

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
LUIZ GONZAGA DE OLIVEIRA NETO**

**UTILIZAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE DA GRELINA EM REPRODUTORES
SUÍNOS.**

FLORIANÓPOLIS

2014

LUIZ GONZAGA DE OLIVEIRA NETO

**UTILIZAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE DA GRELINA EM REPRODUTORES
SUÍNOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Programa de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina como exigência parcial para obtenção do título de Zootecnista.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira
Lima

FLORIANÓPOLIS

2014

LUIZ GONZAGA DE OLIVEIRA NETO

UTILIZAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE DA GRELINA EM REPRODUTORES SUÍNOS.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, aprovado e adequado para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 27 de junho de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Sandra Regina Carvalho
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e vontade para superar as dificuldades.

À Universidade, seu corpo docente, direção e administração que me propuseram a oportunidade de estar finalizando hoje minha graduação no curso.

Ao meu orientador André Luís Ferreira Lima, pela força e incentivo no pouco tempo que lhe coube.

Aos meus pais, meus amigos, que me apoiaram e me ergueram quando tudo parecia estar perdido.

E a todos que me ajudaram de forma direta ou indiretamente à medida que foi avançando o estudo, a todos o meu muito obrigado.

RESUMO

O gene da grelina, conhecido também por “hormônio da fome”, possui relação direta com o consumo de ração e conversão alimentar, característica de muita importância na suinocultura, sabendo-se que mais de 70% dos custos de produção é devido à alimentação. Alterações nos níveis desse hormônio podem ser atribuídas a polimorfismos genéticos entre animais. Para a pesquisa foram coletadas amostras de pelos da região lombar de 60 animais da raça Landrace, localizados no Oeste de Santa Catarina. O material genético foi extraído utilizando-se o procedimento PCIA (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico). A partir das seqüências GenBank N^{os}: DQ663493, AY3730191 e AB5628971 foram desenhados os seguintes iniciadores para PCR: Forward – 5' CCGAACACCAGAAAGTGCAG 3'; everse - 5'GGACGGGGACTTACCATTG 3'. Os resultados das reações de PCR foram utilizados para à técnica de RFLP (polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição) utilizando-se a endonuclease Mbo-I. O estudo permitiu isolar e amplificar a região estrutural aos exon || e íntron | e || do gene da grelina. O uso do marcador molecular com a técnica de PCR-RFLP com a enzima Mbo-I foi eficiente, indicando o monomorfismo genético, conseqüentemente ausência de variação genética na população de Suínos em estudo.

Palavras – chave: Grelina; hormônio da fome; DNA; conversão alimentar; suínos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítio de restrição da enzima Mbo-I.....	19
Figura 2: Resultado das extrações de DNA utilizando o método de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico), adaptado por Lima(2003).....	20
Figura 3: Resultados das análises de PCR em volume final de 25 µL/amostra, contendo 0,5 µM de cada “primer”, tampão PCR 1X, 100 µM de dNTPs, 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®).....	20
Figura 4: Resultado das análises de RFLP, utilizando a enzima Mbo-I (New England BioLabs®), com volume final de 20 µL/amostra contendo 10 µL do produto de PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 5 unidades de cada enzima de restrição.	21

LISTA DE SIGLAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PCI: fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeats

