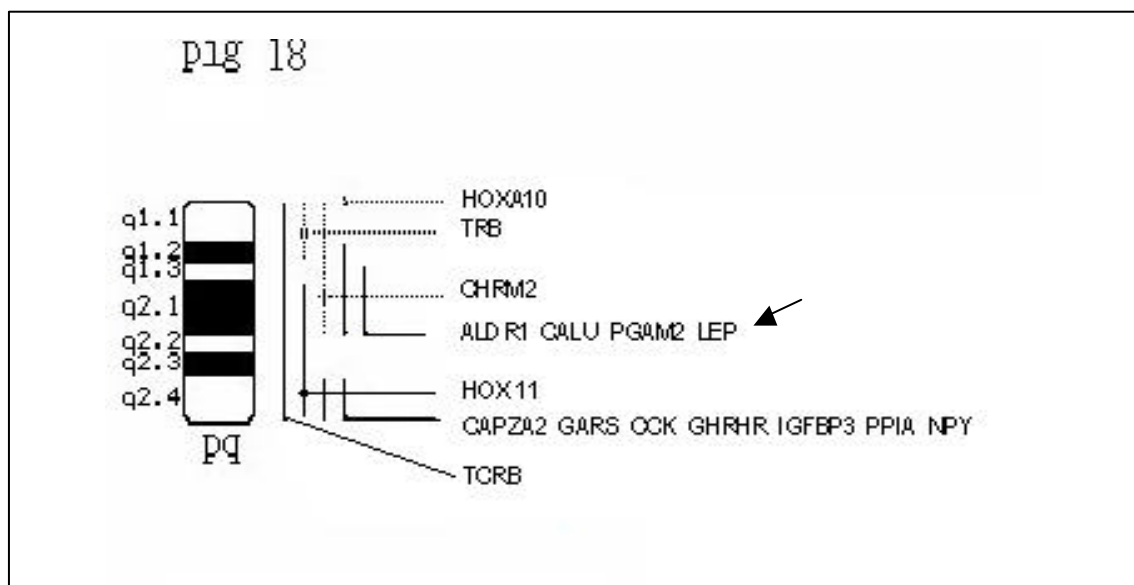


Figura 3 – Genes mapeados no cromossomo 18 de suínos (SSC 18). A seta indica a posição do gene da Leptina (<http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmmap.htm>, acessado em 05/06/04).

Gong et al. (1996), estudando a região 5' não traduzida do gene da Leptina de humanos, constataram potenciais elementos regulatórios: CEBP e CCAAT (regiões de ligação protéica), elementos de respostas a glucocorticóides (GRE) e elemento de resposta ao AMPc (CREB). Esse fato confirma que o gene da Leptina está sobre um complexo controle regulatório, o que reflete sua importância fisiológica.

A expressão do gene da Leptina é controlada por vários fatores metabólicos, endócrinos e ambientais. Glicocorticóides e insulina são potentes estimuladores da expressão da Leptina. Já os  $\beta$  - adrenergéticos, AMPc,

hormônio do crescimento (GH), hormônios tireoidianos, baixas temperaturas e jejum atenuam a expressão da Leptina. A expressão da Leptina está sob o efeito do sexo e do ciclo circadiano e altamente relacionada com a gordura corporal e com o tamanho dos adipócitos (HOUSEKNECHT et al., 1998). Ramsay et al. (1998), verificaram que a expressão do gene da Leptina variava significativamente com a deposição da gordura.

A proteína Leptina apresenta meia-vida curta, sendo em humanos de aproximadamente 25 minutos. Os níveis plasmáticos de Leptina são mantidos constantes, sugerindo que ela seja secretada continuamente pelos adipócitos, sendo sua velocidade de remoção igual à taxa de produção. Pouco é conhecido sobre a interação da Leptina com proteínas de transporte. No entanto, sabe-se que a Leptina circula na corrente sanguínea ligada a proteínas séricas, que podem regular sua meia-vida e sua atividade biológica, e uma dessas proteínas de transporte é a forma solúvel do receptor da Leptina (HOUSEKNECHT et al., 1998). Sinha et al. (1996) verificaram que esse hormônio se liga de maneira reversível às macromoléculas circulantes específicas. Estes autores constataram que, em indivíduos magros com menos de 21% de gordura corporal, 60 a 98% da Leptina total estava na forma ligada. Estes estudos sugerem que em indivíduos obesos a maioria da Leptina circulante esteja na forma livre, sendo os indivíduos obesos resistentes a esse hormônio.

### **2.5.2. Polimorfismos no gene da Leptina**

O gene da Leptina, assim como a proteína, já foi bastante estudado em humanos e roedores. Entretanto, são poucos os estudos envolvendo polimorfismos neste gene e a variação nas características produtivas ou na expressão da Leptina.

Liefers et al. (2002) estudaram a associação entre dois polimorfismos de RFLP e um polimorfismo de microssatélite no gene da Leptina e as características produção de leite, peso vivo, consumo alimentar, balanço energético e fertilidade em vacas holandesas. Foi encontrada associação ( $p < 0,05$ ) dos genótipos RFLP-1 e produção de leite, consumo alimentar,

proteína total e lactose total. Os genótipos para o marcador RFLP-2 tenderam ( $p < 0,10$ ) a apresentar associação com teor de lactose no leite e ganho de peso. Já os genótipos BM 1500 apresentaram tendência de associação com o teor de lactose.

Lagonigro et al. (2003) estudaram em bovinos a associação dos polimorfismos C103T, C126G, A252T e C305T no *exon* dois e do polimorfismo C140T no *exon* três do gene da Leptina de bovinos, bem como o consumo alimentar e a deposição de gordura. Foram genotipados 169 animais de uma população formada pelo cruzamento inicial de matrizes da raça Holandesa com touros da raça Charolesa. Foi encontrada associação entre o polimorfismo A252T e consumo alimentar ( $p < 0,05$ ); sendo que os indivíduos com o genótipo heterozigoto apresentavam acréscimo de 19% no consumo de ração em relação aos animais do genótipo AA. Os genótipos desse mesmo polimorfismo também estavam associados ao conteúdo de gordura intramuscular ( $p < 0,001$ ).

Stratil et al. (1997) detectaram diferentes alelos em suínos para um polimorfismo na posição 3469, localizado no terceiro *exon* do gene da Leptina, reconhecido pela enzima de restrição Hinf I. São eles o alelo T, que não era reconhecido pela enzima, e o alelo C, que sofria o corte pela enzima. Assim, após a genotipagem de 7 animais da raça Meishan, 14 Large White, 12 Landrace, 6 Pietran, 7 Black Pied Poestice, 6 Hampshire e 11 Czch Meat Pig, esses autores observaram que o alelo C estava fixado nos animais da raça Meishan e o alelo T estava próximo da fixação nas outras raças estudadas.

Borges et al. (1998), estudando o mesmo polimorfismo investigado por Stratil et al. (1997), genotiparam 22 animais Landrace, 49 Large White, 20 Pietran, 8 Piau, 8 Monteiro e 31 animais SRD e observaram maior frequência do alelo C na raça Piau, sugerindo que este alelo estaria associado ao acúmulo de gordura.

Jiang e Gibson (1999) avaliaram quatro polimorfismos envolvendo as substituições C/T, A/G, C/T e G/T, respectivamente nas posições 867, 1112, 3469 e 3714. Foram genotipados 29 animais da raça Duroc, 29 Hampshire, 30 Landrace, 32 Large White e 30 animais da raça chinesa Erhualian. Os três últimos polimorfismos mudaram o sítio de reconhecimento para as enzimas de restrição Taq I, Hinf I e Pst I, respectivamente. Os autores sugeriram uma

possível associação entre o polimorfismo T3469C e a deposição de gordura na raça Large White ( $P=0,0017$ ).

Kennes et al. (2001), estudando os polimorfismos A2845T, T3996C, G2728A e T3469C nas raças Duroc, Landrace e Yorkshire, encontraram associação entre o polimorfismo T3469C ( $p=0,0078$ ) e o consumo alimentar na raça Landrace e também observaram que a variante C estava negativamente associada a esta característica. Também foi observada associação entre o polimorfismo A2845T e o consumo alimentar e a idade para atingir 100 kg.

Szydlowski et al. (2004), avaliando a associação do polimorfismo T3469C com características produtivas nas raças polonesas Large White, Landrace e numa linha sintética, não consideraram o gene da Leptina como um major gene que influencia as características estudadas. Contudo, esses autores encontraram a associação entre o polimorfismo T3469C e conteúdo de gordura intramuscular ( $p < 0,05$ ) na raça Large White e peso de lombo ( $p < 0,01$ ) na linha sintética.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, R.S., PRABAKARAN, D., MANTZOROS, C., LOWELL, B., MARATOS-FLIER, E., FLIER, J. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v.382, p.250–252, 1996.
- ANDERSSON, E. L., MARKLUND, L., LUNDSTRÖM, K., HALEY, C., ANDERSSON, K., HANSSON, I., MOLLER, M., ANDERSSON, L. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a Wild Boar x Large White intercross. **Journal Animal Science**, v.76, p. 694 – 700, 1998.
- BARB, C. R., HAUSMAN, G. J., HOUSECKNECHT, K. L. Biology of Leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 297 – 317, 2001.
- BIDWELL, C. A., J. I, S., FRANK G.R., CORNELIUS, S.G., WILLIS, G.M., SPURLOCK. M. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Animal Biotechnology**, v.8, n.2, p.191 – 206, 1997.
- BORGES, G. S. N., SANTANA, B. A. A., FRANCO, M. M., BORGES, M., ANTUNES, R. F., GOURLART, L. R. Determinação das freqüências alélicas do gene da obesidade em diferentes raças suínas. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n.3, p. 89, 1998.
- BOSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314 – 331, 1980.

- CHURCHILL, G. A., DOERGE, R. W. Mapping quantitative trait loci in experimental population. Paterson, A. In: **Molecular Dissection of Complex Traits**, p. 31 – 41, 1998.
- CLUTTER, A. C. Molecular markers and pig breeding programs. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 1998, Uberaba. **Anais...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 1998.
- COUTINHO, L. L. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: **Curso: Técnicas de biologia molecular aplicadas à produção animal**. São Carlos, SP. p. 4 – 15, 1998.
- DAVIS, G. P, DeNISE, S. K. The impact of genetic markers in selection. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2331 – 2339, 1998.
- De VRIES, A. G., FAUCITANO, L., SOSNICKI A., PLASTOW, G. S, The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. **Food Chemistry**, v. 69, p. 397 – 405, 2000.
- ELEFTERIOU, F., TAKEDA, S., EBIHARA, K., MAGRE, J., PATANO, N., AE KIM, C., OGAWA, Y., LIU, X., WARE, S. M., CRAIGEN, W. J., ROBERT, J. J., VINSON, C., NAKAO, K., CAPEAU, J., KARSENTY, G. Serum Leptin level is a regulator of bone mass. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v.101, n. 9, p. 3.258 – 3.263, 2004.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares**, 2ª edição, Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, 219p. 1996.
- FRIEDMAN, J. M., HALAAS, J. Leptin and the regulation of the body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 6231 – 6235, 1996.
- GONG, D. W., PRATLEY, R. E., WEINTRAUB, B. D. Genomic structure and promoter analyses of the human *Obese* gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 3.971 – 3.974, 1996.
- GUIMARÃES, S. E. F. e EUCLYDES, R. F. Uso de marcadores genômicos na seleção e na reprodução animal. I Fórum Nacional de Equideocultura In: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG. v. 21, p. 83 – 89, 1997.

- GUIMARÃES, S. E. F., LOPES, P. S. Uso de populações divergentes para detecção de QTLs em suínos. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, **Anais...** Belo Horizonte, MG: SBMA, p.110 – 114, 2000.
- GUIMARÃES S.E.F. Análises de Marcadores Genômicos e Detecção de QTLs e Genes Candidatos em Melhoramento Animal. In: Pereira, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, p. 383 – 419. 2001.
- FREITAS, R. T. F. Perspectiva do melhoramento de suínos no Brasil. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, **Anais...** Belo Hbrizonte, MG: SBMA, 2000, p.105 – 109.
- HAYS, B, GODDARD, M.E. Evaluation of marker assisted selection in pig enterprises. **Livestock Production Science**, v. 81, p. 197 – 211, 2003.
- HOUSEKNECHT, K. L., BAILE, C. A., MATTERI, R. L., SPURLOCK, M. E. The biology of Leptin: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1.405 – 1.420, 1998.
- INGVARTSEN, K. L, BOISCLAIR, T. R. Leptin and the regulation of food intake, energy, homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 215 – 250, 2001.
- JIANG, Z. H, GIBSON, J. P. Genetic polymorphism in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, 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**, v.32, p. 215 – 218, 2001.
- LAGONIGRO, R., WIENIER, P., PILLA, F., WOOLLIAMS, J. A., WILLIAMS, J. L. A new mutation in the coding region of the bovine Leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, v. 34, p. 371 – 374, 2003.
- LITT, M., LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398 – 401, 1989.



- LIU, B.H. Computacional tools for study of complex traits. In: **Molecular Dissection of Complex Traits**. Editor: Paterson, A. H., CRC Press, Nova York. P. 43-80, 1998.
- MCCOUTH, S. R, XIAO, J. Prospects for the utilization of genome analysis to enhance the world food supply. Paterson, A. In: **Molecular Dissection of Complex Traits**. Editor: Paterson, A. H., CRC Press, Nova York. P. 267 – 279, 1998.
- MARTINEZ, M. L. Delineamentos experimentais para a detecção de locus de Características Quantitativas (QTL) em animais. Em: Regitano, L. C. A.; Coutinho, L. L. **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica p. 62 – 78, 2001.
- MARTINEZ, M. L., MACHADO, M. A., FERREIRA, A. M. Biotecnologia na pecuária: genética molecular. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, Maio v. 21, n. 204, p. 67 – 78, 2002.
- MONTALDO, H. H., MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, 1998.
- MUIR, W. M. Molecular Genetics in Poultry breeding. In. Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento animal. **Anais...**, Viçosa, MG, Brasil. P. 243 – 267, 1999.
- NEUENSCHWANDER, S., RETTENBERGER, G., MEIJERINK, E., JÖRG, H., STRANZINGER, G. Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to chromosome 18 by somatic cell hybrids. **Animal Genetics**, v.27, p. 275-278, 1996.
- PATERSON, A.H. Of Blending, Beans and Bristles: The foundation of QTL Mapping. In: Paterson, A.H. **Molecular Dissection of Complex Traits**. New York: CRC Press, p. 1-10. 1998.
- PEREIRA, A. F. Melhoramento genético de suínos. h: Reunião Anual da SBZ, 37, **Anais...**, Viçosa, SBZ, p. 9 – 15. 2000.

- PLASTOW, G. S. Molecular genetics in the swine industry. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3., 2000, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, p. 21 – 30, 2000.
- RAMSAY, T. G., YAN, X., MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **The Journal of Animal Science**, v.76, p. 484 – 490, 1998.
- ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1999, Viçosa. **Anais...**Viçosa: p. 219 – 242, 1999.
- SANTOS, I. K. F.M. Polimorfismos do sistema imunológico e sua aplicação no melhoramento animal para resistência a doenças infecciosas e parasitárias. Em: Regitano, L. C. A e Coutinho, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p 41 – 60, 2001.
- SCHUBRING, C., BLUM, W. F., KRATZSCH, J., DEUTSCHER, J., KIESS, W. Leptin, the ob gene product, in female health and disease. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproduction Biology**, v. 88, p. 121 – 127, 2000.
- SINHA, M. K., OPENTANOVA, I., OHANNESIAN, J. P., HEIMAN, M. L, BOWSHEER, 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**, v. 98, n. 6, p 1.277 – 1.288, 1996.
- STRATIL, A., PEELMAN, L., POUCKE, G. A., CEPICA, S. A *Hinf*I PCR-RFLP at the porcine Leptin (LEP) gene. **Animal Genetics**, v.28, p. 371 – 372, 1997.
- SZYDLOWSKI, B. M., STACHOWIAK, M., MACROWISK, M., KAMYCZEK, M., ECKERT, R., ROZICKI, M., SWRRONSKI, M. No major effect of the Leptin gene polymorphism on porcine production traits. **Journal of Animal Breeding**, v.124, p. 149 – 155, 2004.

VISSCHER, P. M., HALEY, C.S. Utilizing genetic markers in pig breeding programs. **Animal Breeding Abstracts**, v. 63, p. 1 – 8, 1998.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., RIJANS, M., VAN DER LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., ZABEAU, M. A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p. 4.407 – 4.414, 1995

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**. v.18, p. 6.531 – 6.535, 1990.

<http://www.porkworld.com.br/porkworld>, acessado em 29/06/04

<http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmmap.htm> , acessado em 05/06/04

## **CAPÍTULO I – ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM SUÍNOS**

**Resumo** – Investigou-se a associação entre polimorfismos no gene da Leptina e as características de desempenho em suínos produzidos pelo cruzamento divergente entre machos da raça naturalizada Piau e matrizes comerciais. Os polimorfismos foram detectados nas posições do gene 798, 828, 2411, 3266 e 3469 pb. Os genótipos para cada polimorfismo foram identificados pela técnica de PCR-RFLP. Nas análises estatísticas para estudo da associação entre os polimorfismos e as características foi utilizado modelo com os efeitos fixos de genótipo, sexo, interação genótipo e sexo e lote e o efeito aleatório de pai. A existência da interação entre genótipo e sexo foi investigada. O polimorfismo C798T apresentou associações com as características número total de tetas ( $p=0,02$ ) e número de tetas esquerdas ( $p=0,03$ ). O polimorfismo T3469C apresentou associação com as características peso aos 21 ( $p=0,01$ ), 42 ( $p=0,05$ ), 63 ( $p=0,02$ ) e 77 dias de idade ( $p=0,04$ ), consumo de ração ( $p=0,01$ ), ganho de peso médio diário ( $p=0,01$ ) e conversão alimentar ( $p=0,01$ ). Observou-se interação entre sexo e genótipos C798T e T828C para várias características analisadas. Os polimorfismos no gene da Leptina influenciaram significativamente variações nas características de desempenho; portanto, podem ser considerados como potenciais marcadores genéticos a serem usados em programas de seleção assistida por marcadores.

**Palavras-chave:** cruzamento divergente, interação genótipo x sexo, marcador molecular, PCR – RFLP.

## **ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS ON THE LEPTIN CANDIDATE GENE AND PERFORMANCE TRAITS IN SWINE**

**Abstract** – The association between polymorphisms in the porcine Leptin gene and performance traits in pigs from mating of native Brazilian boars and commercial sows was studied. The polymorphic sites were observed in the positions 798, 828, 2411, 3266 and 3469 pb of the gene. Genotypes were identified by PCR – RFLP. The analyses were performed using a model that included genotype, sex, group and genotype x sex interaction as fixed effects and sire as random effect. The polymorphism C798T was associated with variation in total number of teats ( $p=0.02$ ) and left number of teats ( $p=0.03$ ). The T3469C Leptin polymorphism was associated with weight at 21 ( $p=0.03$ ), 42 ( $p=0.05$ ), 63 ( $p=0.02$ ) and at 77 days of age ( $p=0.04$ ), slaughter weight ( $p=0.03$ ), feed intake ( $p=0.01$ ), average daily gain ( $p=0.01$ ), feed/gain ratio ( $p=0.01$ ). Association between genotypes C798T and T828C, and sex for many analyzed traits was observed. Leptin polymorphisms had significant influence on performance traits, and can be stated as potential genetic molecular markers for marked assisted selection.

**Key words** – divergent crossing, genotype x sex interaction, molecular marker, PCR – RFLP.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de genes candidatos é importante via na identificação de marcadores moleculares para auxiliar a seleção de animais. Rothschild e Soller (1999) definem genes candidatos para dada característica como genes seqüenciados, com ação biológica conhecida e que estão envolvidos no desenvolvimento ou na fisiologia da característica considerada.

Uma das estratégias que facilitam a determinação de genes que controlam características quantitativas é a escolha do delineamento para a obtenção dos indivíduos que formarão a população a ser genotipada. A utilização de uma população F2, obtida do cruzamento entre raças geneticamente divergentes, apresenta vantagens, como maior facilidade de detecção de QTL e grande segregação de alelos, devido à maior variabilidade genética, mas a aplicação direta na seleção assistida por marcadores deve ser analisada, para verificar em qual raça parental estão os QTLs encontrados.

O gene da Leptina pode exercer efeito direto sobre o crescimento e a composição corporal animal por meio de mecanismos endócrino-fisiológicos; portanto, polimorfismos identificados neste gene podem ser considerados potenciais marcadores genéticos para taxa de crescimento, consumo de ração e conversão alimentar, que são características de grande importância na produção animal. Os métodos tradicionais de seleção para estas características têm tido sucesso, porém a contribuição individual dos genes no processo ainda é desconhecida, em razão de serem características controladas por muitos genes e influenciadas por vários fatores ambientais.

A Leptina é um hormônio protéico produzido e secretado quase que exclusivamente pelo tecido adiposo e que age como sinal de saciedade sobre o hipotálamo, atuando sobre o peso corporal e o balanço energético (BARB et al., 2001).

Neste estudo investigou-se a associação entre polimorfismos detectados no gene da Leptina e a variação em características de desempenho em população de suínos F2 produzida por cruzamento divergente.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Obtenção dos dados e população de estudo

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001.

A população de estudo constituiu-se de animais F2, obtidos por meio do cruzamento de dois varrões da raça naturalizada brasileira Piau e 18 matrizes comerciais obtidas de bases genéticas Landrace, Large White e Pietrain.

A geração F1 foi formada por 106 fêmeas e 134 machos, dos quais foram selecionados 12 varrões e 54 fêmeas, provenientes de diferentes leitegadas, que se acasalaram e deram origem à geração segregante (F2).

Os acasalamentos foram planejados de forma que cada varrão parental contribuísse com igual número de descendentes nas gerações F1 e F2. De acordo com a época de nascimento, os animais da geração F2 foram divididos em cinco lotes: os três primeiros lotes foram constituídos apenas por animais provenientes de matrizes de primeiro parto, e os dois últimos, de matrizes de segunda parição.

Ao nascimento, os animais identificados individualmente por meio do sistema de marcação australiano (mossagem nas orelhas) foram pesados e submetidos ao corte de dentes e aplicação de antibiótico. No terceiro dia receberam ferro injetável e, por volta do 10º dia de idade, os machos foram castrados. O desmame foi feito no 21º dia de idade, quando os animais foram novamente pesados e então transferidos para a creche, onde ficaram até 60 dias de idade. Após esta idade, os animais foram transferidos para o setor de cria/recria, onde permaneceram até o 77º dia de idade, para obtenção individual de conversão alimentar no período de 28 dias (77 a 105 dias de idade).

## 2.2. Banco de dados e características avaliadas

Foram avaliados cerca de 600 animais. O banco de dados foi constituído por dois arquivos básicos: um com as medidas das características fenotípicas e outro com genótipos para cada marcador, codificados como 1 – genótipo normal, 2 – animais heterozigotos e 3 – animais homozigotos para a mutação. As características avaliadas, o número de observações, as médias e os desvios-padrão de cada característica de desempenho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Número de observações, média e desvio-padrão para as características de desempenho

Característica <sup>1</sup>	Unidade	Número de observação	Média	Desvio-padrão
NTETAS	nº	455	13,15	1,29
TETD	nº	455	0,59	0,74
TETE	nº	456	6,15	0,75
PNAS	Kg	617	1,22	0,26
P21	Kg	572	4,95	1,06
P42	Kg	581	8,37	1,79
P63	Kg	590	16,34	3,23
P77	Kg	617	21,45	4,11
P105	Kg	594	36,56	6,14
CR	Kg	606	40,07	7,84
GPD	Kg	596	0,53	0,13
CA	Kg/kg	591	2,80	0,65

<sup>1</sup>NTETAS – número de tetas; TETD – número de tetas direitas; TETE – número de tetas esquerdas; PNAS – peso ao nascimento; P21 – peso aos 21 dias; P42 – peso aos 42 dias; P63 – peso aos 63 dias; P77 – peso aos 77 dias; P105 – peso aos 105 dias de idade; CR – consumo de ração dos 77 aos 105 dias de idade; GPD – ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias de idade; CA – conversão alimentar dos 77 aos 105 dias de idade.

## 2.3. Extração de DNA

O DNA de todos os animais parentais, F1 e F2 foi extraído, quantificado e armazenado no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV (LABTEC). A extração do DNA genômico foi realizada a partir das células brancas, por purificação com fenol-clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por Sambrook et al. (1989).



Alíquotas de DNA foram diluídas na concentração de 25 ng/mL em solução de Tris-EDTA (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0).