GH: hormônio de Crescimento

GHRH: Hormônio liberador de hormônio de crescimento

PCR: reação em cadeia da polimerase

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNA

AFLPs: Amplified fragment length polymorphism

FWD: forward

REV: reverse

UV: ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

μ l: Micro Litro

μ g: Micro Grama

Kb: Kilo Base

pb: Pares de Base

ml: Mili Litro

$^{\circ}$ C: Graus Celsius

M: Molar

ng/ μ l: Nano Grama/ Micro Litro

μ g/ml: Nano Grama/ Mili Litro

V: Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS.....	9
1.1.1 Objetivo geral.....	10
1.1.2 Objetivos específicos.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 SUINOCULTURA NO BRASIL.....	11
2.2 NUTRIÇÃO.....	12
2.3 GRELINA	12
2.4 MARCADORES MOLECULARES.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS	20
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é um dos maiores exportadores mundiais de carne suína, com um contingente superior a 40 milhões de cabeças sendo que mais de 50% da produção está concentrada na região Sul do Brasil. O consumo de carne suína no Brasil tem se demonstrado crescente, embora ainda seja baixo quando comparado ao consumo per capita de países europeus. Neste cenário, a suinocultura brasileira vem se intensificando principalmente no âmbito de tecnologias relacionadas às instalações, nutrição, aspectos sanitários, manejo de dejetos e à qualidade genética dos animais. Um dos grandes desafios desta atividade está diretamente relacionado com a utilização adequada destas tecnologias somadas à busca pela redução dos custos de produção. Considerando-se que a nutrição dos animais é um dos maiores contribuintes para estes custos de produção, faz-se necessário buscar, dentro dos programas de melhoramento genético, características relacionadas direta ou indiretamente com o consumo e com a conversão alimentar dos animais.

Segundo Dekkers (1999), o melhoramento genético era feito com base na genética quantitativa pela visualização do fenótipo para estimar o valor genético dos animais. O grande problema dessa seleção está na falta de conhecimento dos efeitos dos genes que atuam nas características de interesse. Fazendo com que esse método de seleção trouxesse características indesejáveis para meus descendentes, como: aumento de doenças metabólicas, de deposição de gordura na carcaça, carne de baixa qualidade, redução da fertilidade, (Burt, 2002). As soluções destes erros na seleção poderão ser feitos através do uso de Marcadores molecular, sem reduzir os ganhos já obtidos nas características de produção.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, foi possível compreender como os genes influenciam nas características de interesse econômico, facilitando o reconhecimento e o uso de polimorfismo de DNA com técnicas que utilizam marcadores moleculares (LEDUR, 2001). Segundo Coutinho & Rosário (2010), o advento dos marcadores moleculares, torna possível a associação das informações derivadas do fenótipo com as do material genético do animal, facilitando os processos de identificação e seleção dos animais com genótipos que desempenham um melhor resultado na característica de interesse zootécnico.

Conhecido como o “hormônio da fome”, a grelina é secretada nas células parietais do estômago, possuindo assim, atuação sobre a quantidade de alimento ingerido. Considerando que, em lotes de animais em fase pós desmama criados sob as mesmas condições, existem variações individuais no consumo alimentar e é possível que parte destas variações possa ser atribuída à diferentes níveis de expressão da grelina. Sob este escopo, o presente trabalho foi conduzido no intuito de verificar a existência de polimorfismos na região estrutural do gene da grelina em suínos da raça Landrace criados no Estado de Santa Catarina. Se estes polimorfismos existirem e puderem ser associados a características de interesse econômico favoráveis à suinocultura, o gene da grelina poderá ser utilizado em programa de seleção assistida por marcadores moleculares, proporcionando, desta forma, maior ganho genético para estas características.

1.1 OBJETIVOS

Com o intuito de esclarecer a finalidade do presente trabalho cabe ressaltar os objetivos gerais e específicos.

1.1.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de polimorfismo na região estrutural do gene da grelina, em uma população de suínos da raça Landrace e Large White no Estado de Santa Catarina, de modo a contribuir para uma possível seleção assistida por marcadores moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Isolar marcadores moleculares;
- Caracterizar e verificar a ocorrência de polimorfismo na região estrutural do gene da grelina, em uma população de suínos da raça Landrace e Large White no Estado de Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUINOCULTURA NO BRASIL

A suinocultura vem se destacando na matriz produtiva do agronegócio brasileiro como uma atividade de importância econômica e social. Envolve mais de 730 mil pessoas de forma direta e é responsável pela renda de mais de 2,7 milhões de pessoas (ROPPA, 2002). Recentemente, o Brasil tem tido uma grande importância, principalmente no mercado internacional, devido a algumas vantagens que tornam a atividade competitiva no cenário externo: grande parte do sistema produtivo é baseada na integração vertical pelas agroindústrias; disponibilidade de insumos básicos para a produção, principalmente de grãos essenciais como soja e milho; incentivo de novas tecnologias e busca constante pela redução de custos de produção (GONÇALVES; PALMEIRA, 2006).