#### 2.4. Polimorfismos estudados

Os polimorfismos estudados foram identificados por Soares (2001) por meio de seqüenciamento do gene da Leptina dos animais parentais deste cruzamento (machos Piau e fêmeas comerciais). Os cinco polimorfismos estudados estavam localizados na região que compreendia o *intron 2* e o *exon 3*. Destes polimorfismos, apenas o T3469C estava localizado em região expressa do gene (*exon 3*); todos os outros estavam localizados em região de *intron*. Os polimorfismos analisados no gene da Leptina estão caracterizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização dos polimorfismos estudados no gene da Leptina

Posição(pb)	Substituição	Origem	Sítio de restrição	Enzimas
798	C→T	Piau	Inclusão	<i>Pvu II</i>
828	T→C	Comercial	Exclusão	<i>Dde I</i>
2411	T→C	Piau	Inclusão	<i>Bam HI</i>
3266	T→G	Piau	Inclusão	<i>Fok I</i>
3469	T→C	Piau	Inclusão	<i>Hinf I</i>

#### 2.5. Construção dos *primers*

Os *primers* utilizados para o gene da Leptina foram desenhados por Soares (2001), a partir da seqüência publicada por Bidwell et al. (1997), número de acesso no GenBank U66254, e estão apresentados na Tabela 3. Na construção desses *primers* utilizou-se o programa WebPrimers (<http://alces.med.umn.edu/bin/webprimers>).

Tabela 3 – Seqüência dos pares de *primers* (direto e reverso) utilizados para amplificar as regiões do gene da Leptina que continham os polimorfismos

Pares <sup>1</sup>	Seqüência dos pares de <i>primers</i> 5'® 3'	Posição no gene	Tamanho <sup>2</sup>
1	D- GGGATAGCCTGAAGTCGTGC R- CAACCTCTGAGGTCCGGACC	561 a 1161	600
2	D- GTGGGGTCCAGATATCCGTT R- CCAGGCTAGGGGTCTAATCG	1916 a 2519	604
3	D-TGTGAGAAACAGACAGTCGTGG R- TGAGGATCTGTTGGTAGATCGC	3092 a 3514	423
4	D- AACAGAGGGTCACCGGTTTG R- TTTGGAAGAGCAGCTTAGCG	3416 a 3901	491

<sup>1</sup> Adaptado de Soares (2001).

<sup>2</sup> Tamanho do fragmento amplificado em pares de base.

## 2.6. Análise de restrição por PCR – RFLP

A determinação dos genótipos para cada polimorfismo foi feita por meio da análise de restrição, em que seqüências específicas de DNA foram amplificadas por PCR e o produto da amplificação foi submetido à digestão por enzima que reconhecia o sítio de restrição polimórfico dentro da região amplificada. As reações de amplificação ou PCR (reação em cadeia da polimerase) foram realizadas em sistemas construídos para um volume final de 20 µl, contendo uma unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeo), 0,2 µM de *primers* (direto e reverso), 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl e 25 ng de DNA genômico. Os programas de amplificação foram constituídos basicamente dos seguintes passos: desnaturaçãoinicial a 94 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturaçãodas fitas a 94 °C por um minuto, anelamento dos *primers* em temperatura variável por um minuto e extensão do fragmento a 72 °C por 1 minuto. Ao final, mais um passo de extensão por cinco minutos. Para cada par de *primer*, os programas de amplificação sofreram variações no sentido de diminuir as amplificações inespecíficas e/ou aumentar o rendimento da PCR. Para isso, a concentração de MgCl<sub>2</sub> variou de 1,0 a 3,0 mM e a temperatura de anelamento, de 62 a 66 °C.

Os resultados das ampliações foram avaliados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE). Os géis foram montados em cubas verticais contendo o tampão de corrida (TBE 1X). As corridas eletroforéticas ocorreram em voltagem constante de 250 v, durante aproximadamente uma hora. A cada gel foi adicionado 1 µl do marcador de peso molecular (1kb DNA ladder). Os resultados das ampliações foram analisados após a visualização das bandas específicas, a partir do protocolo de revelação com nitrato de prata, constituído de três etapas: fixação, coloração e revelação. Após a revelação, os géis foram montados em papel-celofane.

As análises de digestão foram processadas em um volume final de 15,0 µl, contendo 8,0 µl do material amplificado, 2,5 µl de enzima (5U), 1,5 µl de tampão da enzima, 0,15 µl de BSA (Bovine Serum Albumine) e 2,85 µl de água. A temperatura e o tempo de digestão seguiram as instruções do fabricante de cada enzima. Os resultados das digestões foram avaliados em eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE) e as bandas foram visualizadas a partir da aplicação do protocolo de revelação com o nitrato de prata; as condições de eletroforese foram semelhantes às aplicadas na análise da PCR. Em cada gel de análise de digestão foram adicionados 5 µl do material amplificado, que funcionava como controle negativo da reação. Também era adicionado 1 µl do marcador de peso molecular.

## 2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas para testar possíveis associações entre polimorfismos na sequência do gene da Leptina e variações nas características de desempenhos foram feitas utilizando-se o PROC GLM do SAS, de acordo com o modelo:

$$y_{ijklm} = \alpha + G_i + S_j + GS_{ij} + L_k + p_l + (C_{ijklm} - \bar{C})b + e_{ijklm}$$

em que:

$y_{ijklm}$  = característica observada no animal m, do genótipo i, do sexo j, do lote k, do pai l;

$\alpha$  = constante inerente a todas as observações;

$G_i$  = efeito fixo do genótipo  $i$  ( $i = 1, 2, 3$ );

$S_j$  = efeito fixo do sexo  $j$ ,  $j=1, 2$  (1= machos castrados, 2= fêmeas);

$GS_{ij}$  = interação do genótipo  $i$  com o sexo  $j$ ;

$L_k$  = efeito fixo de época de nascimento  $k$ ,  $k = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ ;

$p_l$  = efeito aleatório do pai  $l$ ;

$b$  = coeficiente de regressão linear da característica  $y_{ijklm}$  em relação à covariável;

$C_{ijklm}$  = valor observado da covariável no animal  $m$ , do genótipo  $i$ , do sexo  $j$ , do lote  $k$ , do pai  $l$ ;

$\bar{C}$  = valor médio da covariável; e

$e_{ijklm}$  = erro aleatório associado a cada observação.

Nas análises das características NTETAS, TETE e TETD não se utilizou covariável. O tamanho da leitegada ao nascimento foi usado como covariável para PNAS; o tamanho da leitegada ao desmame foi usado como covariável para os demais pesos (21, 42, 63, 77 e 105). Na análise das características CR, P105, GPD e CA, utilizou-se o peso aos 77 dias (P77) como covariável. Admitiu-se que as covariâncias entre os efeitos genéticos e ambientais (permanentes e temporários), bem como entre os efeitos ambientais de diferentes animais foram iguais a zero. As comparações entre as médias para os polimorfismos que apresentaram apenas duas classes genóticas foram feitas pelo teste F. No caso dos polimorfismos que apresentavam os três genótipos, as comparações entre as médias destes foram feitas utilizando o teste t. Quando a interação genótipo x sexo foi significativa, realizou-se a comparação entre as médias dos genótipos dentro de sexo por meio do teste t.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por simplificação, os genótipos, para todas as enzimas, foram padronizados como AA (homozigotos para o alelo não-mutado), BB (homozigoto para o alelo mutado) e AB (heterozigoto). Na Tabela 4 estão apresentados as freqüências alélicas e genotípicas e o número de animais genotipados para cada polimorfismo na geração F2.

Tabela 4 – Freqüências gênicas e alélicas dos polimorfismos na geração F2

Polimorfismo	N <sup>1</sup>	Freqüência genotípica <sup>2</sup>			Freqüência alélica	
		AA	AB	BB	A	
C789T	473	77,17 (365)	22,83 (108)	–	88,59	11
T828C	167	22,75 (38)	59,88 (100)	17,37 (29)	52,69	47
T2411C	445	31,46 (140)	53,26 (237)	15,28 (68)	58,09	41
T3266G	369	64,23 (237)	28,45 (105)	7,32 (27)	78,45	21
T3469C	506	86,36 (437)	13,64 (69)	–	93,18	6

<sup>1</sup> Número de animais genotipados.

<sup>2</sup> Entre parênteses está o número de animais para cada classe genotípica.

Em dois dos polimorfismos estudados (T3266G e T3469C) as freqüências dos genótipos homozigotos para a mutação (BB) foram muito baixas. Para o polimorfismo C798T, não era possível a formação do genótipo BB. Esse fato pode ser explicado pelos sistemas direcionados que originaram a geração F2, em razão de na geração F1 os filhos de um dado varrão terem sido acasalados com as filhas do outro macho parental, e vice-versa.

A análise de associação foi realizada para cada polimorfismo isoladamente. Apenas os polimorfismos C798T e T3469C apresentaram associação com as características de desempenho. Na análise do polimorfismo T3469C o genótipo BB não foi considerado nas análises estatísticas, em razão da baixa freqüência.

Enquanto o polimorfismo T3469C estava associado às características de ganho de peso e consumo de ração, o polimorfismo C798T estava relacionado ao grupo de características número de tetas. O nível de significância obtido pelo teste F, o número de observações, a média e o desvio-padrão de cada característica dentro de cada genótipo estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Número de observações, média e desvio-padrão das características de desempenho para os genótipos AA e AB dos polimorfismos C798T e T3469C

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Polimorfismo	Genótipo AA			Genótipo AB		
			N <sup>3</sup>	Média	DP <sup>4</sup>	N	Média	DP
NTETAS (n°)	0,02	C798T	308	13,10	1,28	94	13,42	1,20
TETE (n°)	0,03	C798T	308	6,53	0,77	94	6,72	0,63
P21 (kg)	0,02	T3469C	317	5,22	1,17	54	4,84	0,88
P42 (kg)	0,04	T3469C	329	8,71	1,90	60	8,15	1,65
P63 (kg)	0,02	T3469C	333	16,89	3,49	59	15,76	2,66
P77 (kg)	0,03	T3469C	343	21,87	4,29	60	20,56	3,42
CR(kg)	0,01	T3469C	374	39,37	8,12	69	41,79	7,72
GPD (kg)	<0,01	T3469C	369	0,51	0,14	68	0,58	0,11
CA (kg/kg)	<0,01	T3469C	365	2,91	0,69	69	2,63	0,58

<sup>1</sup>NTETAS – número de tetas total; TETE – número de tetas esquerdas; P21 – peso aos 21 dias; P42 – peso aos 42 dias; P63 – peso aos 63 dias; P77 – peso aos 77 dias; CR – consumo de ração dos 77 aos 105 dias; GPD – ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias; CA – conversão alimentar dos 77 aos 105 dias.

<sup>2</sup> Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup> Número de observações.

<sup>4</sup> Desvio-padrão.

Foi observado que a variante T do polimorfismo C798T apresentou efeito favorável e significativo em relação ao número de tetas; os animais que apresentavam a variante T mostravam maior número de tetas totais ( $p=0,02$ ) e esquerdas ( $p=0,03$ ).

O genótipo T3469C apresentou associação estatística com pesos aos 21, 42, 63 e 77 dias de idade, consumo de ração, ganho de peso médio diário e conversão alimentar.

Apesar de o polimorfismo T3469C ter influenciado quase todas as características de desempenho, não se observou interação entre genótipo e sexo para nenhuma das características. Para o polimorfismo T828C houve interação significativa entre genótipo e sexo nas características peso aos 21, 42 e 77 dias de idade (Tabela 6). No caso do polimorfismo C798T houve interação entre genótipo e sexo significativa para peso aos 42, 63 e 77 dias de idade, consumo de ração, ganho de peso médio diário e conversão alimentar (Tabela 7).

Tabela 6 – Médias das características de desempenho de cada sexo dentro de genótipos do polimorfismo T798C

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
P42 (kg)	0,03	8,45 <sup>a</sup>	8,88 <sup>a</sup>	9,11 <sup>a</sup>	8,58 <sup>a</sup>
P63 (kg)	0,01	15,64 <sup>a</sup>	17,53 <sup>a</sup>	17,78 <sup>a</sup>	16,74 <sup>a</sup>
CR (kg)	0,04	40,04 <sup>a</sup>	39,10 <sup>a</sup>	38,49 <sup>b</sup>	40,93 <sup>a</sup>
GPD (kg)	0,02	0,53 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>
CA(kg/kg)	0,05	2,76 <sup>b</sup>	3,03 <sup>a</sup>	2,75 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>P42 – peso aos 42 dias; P63 – peso aos 63 dias; P77 – peso aos 77 dias; CR – consumo de ração dos 77 aos 105 dias de idade; GPD – ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias; CA – conversão alimentar dos 77 aos 105 dias.

<sup>2</sup>Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup>Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t (P < 0,05).

Dentro da classe genotípica AA do polimorfismo C798T, as fêmeas apresentaram os maiores pesos aos 42 e 63 dias. Na classe genotípica AB, os machos e as fêmeas apresentaram desempenhos semelhantes. Nesta população o genótipo BB não estava presente. Para as características peso aos 77 dias, ganho de peso médio diário e conversão alimentar, dentro da classe genotípica AA, machos e fêmeas apresentaram desempenhos semelhantes. Contudo, dentro da classe genotípica AB, os machos apresentaram as maiores médias para o peso aos 77 dias e para a conversão alimentar, e as fêmeas mostraram a menor média para o ganho de peso médio diário.

Tabela 7 – Médias das características de desempenho de cada sexo dentro de genótipos do polimorfismo T828C

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
P21 (kg)	0,03	4,61 <sup>b</sup>	5,18 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a</sup>
P42 (kg)	0,08	8,04 <sup>a</sup>	8,53 <sup>a</sup>	9,73 <sup>b</sup>	8,85 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>P21 – peso aos 21 dias; P42 – peso aos 42 dias de idade.

<sup>2</sup>Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup>Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t (P < 0,10).

Apesar de o polimorfismo T828C apresentar três genótipos, as médias do genótipo BB não foram consideradas, uma vez que nesta classe se observa pequeno número de animais. Para o peso aos 21 dias de idade, em se tratando de machos, houve diferença estatística entre os genótipos do AA e AB, sendo que o genótipo AA estava associado à pior média. No caso das fêmeas não houve diferença estatística entre os dois genótipos. Para o peso aos 42 dias de idade entre os machos, os dois genótipos apresentaram desempenhos semelhantes. No entanto, dentro das fêmeas houve diferença estatística entre os dois genótipos, com o genótipo heterozigoto (AB) apresentando a maior média.

Na tentativa de explicar biologicamente a associação dos polimorfismos são apresentadas três hipóteses. A primeira admite que os polimorfismos seriam diretamente responsáveis pela variação observada nas características. Assim, estes polimorfismos poderiam estar envolvidos na formação de uma proteína (Leptina) mais ou menos eficiente. Essas mutações poderiam interferir em vários níveis da expressão do gene da Leptina: na transcrição, no processamento, no transporte ou até mesmo na meia-vida da proteína circulante. Esta primeira hipótese poderia ser comprovada pelo estudo da expressão do gene da Leptina, por meio técnica de Q – PCR (Quantitative – Polymerase Chain Reaction), que quantifica a expressão do gene.

Os dois polimorfismos estão localizados em regiões do gene com diferentes funções: o polimorfismo T3469C está localizado em uma região expressa do gene e o C798T está localizado em região não-expressa. Diante disso, é mais provável que esta primeira hipótese seja verdadeira para o polimorfismo T3469C, pois os polimorfismos localizados em região de *exon* têm maior probabilidade de apresentarem efeitos biológicos sobre a expressão gênica.

Uma hipótese alternativa pode ser considerada na tentativa de explicar a associação dos genótipos da Leptina com a variação nas características estudadas. Esta segunda hipótese admite que o polimorfismo estaria em desequilíbrio de ligação com outra alteração nucleotídica, que seria o verdadeiro sítio causal da variação observada nas características analisadas.



De acordo com o mapeamento do cromossomo 18 de suínos (SSC18), observa-se que próximo ao loco do gene da Leptina está o loco do gene do neuropeptídeo Y (NPY), o qual tem ação antagonista em relação à Leptina e que também poderia ser considerado como um gene candidato, influenciando características de desempenho em suínos. Além do NPY, outros locos localizados neste cromossomo poderiam ser os responsáveis pela variação encontrada nas características estudadas. Caso esta segunda hipótese seja verdadeira, estes polimorfismos no gene da Leptina serviriam como marcadores indiretos para o verdadeiro sítio causal das variações.

A terceira hipótese que poderia explicar essas associações seria a existência de associações falso-positivas entre os genótipos e as características estudadas. Um dos fatores que poderiam causar as associações falso-positivas seria o número limitado de observações para alguns dos genótipos.

Observou-se que os animais não-portadores da mutação T3469C apresentaram as melhores médias para todas as características em que ocorreu efeito significativo de genótipo; portanto, a substituição de base T → C teve efeito negativo sobre as características de desempenho nesta população. Jiang e Gibson (1999), avaliando este polimorfismo em diferentes raças, encontraram associação apenas com espessura de toucinho na raça Large White ( $p=0,0017$ ). Kennes et al. (2001), estudando este mesmo polimorfismo na raça Landrace, encontraram associação ( $p=0,0078$ ) com consumo alimentar e também observaram que a variante C estava negativamente associada a esta característica. Szydlowski et al. (2004), estudando a associação do polimorfismo T3469C com características produtivas nas raças polonesas Large White, Landrace e numa linha sintética, não verificaram nenhum efeito sobre as características de crescimento.

Freqüentemente, os dados de associação entre polimorfismos e características fenotípicas são conflitantes na literatura. Em parte, esses resultados podem ser devidos às diferenças na origem das raças analisadas. Por isso, deve haver cautela na extrapolação dos resultados obtidos em uma raça para outras raças, uma vez que eles podem não ser repetidos. A variação nas características quantitativas é determinada pela interação entre diversos

genes e destes com o ambiente. Assim, é provável que, quando se consideram raças diferentes, os mesmos genótipos, para determinados polimorfismos, poderão estar associados a genótipos diferentes para outros genes, que não foram considerados no estudo e têm efeitos pequenos sobre as características estudadas, mas, que quando somados, podem alterar o fenótipo.

O efeito diferenciado dos genótipos da Leptina entre machos e fêmeas pode ser explicado pela expressão diferenciada da Leptina entre os sexos. Em humanos, o efeito de sexo sobre a expressão da Leptina é bastante significativo: em mesmas quantidades de gordura corporal, mulheres secretam três vezes mais Leptina que homens (MARTIN et al., 2002). De acordo com Spicer (2001), os níveis de Leptina circulante aumentam durante a puberdade em humanos em ambos os sexos; contudo, nas fêmeas os níveis de Leptina continuam aumentando até atingirem a maturidade. Em machos, após atingirem a puberdade, ocorre decréscimo nos níveis de Leptina circulante, uma vez que a testosterona é capaz de inibir a síntese de Leptina e o estrógeno é capaz de estimulá-la. Considerando a alta similaridade estrutural (RAMSAY et al., 1998) e funcional (HOUSEKNECHT et al., 1998) que a Leptina apresenta entre as espécies de mamíferos, é provável que esse dimorfismo sexual na expressão desse hormônio também ocorra em suínos.

A existência da interação entre genótipos e sexo indica que um marcador para um fenótipo em determinado sexo pode não ser eficiente para selecionar em outro sexo.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

Existe associação entre o polimorfismo C798T e o número de tetas, estando a variante T, de origem Piau, associada ao aumento do número de tetas.

Existe associação entre polimorfismo o T3469C no gene da Leptina e características de desempenho, estando a variante C associada às piores médias fenotípicas das características.

Existe interação entre genótipos e sexo em algumas características de desempenho para os polimorfismos C798T e T828C.

Os polimorfismos T798C e T3469C no gene da Leptina influenciam significativamente variações nas características de desempenho; portanto, podem ser considerados potenciais marcadores genéticos para programas de seleção assistida por marcadores. Contudo, esses resultados devem ser validados em estudos que envolvam populações comerciais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARB, C. R., G. J. HAUSMAN, K. L. HOUSECKNECHT. Biology of Leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21: 297 – 317, 2001.
- BENEVENUTO JUNIOR, A. A. Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados, 93, pgs. **tese** (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa., UFV, Viçosa, MG, 2001.
- BIDWELL, C.A., CORNELIUS, S.G, WILLIS, G.M., SPURLOCK, M. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Animal Biotechnology**, v 8, n 2, p.191 – 206, 1997.
- HOUSECKNECHT, K. L., BAILE, C. A., MATTERI, R. L., SPURLOCK, M. E. The biology of Leptin: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1.405 – 1.420, 1998.
- JIANG, Z.H, GIBSON, J.P. Genetic polymorphism in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, 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**, v.32, p. 215 – 218, 2001.
- MARTIN, L.J., MAHANEY, L., MACCLUER, J.W., BLANGERO, J., JAQUISH, C.E., COMUZZIE, A.G. Leptin's sexual dimorphism results from genotype by sex interactions mediated by testosterone. **Obesity Research**, v.10, N. 1, 2002.
- RAMSAY, T.G., YAN, X., MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **The Journal of Animal Science**, v.76, p.484 – 490, 1998.

- ROTHSCHILD, M.F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1999, Viçosa. **Anais...**Viçosa: 1999. p.219-242.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATS, T. Molecular cloning: A laboratory **manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory,. 564p, 1989.
- SAS Institut Inc. User's Guide. Statistical Analysis System. Cary, NC, USA, 1998.
- SOARES, M. A. M., Estudo do gene da obesidade e de seu receptor em suínos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 108 pgs. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SPIKER, L.J. Leptin: possible metabolic signal effecting reproduction. *Animal Endocrinology*, v. 21, p. 251-270, 2001.
- SZYDLOWSKI, M., STACHOWIAK, M., MACROWISK, M., KAMYCZEK, M., ECKERT, R., ROZICKI, M., SWRRONSKI, M. No major effect of the Leptin gene polymorphism on porcine production traits. *Journal of Animal Breeding*, v.124, p. 149 – 155, 2004.

## **CAPÍTULO II – ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE CANDIDATO LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, CORTES DE CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM SUÍNOS**

**Resumo** – A associação entre os polimorfismos C798T, T828C, T2411C, T3266G e T3469C no gene da Leptina e as características de carcaça, cortes de carcaça e qualidade de carne em suínos F2 foi investigada. A análise de associação entre genótipos e características foi conduzida utilizando modelo com efeitos fixos de genótipo, sexo, lote e interação genótipo x sexo e o efeito aleatório de pai. O polimorfismo C798T apresentou associação com espessura de toucinho UL ( $p=0,06$ ), comprimento de intestino ( $p=0,02$ ) e peso do carré ( $p=0,01$ ). A mutação C828T esteve associada a peso da banda direita ( $p=0,06$ ) e banda esquerda ( $p=0,06$ ), peso da copa limpa ( $p=0,07$ ), peso total de paleta ( $p=0,03$ ) e peso de bacon ( $p=0,04$ ). Constatou-se associação do polimorfismo T2411C com espessura de toucinho P2 ( $p=0,06$ ), peso de paleta limpa ( $p=0,06$ ), peso total de copa ( $p=0,08$ ), peso do filezinho ( $p=0,01$ ) e peso do rim ( $p=0,01$ ). A mutação T3266G mostrou associação com idade ao abate ( $p=0,08$ ), espessuras de toucinho P2 ( $p=0,07$ ), UC ( $p=0,04$ ) e UL ( $p=0,07$ ), peso de costela ( $p=0,09$ ), peso de copa limpa ( $p=0,08$ ) e peso de bacon ( $p=0,04$ ). O polimorfismo T3469C apresentou associação com peso ao abate ( $p=0,03$ ), comprimento de carcaça pelo método brasileiro ( $p=0,09$ ) e americano ( $p=0,04$ ), índice de vermelho ( $p=0,02$ ) e tonalidade ( $p=0,03$ ). Foram observadas interações significativas entre os polimorfismos e o sexo, para várias características. Os efeitos médios da substituição alélica e de dominância foram determinados para as mutações T828C e T2411C. De acordo com os resultados, os polimorfismos estudados têm potencial de serem usados como marcadores genéticos.