Uma vantagem comparativa que é relevante e favorável ao nosso país é sua disposição geográfica. Isso possibilita ampliar o rebanho de forma homogênea, sem comprometer aspectos ambientais, como contaminação de solos e lençóis freáticos por dejetos oriundos da produção. Países da União Européia, como a Dinamarca em 2004 apresentava 531 suínos/km², quatro vezes a mais do que a população que era de 125 pessoas/km² (MATEOS et al., 2005). O Brasil possuía uma densidade de 4,34 suínos/km², enquanto na China ultrapassava os 45 suínos/km² (ROPPA, 2001). Dados mais atuais mostram uma grande concentração de suínos na região de Santa Catarina, onde segundo Cruz et al (2006), alcança a marca de 613 suínos/km².

A carne suína é considerada a fonte protéica de origem animal mais importante do mundo, com produção superior à 100 milhões de toneladas, das quais metade é produzida na China e o restante é dividido entre União Européia, Estados Unidos e Brasil (MIELE; MACHADO, 2010). Seguindo a tendência mundial pela busca de altos índices zootécnicos e pela qualidade na produção de alimentos para o consumidor, o Brasil vem intensificando suas atividades, tanto em relação à velocidade do ciclo de produção, bem como na qualidade produtiva dos animais, favorecendo a maior produção por área/ano (MILAZZOTTO, 2001).

2.2 NUTRIÇÃO

Na suinocultura, e em qualquer outra criação animal, a alimentação é a que proporciona o maior impacto, pois representa em média 70% do custo de produção (SILVEIRA; TALAMINI, 2007). Lopes (2004) afirma que “o consumo diário de ração é um ponto que ressalta grande importância econômica, haja vista que 70 a 80% do custo de produção de suínos é atribuído à alimentação dos animais”.

Para que a produção seja viável, deve-se levar em conta a disponibilidade local e regional de ingredientes que tenham preços compatíveis com o preço pago por quilograma de suíno. Desta forma, o produtor deve se manter atento ao preço pago pela ração, tentando sempre a redução do custo da dieta, focado na garantia da qualidade na produção (BELLAVÉR & LUDKE, 2004). A tendência atual para reduzir o custo das rações é a incorporação de aminoácidos sintéticos, facilmente encontrados no mercado, em substituição às fontes protéicas tradicionais. Segundo Conhalato (1998), citado por Pinto (2002), esta prática possibilita formular rações de mínimo custo, com teores de proteína bruta inferiores aos preconizados pelas tabelas de exigências nutricionais, além de atender às necessidades em aminoácidos essenciais, como a lisina. O conhecimento das reais necessidades de aminoácidos essenciais, como a lisina, para suínos, permite evitar problemas como a redução no consumo de ração, aumento das perdas energéticas por incremento calórico e excreção excessiva de ácido úrico, pois diminui o excesso de aminoácidos circulantes no sangue.

2.3 GRELINA

O hormônio grelina foi identificado no estômago de ratos por KOJIMA et al (1999). O nome grelina origina-se da palavra *ghre*, que na linguagem Proto-Indo-Européia corresponde, em inglês, à palavra *grow*, que significa crescimento. Tal peptídeo é composto por 28 aminoácidos com uma modificação octanóica no seu grupo hidroxil sobre a serina 3, essencial para o desempenho de sua função liberadora de GH (Hormônio de crescimento) (BEDNAREK et al., 2000). A princípio foi isolada da mucosa oxíntica do estômago, sendo produzida, predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal. Segundo Kojima et al. (1999), a grelina produzida em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e

coração. Trata-se de um potente estimulador da liberação de GH, nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo, sendo o ligante endógeno para o receptor de GH (GHS-R). Sendo assim, a descoberta do hormônio evidenciou um sistema regulatório para a secreção de GH distinto da regulação mediada pelo GHRH (Hormônio liberador de hormônio de crescimento). É importante lembrar que o GH é um dos hormônios mais importantes em se tratando de galactopoiéticos e exerce influência na distribuição de nutrientes para a produção de leite em vacas lactantes (SEJRSEN et al., 1999).