**Palavras-chave:** cruzamento divergente, interação genótipo x sexo, marcadores moleculares, PCR – RFLP.

## **ASSOCIATION OF LEPTIN CANDIDATE GENE POLYMORPHISMS AND CARCASS, CARCASS CUTS AND MEAT QUALITY TRAITS IN SWINE**

**Abstract** – The association between polymorphisms C798T, T828C, T2411C, T3266G and T3469C in the candidate gene Leptin and carcass traits, carcass cuts traits and meat quality traits in F2 pigs produced by divergent cross was investigated. Association analyses were performed using a statistical model that included genotype, sex, group and genotype x sex interaction as fixed effects, sire as random effect. The existence of interaction between genotype and sex was evaluated. The polymorphism C798T was associated with variation in backfat thickness UL ( $p=0.06$ ), intestine length ( $p=0.02$ ) and total loin (bone-in) weight ( $p=0.01$ ). The polymorphic site C828T was associated with: right half ( $p=0.06$ ), left half carcass weight ( $p=0.06$ ), boston shoulder weight ( $p=0.07$ ), picnic shoulder weight ( $p=0.03$ ) and bacon weight ( $p=0.04$ ). The polymorphism T2411C was associated with variation in backfat thickness P2 ( $p=0.06$ ), skinless and fatless picnic shoulder weight ( $p=0.06$ ), boston shoulder weight ( $p=0.08$ ), sirloin weight ( $p=0.01$ ) e kidney weight ( $p=0.01$ ). The mutation T3266G was associated with slaughter age ( $p=0.08$ ), backfat thickness P2 ( $p=0.07$ ), UC ( $p=0.04$ ), and UL ( $p=0.07$ ), spareribs weight ( $p=0.09$ ), skinless and fatless boston shoulder weight ( $p=0.08$ ), and bacon weight ( $p=0.04$ ). Leptin polymorphism T3469C was associated with slaughter weight ( $p=0.03$ ), carcass length by the Brazilian carcass classification method ( $p=0.09$ ) and carcass length by American carcass classification method ( $p=0.04$ ), redness ( $p=0.02$ ) and hue ( $p=0.03$ ). It was observed the association between polymorphisms and sex for many performance traits. Allelic substitution and dominance effects were only calculated to polymorphisms T828C and T2411C. According to the results the analyzed polymorphisms have potential to be used as genetic markers in marked assisted selection.

**Key words:** divergent cross, molecular markers, PCR – RFLP, sex x genotype interaction.

## 1. INTRODUÇÃO

Os últimos anos têm sido marcados por grandes avanços na pesquisa genômica, envolvendo desde o mapeamento genômico até a análise de expressão gênica e a manipulação de genomas, gerando informações promissoras para auxiliar o melhoramento genético e a produção animal.

Atualmente, a biotecnologia é uma realidade na agropecuária; prova disso são os vários testes em uso na indústria de suínos, incluindo aqueles para qualidade da carne, tamanho de leitegada, cor de pele, crescimento e resistência a doenças (PLASTOW, 2000).

Pereira (2000) cita a ocorrência de três etapas na atividade suinícola que contribuíram para expansão do consumo e melhoria do desempenho dos animais. A primeira ocorreu quando se buscou o suíno tipo carne, a partir do tipo gordura, mudança induzida pelo mercado e promovida pela seleção fenotípica individual. A segunda foi caracterizada pela inclusão de testes de progênie e índices de seleção mais eficientes e capazes de promover maior ganho genético, com grande utilização dos cruzamentos. E o último avanço na suinocultura tem sido o conhecimento do genoma suíno, que é uma das espécies que mais têm se beneficiado das novas descobertas, tanto pelos investimentos diretos em pesquisas como pela conversão dos conhecimentos em ferramentas aplicadas à seleção.

A maioria dos marcadores genéticos utilizados na indústria suinícola foi descoberta pela metodologia do gene candidato. A Leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo e age como sinal de saciedade no hipotálamo, regulando o peso corporal e o gasto energético (CAMPFIELD et al., 1995). Em razão das funções fisiológicas desempenhadas, o gene da Leptina pode ser considerado como gene candidato que influencia características produtivas em suínos. Assim, neste estudo investigou-se a associação entre polimorfismos no gene da Leptina e características de carcaça, cortes de carcaça e qualidade da carne em suínos F2.



## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Obtenção dos dados e população de estudo**

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil, no período de 1998 a 2001.

A população do estudo foi formada por meio do acasalamento de dois varrões da raça naturalizada brasileira Piau com 18 matrizes comerciais (Landrace, Large White e Pietrain).

Da geração F1 foram selecionados 12 varrões e 54 fêmeas, provenientes de diferentes leitegadas, que se acasalaram e deram origem à geração segregante (F2). Os animais da geração F2 nasceram no período compreendido entre junho de 2000 e fevereiro de 2001.

Os animais F2 foram submetidos ao manejo convencional da granja de melhoramento e abatidos com cerca de 65 kg, atingidos por volta de 150 dias de idade. O abate foi feito em abatedouro da própria granja. Antes do abate os animais foram submetidos a 20 horas de jejum. A insensibilização foi feita por choque elétrico e a sangria, feita via coração. As carcaças foram dissecadas e analisadas seguindo o método descrito por Nascimento e Mota (2000). A meia carcaça direita foi resfriada a 4 °C por 24 horas e depois dissecada, para obter os dados referentes às características de cortes.

### **2.2. Banco de dados e características avaliadas**

O banco de dados foi constituído de dois arquivos: um com os genótipos de cada animal para cada polimorfismo e outro com as medidas fenotípicas de todas as características avaliadas.

A avaliação das características da qualidade da carne foi feita no Laboratório de Carnes do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa. As análises foram realizadas em amostras do lombo (*Longissimus dorsi*), de acordo com Benevenuto Júnior (2001).

O número de observações, as médias e os desvios-padrão das características de carcaça, cortes de carcaça e qualidade de carne são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 – Número de observações, média e desvio-padrão para as características de carcaça

<b>Característica</b>	<b>Unidade</b>	<b>Número de observação</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>
PVIVO	Kg	506	64,84	5,54
IDABATE	dias	532	147,83	9,95
PBDIR	Kg	526	26,86	2,67
PBESQ	Kg	526	26,76	2,60
PCARC	kg	526	50,37	0,63
RCARC	%	526	81,99	2,03
MBCC	cm	546	85,96	4,14
MLC	cm	540	71,66	3,19
SH	mm	547	40,43	5,44
UC	mm	549	19,81	4,81
UL	mm	547	28,51	5,95
EL	mm	495	45,01	2,02
P2	mm	547	16,81	3,74
ETO	mm	502	21,56	5,42
ESPBACON	mm	539	24,92	6,64
PFLOMB	mm	495	43,79	4,34
AOL	cm <sup>2</sup>	499	26,30	3,74
PULMÃO	kg	541	452,50	0,08
CORAÇÃO	g	547	234,80	28,90
FÍGADO	kg	545	1,22	0,16
BAÇO	g	547	92,50	19,80
RIM	kg	546	127,50	18,30
INTEST	m	544	18,42	1,83

<sup>1</sup>PVIVO – peso vivo ao abate; IDABATE – idade ao abate; PBDIR – peso da banda direita; PBESQ – peso da banda esquerda; PCARC – peso da carcaça; RCARC – rendimento de carcaça; MBCC – comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça; MLC – comprimento de carcaça pelo Método Americano; SH – maior espessura de toucinho na região da copa, na linha do dorso lombar; UC – espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar; UL – espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar; EL – menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar; P2 – espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar; ETO – espessura de toucinho (mm) a 6,5 cm da linha dorso-lombar equivalente a P2; ESPBACON – espessura do bacon; PFLOMB – profundidade de lombo; AOL – área de olho de lombo; PULMÃO – peso do pulmão, CORAÇÃO – peso do coração; FÍGADO – peso do fígado; BAÇO – peso do baço; RIM – peso do rim; INTEST – comprimento do intestino delgado.

Tabela 2 – Número de observações, média e desvio-padrão para as características de cortes de carcaça

<b>Característica</b>	<b>Unidade</b>	<b>Número de observação</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>
PTPERNIL	Kg	543	4,99	0,60
PPERNIL	Kg	543	7,28	0,82
PTCOPA	Kg	549	2,34	0,36
PCOPA	Kg	544	1,69	0,27
PTPALETA	Kg	545	4,87	0,61
PPALETA	Kg	548	2,70	0,39
PCARRE	Kg	540	3,47	0,48
PLOMBO	Kg	542	1,02	0,18
PBACON	Kg	541	2,69	0,45
COSTELA	Kg	548	1,52	0,25
PAPADA	Kg	546	0,71	0,20
FILEZIN	Kg	546	0,22	0,04
BARAMA	Kg	546	0,47	0,16

<sup>1</sup>PTPERNIL – peso total de pernil; PPERNIL – peso do pernil sem gordura e sem pele; PTCOPA – peso total da copa; PCOPA – peso da copa sem gordura e sem pele; PTPALETA – peso total da paleta; PPALETA – peso da paleta sem gordura e sem pele; PCARRE – peso total do carré; PLOMBO – peso do lombo; PBACON – peso do bacon, COSTELA – peso da costela; PAPADA – peso da papada, CABEÇA – peso da cabeça; FILEZIN – peso do filezinho; BARAMA – peso da banha rama.

Tabela 3 – Número de observações, média e desvio-padrão para as características de qualidade da carne

<b>Característica<sup>1</sup></b>	<b>Número de observação</b>	<b>Média</b>	<b>Desvios-padrão</b>
PH45	543	6,50	0,26
PH24	555	5,71	0,15
GORINT (%)	504	1,55	0,64
GOTEJ (%)	557	3,19	1,69
COZ (%)	550	32,63	2,53
PTOTAL	439	34,23	2,66
MACIEZ (g/1,2cm)	431	5550,63	873,93
A	485	0,67	0,60
B	491	6,62	0,55
C	429	6,70	0,52
H	416	84,07	5,56

<sup>1</sup>PH45 – pH 45 minutos após o abate; PH24 – pH 24 horas após o abate; GORINT – percentagem de gordura intramuscular; GOTEJ – perda de peso por gotejamento; COZ – perda de peso por cozimento; PTOTAL – perda total de peso; MACIEZ – maciez objetiva (força de cisalhamento – FC); A – índice de vermelho B – índice de amarelo; C – índice de saturação; H – tonalidade de cor.

### 2.3. Polimorfismos e região estudada

Os polimorfismos estudados foram detectados por Soares (2001), que seqüenciou o gene da Leptina nos animais parentais do cruzamento divergente. Os polimorfismos analisados foram caracterizados por substituições de bases nas posições 798, 828, 2411, 3266 e 3469 pb do gene. Essas mutações foram detectadas pelas enzimas Pvu II, Dde I, Bam HI, Fok I e Hinf I, respectivamente. Apenas a substituição T3469C estava localizada em região expressa do gene; todos os outros polimorfismos estavam localizados em região de *intron*. O polimorfismo T828C tinha sua origem nas raças comerciais, enquanto os demais tinham eram originados da raça naturalizada Piau.

### 2.4. Análises laboratoriais

As análises para obtenção dos genótipos foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV (LABTEC).

O DNA de todos os animais parentais, F1 e F2 foi extraído, quantificado e armazenado. A extração do DNA genômico foi feita a partir das células brancas, por purificação com fenol-clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por Sambrook et al. (1989). Alíquotas de DNA foram diluídas na concentração de 25 ng/mL, em solução de Tris-EDTA.

Os quatro pares de *primers* utilizados para amplificar as regiões do gene da Leptina foram desenhados por Soares (2001), a partir da seqüência publicada por Bidwell et al. (1997), número de acesso no GenBank U66254. Na construção desses *primers* utilizou-se o programa WebPrimers (<http://alces.med.umn.edu/bin/webprimers>). Os *primers* amplificavam as regiões que continham os cinco polimorfismos estudados. A região em estudo não compreendeu toda a extensão do gene da Leptina – apenas uma região do *intron 2* e a região codificadora do *exon 3*.

Tabela 4 – Seqüência dos pares de *primers* (direto e reverso) utilizados para amplificar as regiões do gene da Leptina que continham os polimorfismos

Pares <sup>1</sup>	Seqüência dos pares de <i>primers</i> 5'® 3'	Posição no gene	Tamanho <sup>2</sup>
1	D- GGGATAGCCTGAAGTCGTGC R- CAACCTCTGAGGTCCGGACC	561 a 1161	600
2	D- GTGGGGTCCAGATATCCGTT R- CCAGGCTAGGGGTCTAATCG	1916 a 2519	604
3	D-TGTGAGAAACAGACAGTCGTGG R- TGAGGATCTGTTGGTAGATCGC	3092 a 3514	423
4	D- AACAGAGGGTCACCGGTTTG R- TTTGGAAGAGCAGCTTAGCG	3416 a 3901	491

<sup>1</sup> Adaptado de Soares, 2001.

<sup>2</sup> Tamanho do fragmento amplificado em pares de base.

Nas análises de restrição, seqüências específicas de DNA que continham os polimorfismos foram amplificadas por PCR, e o produto da amplificação foi submetido à digestão por enzima que reconhecia o sítio de restrição polimórfico. As reações de amplificação ou PCR (reação em cadeia da polimerase) foram realizadas em sistemas construídos para um volume final de 20 µl, contendo basicamente uma unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeo), 0,2mM de *primers* (direto e reverso), 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl e 25 ng de DNA genômico.

Os resultados das amplificações foram avaliados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE). No procedimento de eletroforese, 5µl do produto amplificado foram adicionados a 2 µl de tampão de amostra (Ficoll). Posteriormente, as amostras foram carregadas nos géis de poliacrilamida, os quais foram montados em cubas verticais contendo o tampão de corrida (TBE 1X). As corridas eletroforéticas ocorreram em voltagem constante de 250 v, durante aproximadamente uma hora. A cada gel era adicionado um microlitro do marcador de peso molecular (1 kb DNA leader). Os resultados das amplificações foram analisados após a visualização das bandas específicas a partir do protocolo de revelação com nitrato de prata. Depois da revelação, os géis foram montados em papel-celofane.

As análises de digestão foram processadas em volume final de 15,0 µl, contendo 8,0 µl do material amplificado, 2,5 µl de enzima (5U), 1,5 µl de tampão da enzima, 0,15 µl de BSA (Bovine Serum Albumine) e 2,85 µl de água. A temperatura e o tempo de digestão seguiram as instruções do fabricante de cada enzima. Os resultados das digestões foram avaliados em eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE), e as bandas foram visualizadas a partir da aplicação do protocolo de revelação com o nitrato de prata; as condições de eletroforese foram semelhantes às aquelas aplicadas na análise da PCR. Em cada gel de análise de digestão foram adicionados 5 µl do material amplificado, que funcionava como controle negativo da reação. Também era adicionado 1 µl do marcador de peso molecular. Todos os animais parentais e F1 foram genotipados. O número de animais F2 genotipados variou para cada enzima e nem toda a população foi genotipada.

## 2.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas para associação dos genótipos de cada polimorfismo com as características avaliadas foram feitas utilizando-se o PROC GLM do SAS, seguindo-se o modelo:

$$y_{ijklm} = \alpha + G_i + S_j + GS_{ij} + L_k + p_l + (C_{ijklm} - \bar{C})b + e_{ijklm}$$

em que:

$y_{ijklm}$  = característica observada no animal m, do genótipo i, do sexo j, do lote k, do pai l;

$\alpha$  = constante inerente a todas as observações;

$G_i$  = efeito fixo do genótipo i (i = 1, 2, 3);

$S_j$  = efeito fixo do sexo j, j=1, 2 (1= machos castrados, 2= fêmeas);

$GS_{ij}$  = interação do genótipo i com o sexo j;

$L_k$  = efeito fixo de época de nascimento k, k = 1, 2, 3, 4 e 5;

$p_l$  = efeito aleatório do pai l;

b = coeficiente de regressão linear da característica  $y_{ijklm}$  em relação à covariável;

$C_{ijklm}$  = valor observado da covariável no animal m, do genótipo i, do sexo j, do lote k, do pai l;

$\bar{C}$  = valor médio da covariável; e

$e_{ijklm}$  = erro aleatório associado a cada observação.

Nas análises das características de carcaça e de cortes de carcaça, o peso da meia carcaça direita resfriada foi utilizado como covariável, e nas características de qualidade de carne, utilizou-se a idade ao abate. Admitiu-se que as covariâncias entre os efeitos genéticos e ambientais (permanentes e temporários), bem como entre os efeitos ambientais de diferentes animais, foram iguais a zero. As comparações entre as médias para os polimorfismos que apresentaram apenas duas classes genóticas foram feitas pelo teste F. Para os polimorfismos que apresentavam os três genótipos, as comparações entre as médias dos genótipos foram feitas utilizando o teste t. A existência da interação entre o sexo dos animais e os genótipos para os diferentes polimorfismos foi testada. Quando a interação genótipo x sexo foi significativa, realizou-se a comparação entre as médias dos genótipos dentro de sexo.

Os efeitos médios da substituição alélica para os polimorfismos T828C e T2411C foram determinados por meio de regressão dos valores de cada genótipo em relação ao número de alelos não mutados (alelo A). Já os efeitos de dominância foram determinados por contrastes lineares entre as médias dos genótipos, de acordo com a seguinte fórmula:  $D = (2 \text{ média AB} - \text{média AA} - \text{média BB})$ . O teste t de Student foi usado para determinar a significância dos efeitos de dominância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise de associação

Na Tabela 5 estão apresentadas as freqüências genotípicas e o número de animais genotipados para cada polimorfismo na geração F2.

Tabela 5 – Freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos na geração F2

Polimorfismo	N <sup>1</sup>	Freqüência genotípica <sup>2</sup>			Freqüência alélica	
		AA	AB	BB	A	B
C789T	473	77,17 (365)	22, 83 (108)	–	88,59	11,41
T828C	167	22,75 (38)	59,88 (100)	17,37 (29)	52,69	47,31
T2411C	445	31,46 (140)	53,26 (237)	15,28 (68)	58,09	41,91
T3266G	369	64,23 (237)	28,45 (105)	7,32 (27)	78,45	21,55
T3469C	506	86,36 (437)	13,64 (69)	–	93,18	6,82

<sup>1</sup> Número de animais genotipados.

<sup>2</sup> Número de animais observados na classe genotípica.

Houve associação entre os cinco polimorfismos que estavam segregando na população F2 e várias características analisadas, o que sugere que a Leptina apresenta função fisiológica que influencia as características de composição da carcaça.

Nas Tabelas 6, 8, 10, 12 e 14 estão apresentados, respectivamente, os resultados das análises de associação dos polimorfismos C798T, C828T, C2411T, T3266G e T3469C com as características de carcaça, cortes e qualidade de carne. Por simplificação, os genótipos, para todas as enzimas, foram padronizados como AA (homozigotos para o alelo não-mutado), BB (homozigoto para o alelo mutado) e AB (heterozigoto).



Tabela 6 – Número de observações, média e desvio-padrão das características de carcaça e cortes associadas aos genótipos AA e AB para o polimorfismo C798T

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Genótipo AA			Genótipo AB		
		N <sup>3</sup>	Média	DP <sup>4</sup>	N	Média	DP
INTEST (m)	0,02	256	18,19	1,76	79	18,71	1,83
UL (mm)	0,06	257	28,21	5,94	81	26,91	5,28
PCARRE (kg)	0,01	259	3,50	0,49	83	3,37	0,37

<sup>1</sup> INTEST – comprimento de intestino; UL - espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar; PCARRE – peso do carré.

<sup>2</sup> Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup> Número de observações.

<sup>4</sup> Desvio-padrão.

O polimorfismo C798T apresentou associação com comprimento do intestino, espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar (UL) e peso do carré. Os animais heterozigotos (AB) apresentaram maiores médias para comprimento de intestino e peso do carré, enquanto os animais normais (AA) mostraram maior média para espessura de toucinho UL.

Para comprimento de carcaça pelo método brasileiro de classificação de carcaça, peso do rim, profundidade do lombo, área de olho de lombo, gordura intramuscular, perda por gotejamento, índice de vermelho e tonalidade da carne, houve interação significativa entre genótipos e sexos. As médias de cada genótipo dentro dos sexos estão apresentadas na Tabela 7.

A existência da interação entre genótipo e sexo pode ser percebida nas características onde houve diferenças significativas entre os genótipos para um sexo e no outro sexo as médias genotípicas não diferiram estatisticamente. Por exemplo, para gordura intramuscular (GORINT) entre os machos houve diferença estatística entre os dois genótipos (AA e AB), enquanto nas fêmeas as médias não foram influenciadas pelos genótipos.

Tabela 7 – Médias dos genótipos AA e AB do polimorfismo C798T dentro de sexo

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
MBCC (cm)	0,05	85,19 <sup>a</sup>	86,07 <sup>a</sup>	86,58 <sup>a</sup>	85,75 <sup>a</sup>
RIM (kg)	<0,01	0,12 <sup>b</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>
PFLOMB (mm)	0,05	42,72 <sup>a</sup>	43,40 <sup>a</sup>	46,38 <sup>a</sup>	44,76 <sup>b</sup>
AOL (cm <sup>2</sup> )	0,07	25,18 <sup>a</sup>	25,38 <sup>a</sup>	28,65 <sup>a</sup>	27,20 <sup>b</sup>
GORINT (%)	0,05	1,49 <sup>b</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,51 <sup>a</sup>	1,45 <sup>a</sup>
GOTEJ (%)	0,04	3,35 <sup>a</sup>	2,76 <sup>b</sup>	3,21 <sup>a</sup>	3,53 <sup>a</sup>
A	0,02	0,66 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	0,95 <sup>a</sup>
H	0,06	84,44 <sup>a</sup>	85,25 <sup>a</sup>	84,10 <sup>a</sup>	81,69 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>MBCC – comprimento de carcaça pelo método brasileiro; RIM – peso do rim; PFLOMB – profundidade de lombo; AOL – área de olho de lombo; GORINT – gordura intramuscular; GOTEJ – perda de peso por gotejamento; A – índice de vermelho; H – tonalidade da carne.

<sup>2</sup> Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t (p < 0,05).

Tabela 8 – Número de observações, média e desvio-padrão das características associadas aos genótipos AA, AB e BB para o polimorfismo C828T

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Genótipo AA			Genótipo AB			Genótipo BB		
		N <sup>3</sup>	Média <sup>4</sup>	DP <sup>5</sup>	N	Média	DP <sup>4</sup>	N	Média	DP
PBDIR (kg)	0,06	33	27,00 <sup>a</sup>	2,74	78	26,86 <sup>b</sup>	3,01	19	27,03 <sup>a</sup>	2,63
PBESQ (kg)	0,06	33	26,20 <sup>c</sup>	2,80	78	27,23 <sup>a</sup>	2,67	19	26,57 <sup>b</sup>	2,30
PCOPA (kg)	0,07	35	1,75 <sup>a</sup>	0,24	80	1,69 <sup>ab</sup>	0,29	19	1,62 <sup>b</sup>	0,15
PTPALETA (kg)	0,02	34	4,87 <sup>a</sup>	0,68	79	4,81 <sup>a</sup>	0,71	19	4,58 <sup>b</sup>	0,66
PBACON (kg)	0,03	34	2,68 <sup>b</sup>	0,51	79	2,77 <sup>b</sup>	0,47	19	2,96 <sup>a</sup>	0,41

<sup>1</sup>PBDIR – peso da banda direita; PBESQ – peso da banda esquerda; PCOPA – peso da copa, PTPALETA – peso total da paleta; PBACON – peso do bacon.

<sup>2</sup> Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup> Número de observações.

<sup>4</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferiram pelo teste Tukey (P < 0,05)

<sup>5</sup> Desvio-padrão.

O polimorfismo C828T foi o único na geração F2 que tinha sua origem nas fêmeas parentais; portanto, era esperado que os animais do genótipo BB apresentassem as maiores médias para as características ligadas à deposição de carne na carcaça e menores médias para características ligadas a

deposição de gordura, porém isso não foi observado. Os animais do genótipo AB apresentaram as melhores médias para peso da banda esquerda e menor para peso da banda direita, comparados aos genótipos AA e BB. Em se tratando de peso da copa limpa e peso total da paleta, os animais AA apresentaram as maiores médias; os heterozigotos, médias intermediárias; e os homozigotos para a mutação (BB), as menores médias. Para o peso de bacon, os animais AA apresentaram menores médias; os heterozigotos (AB), médias intermediárias; e os animais BB, as maiores médias. Possivelmente, o pequeno número de animais nas classes genóticas AA e AB interferiram negativamente na estimativa dessa associação. Portanto, resultados mais acurados poderão ser obtidos incluindo na análise um número maior de animais.

Na Tabela 9 estão apresentadas as interações genótipo x sexo significativa entre o polimorfismo T828C e peso das bandas direita e esquerda e o comprimento de carcaça pelo método brasileiro. Observa-se, contudo, que as médias dos genótipos dentro de sexo não diferiram estatisticamente.