Além de atuar na liberação de GH, a grelina contribui em outras atividades importantes, tais como: estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, influência sobre o eixo hipofisário-gonadal, atividade orexígena acoplada ao controle do gasto energético; controle da secreção ácida e da motilidade gástrica, influência sobre a função endócrina pancreática e metabolismo da glicose e ainda ações cardiovasculares e efeitos antiproliferativos em células neoplásicas (KOJIMA et al., 1999; DATE et al., 2000).

Estudos revelam que a grelina desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos regulando a ingestão alimentar e o balanço energético (NAKAZATO et al., 2001). Romero et al (2006), por intermédio de testes, constatou que a grelina, administrada periféricamente ou centralmente, independentemente do GH, diminui a oxidação das gorduras, aumenta o consumo e a adiposidade. Assim, esse hormônio parece estar envolvido no estímulo para iniciar uma refeição (ROSICKÁ et al., 2003). Segundo Romero et al (2006), o hormônio da grelina está diretamente ligado na regulação do balanço energético. Concentrações circulantes de grelina aumentam durante jejum prolongado e em estados de hipoglicemia diminuem após a ingestão de alimentos.

Salbe et al (2004), confirma isto em seu estudo realizado com os índios Pima, mostrando uma relação inversa entre níveis de grelina e a ingestão energética. Após a refeição a concentração de grelina caía, retornando progressivamente. Estudos prévios demonstram que não é o volume total ingerido que diminui a concentração de grelina no sangue, mas sim alguns macronutrientes presentes no alimento que propiciam uma diminuição da concentração do hormônio. Sua concentração plasmática é reduzida após ingerir alimentos ricos em carboidratos, concomitantemente à elevação de insulina plasmática. Porém, já se observou que níveis plasmáticos aumentados de grelina foram encontrados após

refeições ricas em proteína animal e lipídeos. Entretanto houve um pequeno aumento da insulina plasmática.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são representados por todo e qualquer fenótipo molecular derivado de um gene expresso ou de um segmento de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Em 1953 houve a descoberta da estrutura do DNA, e com a tecnologia do DNA recombinante junto ao advento dos marcadores moleculares, ambos propostos na década de 1970, facilitaram a seleção de melhores genótipos e tornou-se mais eficiente. Tendo em vista que a capacidade de produção de um animal é o resultado entre o material genético e a interação do ambiente, os marcadores representariam maiores e melhores possibilidades de seleções, através do genótipo, antes mesmo da expressão fenotípica (COUTINHO et al., 2010).

Os primeiros relatos do uso de marcadores moleculares em animais de produção foram no início dos anos 80. Os primeiros estudos em suínos usaram marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (CHARDON et al., 1985). Nos anos seguintes, foram realizados os primeiros estudos para isolar e caracterizar marcadores do tipo SSR (Simple Sequence Repeats). Esforços significativos foram empregados para identificar microssatélites em suínos (JOHANSSON et al., 1992). Esse avanço tecnológico permitiu diversos benefícios, principalmente as bases moleculares desde tipo de marcador. No início houve a genotipagem destes marcadores com o uso de radioisótopos. Ao longodecorrer do tempo a invenção dos sequenciadores automáticos, tornou-se possível o uso de fluorocromos para detecção dos variantes alélicos. Os primeiros mapas genéticos de interesse zotécnicos foram construídos com marcadores microssatélites (BARENDSE et al., 1994; ROHRER et al., 1994; GUERIN et al., 2003).

Um ensaio rápido que possibilita a ampliação de fragmentos de DNA específicos *in vitro* se identifica como reação em cadeia da polimerase (PCR), descoberta pelos meados da década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987). Desde então esta tecnologia tem causado um grande impacto na evolução do melhoramento genético de plantas e animais domésticos. Para a realização do procedimento são necessários três segmentos de ácidos nucleicos: a dupla fita de

DNA servindo de molde para formação de dois oligonucleotídeos (primers) específicos, de uma fita simples e complementares as fitas do molde de DNA, desenhados de modo a flanquear o fragmento a ser amplificado. É necessário também, DNA polimerase, tampões e sais e dNTPs. Essa técnica consiste em ciclos repetitivos demonstrados a seguir: (AUSUBEL et al., 2003; WEAVER, 2001). No primeiro momento ocorre a desnaturação do DNA a temperaturas de 94°C a 95°C fazendo com que as pontes de hidrogênio que unem as duas fitas se rompam. Em seguida começa o anelamento dos primers em posições específicas, a temperatura nessa fase fica em função da sequência nucleotídica dos primers variando de 30°C a 60°C. O último passo seria a extensão da sequência a ser amplificada pela ação do DNA polimerase. Ao longo dos ciclos as fitas complementares de DNA são copiadas pela extensão dos primers e se anelam em posições opostas. Cada fita de DNA amplificada serve como molde para a próxima, observando então como resultado o acúmulo exponencial do fragmento de DNA pelos dois primers. Para cada gene em específico pode ser utilizada diferentes estratégias de PCR (SÁ et al., 2002; WEAVER et al., 2001).

Recentemente, novas tecnologias permitiram a melhoria das metodologias de alto desempenho e acurácia, e baixo custo e mão-de-obra para realização, caracterização e genotipagem de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Os SNPs são extremamente abundantes nos genomas de espécies não endogâmicas. Estudos com espécies de interesse zootécnico, mostram milhões de polimorfismos SNP no genoma de um indivíduo (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2009; LI et al., 2009). Além da abundância dos marcadores SNP, suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma. A existência de SNPs no genoma não é novidade. Os trabalhos pioneiros de sequenciamento de fragmentos específicos de DNA detectaram esse tipo de polimorfismo (Orita et al., 1989). Além disso, os SNPs são a base molecular de vários marcadores moleculares que foram desenvolvidos com diferentes metodologias como RFLPs, RAPDs, AFLPs, entre outros (CAETANO, 2009).

Segundo Antonini et al (2004) RFLP ("Restriction fragment length polymorphism") entende-se por polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos pelo corte da fita dupla de DNA. Para que seja observado um polimorfismo nessa região, faz-se necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de

pelo menos dois indivíduos comparados sejam diferentes. Ainda Antonini et al (2004), a técnica de RFLP é uma estratégia muito simples e relativamente rápida de se mostrar diferenças nas sequências de DNA. Maeda et al. (1989) também afirma que a metodologia PCR-RFLP é o método mais básico para genotipagem de SNP's em regiões específicas do genoma. É uma técnica que não necessita de equipamentos muito tecnológicos, porém muito laboriosa (SAIKI et al., 1986).

Mesmo havendo diversas técnicas modernas, hoje em dia ainda são muito utilizadas as técnicas simples como a de PCR (Reação em cadeia da polimerase), PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) e sequenciamento para estudos de marcadores moleculares. Pesquisadores como Sun et al (2011), Kowalewska et al. (2011) e Tanpure et al. (2012) utilizaram as técnicas com sucesso para a detecção de polimorfismos (GIL, 2012).

O polimorfismo é detectado por meio do uso de marcadores moleculares (FALEIRO, 2007). SNP's (Polimorfismo de nucleotídeos únicos) são variações mínimas que ocorre na mudança de um único nucleotídeo na seqüência gênica, para isso o alelo no qual possui a menor frequência deve estar acima de 1% em uma dada população (GUIMARÃES & COSTA, 2002). De acordo com Guimarães (2012), a descoberta de um polimorfismo pode ser utilidade em programas com seleção assistida por marcadores, permitindo aumentar a frequência de alelos favoráveis ao melhoramento dos índices zootécnicos.