Tabela 9 – Médias de cada genótipo do polimorfismo T828C dentro de sexo

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
PBDIR (kg)	0,03	26,97 <sup>a</sup>	26,79 <sup>a</sup>	27,03 <sup>a</sup>	27,87 <sup>a</sup>
PBESQ (kg)	0,03	26,81 <sup>a</sup>	26,99 <sup>a</sup>	26,75 <sup>a</sup>	26,90 <sup>a</sup>
MBCC (cm)	0,09	84,91 <sup>a</sup>	84,89 <sup>a</sup>	87,20 <sup>a</sup>	87,36 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>PBDIR - peso da banda direita; PBESQ - peso da banda esquerda; MBCC – comprimento de carcaça pelo método brasileiro de classificação de carcaça.

<sup>2</sup> Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

O polimorfismo C2411T apresentou associação significativa com espessura de toucinho P2, peso do rim, peso da copa, peso da paleta limpa e peso do filezinho.

Tabela 10 – Número de observações, média e desvio-padrão das características de carcaça e cortes associadas aos genótipos AA, AB e BB para o polimorfismo C2411T

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Genótipo AA			Genótipo AB			Genótipo BB		
		N <sup>3</sup>	Média <sup>4</sup>	DP <sup>5</sup>	N	Média	DP	N	Média	DP
P2 (mm)	0,06	124	16,54 <sup>b</sup>	4,05	192	17,42 <sup>ab</sup>	3,70	60	17,55 <sup>a</sup>	3,68
RIM (mm)	0,01	125	0,13 <sup>a</sup>	0,02	196	0,13 <sup>a</sup>	0,02	60	0,12 <sup>b</sup>	0,01
PCOPA (kg)	0,09	123	1,72 <sup>a</sup>	0,28	198	1,68 <sup>ab</sup>	0,24	60	1,65 <sup>b</sup>	0,20
PPALETA (kg)	0,05	125	2,75 <sup>a</sup>	0,41	198	2,69 <sup>ab</sup>	0,60	60	2,62 <sup>b</sup>	0,36
FILEZIN (kg)	0,01	124	0,22 <sup>b</sup>	0,04	197	0,22 <sup>b</sup>	0,03	59	0,24 <sup>a</sup>	0,04

<sup>1</sup>P2 – espessura de toucinho a 6,5 cm da linha dorso-lombar; RIM – peso do rim; PCOPA – peso da copa; PPALETA – peso da paleta; FILEZIN – peso do filezinho.

<sup>2</sup>Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup>Número de observações.

<sup>4</sup>Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferiram pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

<sup>5</sup>Desvio-padrão.

Em relação a peso da copa e peso da paleta limpa, os animais homocigotos normais apresentaram as maiores médias; os heterocigotos, médias intermediárias; e os homocigotos para a mutação C2411T, as piores médias. Para a espessura de toucinho P2, os animais homocigotos normais apresentaram menor média; os heterocigotos, desempenho intermediário; e os homocigotos para a mutação, a maior média. Esse comportamento está de acordo com a origem do polimorfismo. Considerando que o alelo mutado era originário da raça Piau, era esperado que ele estivesse associado às menores médias para deposição de carne e as maiores médias para deposição de gordura.

Observa-se interação significativa entre o polimorfismo T2411C e peso do rim, peso da cabeça, espessura de toucinho EL e maciez, como apresentado na Tabela 11.

No que se refere aos machos houve diferença estatística entre os genótipos para peso do rim e espessura de toucinho, enquanto nas os desempenhos foram semelhantes entre as três classes genotípicas.

Tabela 11 – Médias das características para cada sexo dentro de genótipos do polimorfismo T2411C

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>			Fêmeas <sup>3</sup>		
		AA	AB	BB	AA	AB	BB
RIM (kg)	0,07	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>
CABECA (kg)	0,08	1,49 <sup>a</sup>	1,49 <sup>a</sup>	1,48 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>	1,51 <sup>b</sup>	1,51 <sup>b</sup>
MACIEZ (g/1,2cm)	0,06	5451 <sup>a</sup>	5592 <sup>a</sup>	5507 <sup>a</sup>	5839 <sup>a</sup>	5478 <sup>a</sup>	5631 <sup>a</sup>
EL (mm)	0,05	44,50 <sup>b</sup>	45,45 <sup>a</sup>	44,97 <sup>ab</sup>	45,20 <sup>a</sup>	44,93 <sup>a</sup>	44,60 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> RIM – peso do rim; CABECA – peso da cabeça; EL – menor espessura de toucinho na linha dorso-lombar; MACIEZ – maciez objetiva.

<sup>2</sup> Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Tabela 12 – Número de observações, média e desvio-padrão das características de carcaça e cortes associadas aos genótipos AA e AB para o polimorfismo T3266G

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Genótipo AA			Genótipo AB		
		N <sup>3</sup>	Média	DP <sup>4</sup>	N	Média	DP
IDABATE (dias)	0,06	185	149,01	9,71	85	146,67	9,17
P2 (mm)	0,08	187	16,75	3,81	86	17,58	3,85
UC (mm)	0,04	187	19,41	4,71	86	20,65	4,80
UL (mm)	0,08	186	27,38	6,03	86	28,72	5,83
PCOPA (kg)	0,08	188	1,71	0,29	87	1,66	0,25
COSTELA (kg)	0,10	191	1,50	0,26	87	1,55	0,23
PBACON (kg)	0,05	189	2,67	0,46	86	2,75	0,37

<sup>1</sup>IDABATE – idade ao abate; P2 – espessura de toucinho a 6,5 cm da linha dorso-lombar; UC – espessura de toucinho após a última costela; UL – espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar; PCOPA – peso da copa; COSTELA – peso da costela; PBACON – peso do bacon.

<sup>2</sup> Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup> Número de observações.

<sup>4</sup> Desvio-padrão.

Observa-se que os animais heterozigotos para o polimorfismo T3266G apresentaram as maiores médias para as espessuras de toucinho (P2, UC e UL) e peso da costela. Os animais AB também atingiram mais cedo a idade ao abate. Esse fato não era esperado, pois o polimorfismo T3266G tinha origem na raça Piau, uma raça não selecionada para características de carcaça e que apresenta menor desempenho produtivo. Entretanto, esses dados estão de

acordo com os resultados obtidos para o polimorfismo T3469C, pois para a característica peso ao abate os animais AB mostraram maiores médias, quando comparados aos animais AA. Por outro lado, os animais homozigotos para a mutação (AA) apresentaram as maiores médias para peso da copa e idade ao abate.

Houve interação significativa entre genótipo e sexo para o peso do baço e peso da banha rama (Tabela 13). Observa-se que entre os machos não houve diferença significativa entre os dois genótipos para o peso do baço, enquanto entre as fêmeas a média dos animais AA foi estatisticamente superior à dos animais AB. Para o peso da banha rama, nos machos houve diferença estatística entre os dois genótipos, ao passo que, entre as fêmeas, os dois genótipos mostraram desempenhos semelhantes.

Tabela 13 – Médias das características para cada sexo dentro de genótipos do polimorfismo T3266G

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
BAÇO (kg)	0,02	0,09 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>
BARAMA (kg)	0,01	0,49 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>BAÇO – peso do baço; BARAMA – peso da banha rama.

<sup>2</sup>Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup>Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Os animais portadores da mutação T3469C (genótipo AB) apresentaram as maiores médias de peso ao abate, espessura de bacon e tonalidade da carne, quando comparados aos animais AA. Considerando que o polimorfismo T3469C tinha sua origem em um dos machos da raça Piau, não era esperado que os animais heterozigotos para esta mutação apresentassem as melhores médias para peso ao abate. Possivelmente esses resultados podem ter sido causados pela existência de sobredominância entre os genótipos deste polimorfismo. Contudo, está hipótese não pode ser testada, uma vez que o genótipo homozigoto para a mutação apresentou baixa freqüência na geração F2 e não pode ser considerado na análise.

Tabela 14 – Número de observações, médias e desvio-padrão das características de carcaça, cortes e qualidade da carne associadas aos genótipos para o polimorfismo T3469C (AA e AB)

Característica <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>	Genótipo AA			Genótipo AB		
		N <sup>3</sup>	Média	DP <sup>4</sup>	N	Média	DP
PVIVO (kg)	0,03	295	64,00	5,45	46	65,96	5,66
MBCC (cm)	0,10	334	86,20	4,2	55	85,32	4,09
MLC (cm)	0,04	331	71,72	3,22	54	70,91	3,29
CORACAO (kg)	0,06	334	0,24	0,02	54	0,23	0,03
FIGADO (kg)	0,05	333	1,27	0,16	54	1,22	0,13
ESPACON (mm)	0,03	338	24,77	6,68	54	26,76	6,27
A	0,02	280	0,76	0,64	45	0,63	0,51
H	0,03	254	83,57	6,00	42	85,77	4,18

<sup>1</sup>PVIVO – peso ao abate; MBCC – comprimento de carcaça pelo método brasileiro de classificação de carcaça; MLC – comprimento Método Americano; ESPACON – espessura de bacon; A – índice de vermelho; H – tonalidade.

<sup>2</sup> Nível de significância pelo teste F.

<sup>3</sup> Número de observações.

<sup>4</sup> Desvio-padrão.

Dos polimorfismos analisados, apenas o polimorfismo T3469C mostrou alguma associação com características de qualidade da carne. A mutação T3469C apresentou associação com as características índice de vermelho e tonalidade da carne. Lagonigro et al. (2003) relataram a associação de um polimorfismo no gene da Leptina com teor de gordura intramuscular em bovinos. Contudo, não há estudos que investigaram a associação da Leptina com outras características de qualidade de carne, além da gordura intramuscular.

Na Tabela 15 estão apresentadas as interações significativas entre genótipo e sexo, em se tratando das espessuras de toucinho UC e P2, peso do pernil, peso da paleta e peso do carré.

Em relação aos machos, não houve diferença estatística entre as classes genotípicas AA e AB para espessura de toucinho UC e peso do pernil limpo. Para as fêmeas houve diferença significativa entre os genótipos; as fêmeas da classe genotípica AA apresentaram maior média para espessura de toucinho UC e menor para peso do pernil limpo. Entre as fêmeas não houve diferença estatística entre as duas classes genotípicas no que se refere a

espessura de toucinho P2 e peso da paleta limpa. Entre os machos houve diferença estatística entre os genótipos. Os animais da classe AA apresentaram menor média para a espessura de toucinho P2 e maior média para peso da paleta limpa.

Tabela 15 – Médias de cada genótipo do polimorfismo T3469C dentro de sexo

Característica <sup>1</sup>	Interação <sup>2</sup>	Machos <sup>3</sup>		Fêmeas <sup>3</sup>	
		AA	AB	AA	AB
UC (mm)	0,06	21,17 <sup>a</sup>	21,51 <sup>a</sup>	18,71 <sup>a</sup>	16,82 <sup>b</sup>
P2 (mm)	0,01	18,32 <sup>b</sup>	19,98 <sup>a</sup>	15,47 <sup>a</sup>	14,77 <sup>a</sup>
PPERNIL (kg)	0,01	4,80 <sup>a</sup>	4,71 <sup>a</sup>	5,16 <sup>b</sup>	5,38 <sup>a</sup>
PPALETA (kg)	0,05	2,61 <sup>a</sup>	2,46 <sup>b</sup>	2,78 <sup>a</sup>	2,81 <sup>a</sup>
PCARRÉ (kg)	0,03	3,49 <sup>a</sup>	3,57 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,37 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> UC – espessura de toucinho após a última costela; P2 – espessura de toucinho a 6,5 cm da linha dorso-lombar; PPERNIL – peso do pernil; PPALETA – peso da paleta; PCARRE – peso do carré.

<sup>2</sup> Nível de significância da interação genótipo e sexo, pelo teste F.

<sup>3</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro de cada sexo, diferiram pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

A fim de explicar a associação entre polimorfismos e as características, foram apresentadas três hipóteses. Na primeira admitiu-se que os polimorfismos seriam diretamente responsáveis pela variação observada nas características. Assim, tais polimorfismos poderiam estar envolvidos na formação de uma proteína (Leptina) mais ou menos eficiente. Essas mutações poderiam interferir em vários níveis da expressão do gene da Leptina, ou seja, na transcrição, no processamento, no transporte ou até mesmo na meia-vida da proteína circulante.

A maioria dos polimorfismos estudados estava localizada em regiões não-expressas do gene. Somente o polimorfismo T3469C estava dentro de uma região de *exon*. Apesar de os polimorfismos localizados em região de *exon* terem maior probabilidade de apresentar efeitos biológicos sobre a expressão gênica, é possível que polimorfismos localizados em regiões não-expressas sejam capazes de interferir na expressão do gene.



Na segunda hipótese, admitiu-se que o polimorfismo estaria em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo, que seria o verdadeiro sítio causal da variação observada nas características analisadas.

De acordo com o mapeamento do cromossomo 18 de suínos (SSC18), observa-se que próximo ao loco do gene da Leptina está o loco do gene do neuropeptídeo Y (NPY), que tem ação antagonista em relação à Leptina e que também poderia ser considerado como um gene candidato que influencia características de desempenho em suínos. Além do NPY, outros locos localizados neste cromossomo poderiam ser os responsáveis pela variação encontrada nas características estudadas. Caso esta segunda hipótese seja verdadeira, esses polimorfismos no gene da Leptina serviriam como marcadores para o verdadeiro sítio causal das variações.

A terceira hipótese foi a existência de associações falso-positivas. O modelo estatístico usado pressupõe que apenas os polimorfismos e os efeitos fixos e aleatórios estejam influenciando na média das características. Contudo, sabe-se que a variação nessas características é controlada por muitos fatores, inclusive os ambientais. Outro fato que poderia levar a essas associações falso-positivas é o número limitado de observações para alguns dos genótipos.

Apesar da importância da Leptina no metabolismo, de forma geral, o efeito dos polimorfismos nesse hormônio foi relativamente pequeno sobre a variação total das características em que foi constatada a associação. Talvez isso se deva ao fato de os animais terem sido abatidos aos 65 kg de peso vivo, quando eles ainda não estavam em fase de deposição acelerada de tecido gorduroso. Provavelmente, se o abate dos animais tivesse ocorrido por volta de 100 kg de peso vivo, quando os animais depositam mais gordura, os efeitos dos polimorfismos no gene da Leptina teriam sido de maior amplitude, pois sabe-se que a expressão da Leptina é altamente correlacionada com o conteúdo de gordura corporal (HOUSEKNECHT ET AL., 1998). Ramsay et al. (1998), testando a hipótese de que a expressão do gene da Leptina variava com a deposição da gordura, mediram a concentração da Leptina sérica em indivíduos selecionados para maior espessura de toucinho e compararam com a expressão de indivíduos selecionados para menor espessura de toucinho. Estes autores observaram que no grupo de indivíduos obesos os níveis de

Leptina estavam aumentados em 306% ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo não selecionado. Outra possível causa do pequeno efeito desses polimorfismos seria a localização da maioria deles em regiões não-expressas do gene pequeno efeito.

Na população estudada, foram medidas espessuras de toucinho em vários locais ao longo da carcaça. Benevenuto Júnior (2001) encontrou correlações próximas de 70% entre essas medidas. Apesar da correlação relativamente alta entre as espessuras de toucinho, os polimorfismos mostraram associação com algumas e não com todas. O polimorfismo T3266G apresentou associação significativa com três espessuras (P2, UC e UL); o polimorfismo T2411C, com a espessura P2; e o polimorfismo C798T, somente com a espessura UL.

Rohrer e Keele (1998), investigando a presença de QTLs influenciando a composição de carcaça, concluíram que diferentes conjuntos de genes, não totalmente exclusivos, atuam na expressão da deposição de gordura ao longo da carcaça do animal, demonstrando a expressividade variável dos genes, a qual depende do número de genes controladores e da atividade desses genes.

A expressividade variável dos genes pode ser responsável pelo padrão de expressão observado para o polimorfismo T3469C. Este polimorfismo apresentou efeito negativo sobre as médias dos pesos em idades mais jovens (P21, P42, P63 e P77) e efeito favorável sobre a média do peso ao abate, quando os animais tinham cerca de 150 dias de idade.

Apesar da importância fisiológica do hormônio Leptina no metabolismo energético, são poucos os estudos envolvendo a associação entre polimorfismos neste gene e características produtivas em animais domésticos. Jiang & Gibson (1999), estudando o polimorfismo da T3469C em diferentes raças, observaram associação com espessura de toucinho na raça Large White ( $p = 0,0017$ ), estando o polimorfismo associado à maior espessura de toucinho. Kennes et al. (2001) encontraram associação entre o polimorfismo T3469C e consumo alimentar ( $p = 0,0078$ ) na raça Landrace. Estes autores também encontraram associação entre o polimorfismo A2845T e a idade para atingir 100 kg (idade ao abate).

Freqüentemente, os dados de associação entre polimorfismos e características fenotípicas são conflitantes na literatura. Em parte, esses resultados podem ser atribuídos às diferenças na origem das raças analisadas. Por isso, deve haver cautela na extrapolação dos resultados obtidos em uma raça para outras raças. A variação nas características quantitativas é determinada pela interação entre diversos genes e destes com o ambiente.

A Leptina é diferencialmente expressa entre os sexos (Spicer, 2001). Segundo Martin et al. (2002), em humanos, o efeito de sexo sobre a expressão da Leptina é bastante significativo, pois, com as mesmas quantidades de gordura corporal, mulheres secretam duas vezes mais Leptina que homens. Esse dimorfismo poderia estar associado ao efeito diferenciado entre machos e fêmeas dos polimorfismos no gene da Leptina.

Uma vez que a expressão da Leptina em humanos é diferenciada entre os sexos, é provável que em suínos os efeitos da Leptina também o sejam. Os resultados obtidos neste estudo reforçam essa hipótese. Observou-se que as diferenças entre os genótipos variaram entre machos e fêmeas.

Considerando a existência da interação genótipo e sexo, os marcadores podem ter eficiência diferenciada para seleção de machos ou de fêmeas. Portanto, o efeito da interação genótipo x sexo deverá ser incluído no modelo estatístico, aumentando a acurácia da avaliação desses marcadores genéticos.

### **3.2. Análise dos efeitos médios da substituição alélica e de dominância**

Para os polimorfismos C798T, T3266G e T3469C os efeitos médios da substituição alélica e de dominância não puderam ser estimados, pois na população havia os genótipos homozigotos (BB). Nas Tabelas 16 e 17 estão apresentadas as médias para cada genótipo, os efeitos genotípicos e de dominância dos polimorfismos T828C e T2411C e os níveis de significância destes efeitos sobre as características de carcaça e de cortes de carcaça analisadas.

Tabela 16 – Médias genotípicas, efeitos genotípicos (A) e desvios da dominância (D) para o polimorfismo T828C

<b>Característica<sup>1</sup></b>	<b>Média AA</b>	<b>Média AB</b>	<b>Média BB</b>	<b>A</b>	<b>D</b>
PBDIR (kg)	26,00 (33)	26,86 (78)	27,03 (19)	-0,815	-0,155**
PBESQ (kg)	26,20 (33)	27,23 (78)	26,57 (19)	-0,455	0,845**
PTPALETA (kg)	4,87 (34)	4,81 (79)	4,58 (19)	-0,008	0,085**
PCOPA (kg)	1,75 (35)	1,69 (80)	1,62 (19)	-0,010	0,005
PBACON (kg)	2,88 (34)	2,77 (79)	2,96 (19)	-0,136*	-0,050**

\*Significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

\*\*Significativo pelo teste t ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup>PBDIR – peso da banda direita; PBESQ – peso da banda esquerda; PCOPA – peso da copa; PPALETA – peso da paleta; PBACON – peso do bacon.

O polimorfismo T828C apresentou efeito médio da substituição alélica significativo somente para o peso do bacon. O efeito de dominância foi significativo para peso das bandas direita e esquerda, peso total de paleta e peso de bacon. Todavia, os efeitos aditivos e de dominância foram obtidos com pequeno número de animais.

Tabela 17 – Médias genotípicas, efeitos genotípicos (A) e desvios da dominância (D) para o polimorfismo T2411C

<b>Característica<sup>1</sup></b>	<b>Média AA<sup>2</sup></b>	<b>Média AB</b>	<b>Média BB</b>	<b>A</b>	<b>D</b>
P2 (mm)	16,54 (124)	17,42 (192)	17,55 (60)	0,51	0,380
RIM (kg)	0,13 (124)	0,13 (192)	0,12 (60)	0,003**	0,001***
PPALETA (kg)	2,75 (124)	2,69 (192)	2,62 (60)	0,042	-0,005
PCOPA (kg)	1,72 (124)	1,68 (192)	1,65 (60)	0,107*	-0,005
FILEZIN (kg)	0,22 (89)	0,22 (117)	0,24 (32)	0,004	-0,010***

\*Significativo pelo teste F ( $p < 0,10$ ).

\*\*Significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

\*\*\*Significativo pelo teste t ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup>P2 – espessura de toucinho a 6,5 cm da linha dorso-lombar; PCOPA – peso da copa; PPALETA – peso da paleta; RIM – peso do rim; FILEZIN – peso do filezinho.

<sup>2</sup>Entre parênteses está o número de animais por genótipo.

O polimorfismo T2411C apresentou efeitos médios da substituição alélica significativos para peso do rim e peso de copa e efeitos de dominância significativos para peso do rim e peso do filezinho. É provável que essa ausência de significância dos efeitos genotípicos e de dominância para as

demais características seja consequência do pequeno número de animais pertencentes à classe genotípica BB.

Considerando que os pais transmitem para os filhos seus genes e não seus genótipos, uma vantagem de um marcador direto seria apresentar maior efeito aditivo que efeito de dominância, pois os efeitos de dominância são causados pela interação entre os alelos de um mesmo loco e essas interações são formadas a cada geração. Por isso, é importante saber se os efeitos do polimorfismo são atribuídos à ação aditiva ou aos desvios da dominância.

#### **4. CONCLUSÕES**

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que existe interação entre genótipos dos polimorfismos C798T, C828T, T2411C, T3266G, T3469C e sexo para várias características analisadas.

Os polimorfismos estudados no gene da Leptina apresentam associação com muitas características quantitativas de importância econômica, indicando que estes polimorfismos têm potencial para serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores. No entanto, essa associação foi detectada em população experimental, sendo necessária sua validação em populações comerciais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEVENUTO JUNIOR, A. A. Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados, 93, pgs. **tese** (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa., UFV, Viçosa, MG, 2001.
- CAMPFIELD, L.A., SMITH, F.J., GUISEZ, Y., DEVOS, R., BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v.269, p.546 – 549, 1995.
- JIANG, Z.H, GIBSON, J.P. Genetic polymorphism in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. **Mammalian Genome**, v. 10, p.191 – 193, 1999.
- NASCIMENTO, J.D. E MOTA, E.O. Dissecção de carcaça de suínos na Agroceres PIC. **Informe técnico AGROCERES PIC**, SP, 2000.
- 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**, v.32, p. 215 – 218, 2001.
- LAGONIGRO, R., WIENIER, P., PILLA, F., WOOLLIAMS, J.A., WILLIAMS, J.L. A new mutation in the coding region of the bovine Leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, v.34, p. 371 – 374, 2003.
- MARTIN, L.J., MAHANEY, L., MACCLUER, J.W., BLANGERO, J., JAQUISH, C.E., COMUZZIE, A.G. Leptin's sexual dimorphism results from genotype by sex interactions mediated by testosterone. **Obesity Research**, v.10, N. 1, 2002.
- PEREIRA, A.F. 2000. Melhoramento genético de suínos. IN: Reunião Anual da SBZ, 37, **Anais** dos Simpósios, Viçosa: SBZ, p.9-15.
- PLASTOW, G. S. Molecular Genetics in the Swine Industry. In: Anais do II Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, SBMA, Belo Horizonte. P. 21, 2000.

- ROHRER, G.A.,KEELE, J.W. Identification of quantitative Trait Loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 2247 – 2254, 1998.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATS, T. Molecular cloning: A laboratory **manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory,. 564p, 1989.
- SAS Institut Inc. User's Guide. Statistical Analysis System. Cary, NC, USA, 1998.
- SOARES, M. A. M., Estudo do gene da obesidade e de seu receptor em suínos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 108 pgs. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SPICER, L.J. Leptin: possible metabolic signal effecting reproduction. **Animal Endocrinology**, v. 21, p. 251-270, 2001.
- SZYDŁOWSKI, B. M., STACHOWIAK, M., MACROWISK, M., KAMYCZEK, M., ECKERT, R., ROZICKI, M., SWRRONSKI, M. No major effect of the Leptin gene polymorphism on porcine production traits. **Journal of Animal Breeding**, v.124, p. 149 – 155, 2004.