As características de importância econômica estão correlacionadas entre si, em proporções diferentes e em sentidos variados. A seleção de um gene pode acarretar alterações na expressão de outros genes, podendo ser de interesse para o melhoramento ou não. Assim é fundamental conhecer os efeitos indiretos da seleção para que o melhoramento tenha resultado positivo. Este conhecimento possibilita um progresso até, às vezes, mais eficiente do que a seleção direta (Cruz & Regazzi, 1994). Como a seleção de um gene pode interferir na expressão de outro, é indicado que se utilize um índice de seleção, que segundo Cruz et al (1994), constitui-se em um caráter adicional, ou seja, é a combinação entre várias características, tornando-se eficiente a seleção simultânea dessas. Os fatores mais importantes que interferem, direta ou indiretamente, no ganho genético são: Intensidade de seleção, propriedades genéticas da população e condições ambientais. O ganho na seleção está relacionado com o diferencial de seleção, ou seja, à diferença entre a média do grupo selecionado e a média da população original. À medida que eu aumentar a

pressão de seleção, maior será o diferencial. Porém, uma maior pressão de seleção implica em risco de redução drástica na variabilidade genética. O ganho com a seleção é maior em populações mais heterogêneas, tal ganho é devido às diferenças genéticas entre os indivíduos. Outro fator que interfere na seleção é o ambiente, visto que as condições ambientais podem interferir na expressão dos genes selecionados (Vencovsky, 1987).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram avaliadas 60 fêmeas suínas, 30 da raça Landrace e 30 da raça Large White. Os animais estavam na granja de reprodutores localizados no frigorífico Riosulense em Rio novo (SC). Pertenciam ao Programa de Melhoramento Genético Pamplona (PMG-P). As amostras de aproximadamente 50 pêlos foram coletadas da região lombar de cada animal utilizando-se uma pinça. Posteriormente acondicionadas em embalagens individuais e identificadas. As análises foram realizadas no laboratório de ensino e pesquisa em genética animal, localizado na Universidade Federal de Santa Catarina no Centro de Ciências Agrárias em Florianópolis.

Posteriormente, cerca de 30 folículos/animal foram transferidos para tubos de micro-centrifuga (1,5 ml) identificados com a numeração do animal e mantidos a -20°C , para manter a integridade da amostra, até o momento da extração do DNA genômico.

A extração do DNA genômico dos folículos pilosos foi realizada utilizando o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, adaptado de Lima (2003). Inicialmente, foram adicionados 500 μl de solução TE-TWEEN (ANEXO I) em cada tubo, seguido de incubação no banho a 65°C por 1,5 horas, posteriormente adicionou-se 2 μL de proteinase K (600 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e incubou-se a 55°C por 6 horas. Posteriormente as amostras permaneceram incubadas, reduzindo a 37°C por uma noite como determina o protocolo.

Ao final da incubação, adicionou-se 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool-isoamílico – 25:24:1) para um volume de amostra e agitou-se os tubos vigorosamente por 10 segundos em agitador automático. Em seguida, foi realizada centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C , sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, resultando em um volume final de aproximadamente 300 μL .

Na sequência, foi executada a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 μL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1000 μL). Prosseguiu-se com uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 25 minutos a 4°C . Finalizou-se com o descarte do sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida armazenado em 100 μL de água ultra pura.

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific®) utilizando-se como parâmetro as amostras que apresentaram concentração igual ou superior a 100 ng/ul e relação A260/280 entre 1,8 a 2,0.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para isolar a região estrutural do gene da grelina, foram desenhadas com base nas informações disponíveis no GenBank (DQ663493, AY3730191 e AB5628971). O par de iniciadores gerado apresentou as seguintes sequências, respectivamente: GHR2 - Forward – 5' CCGAACACCAGAAAGTGCAG 3'; GHR2 – Reverse - 5' GGGACGGGGACTTACCATTG 3', com posição de anelamento abrangendo a região estrutural do gene da grelina correspondente ao Exon II e parte dos Introns I e II.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL/amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada “primer”, tampão PCR 1X, 100 µM de dNTPS, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, com a seguinte programação: 95°C por 5 minutos (desnaturação do DNA inicial); 95°C por 30 segundos (desnaturação do DNA no ciclo); 52°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores); 72°C por 30 segundos (extensão do DNA no ciclo); as etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidas em 35 ciclos. Após estes ciclos, as amostras foram mantidas a 72°C por 5 minutos até inatividade enzimática seguidas de manutenção a 4°C.

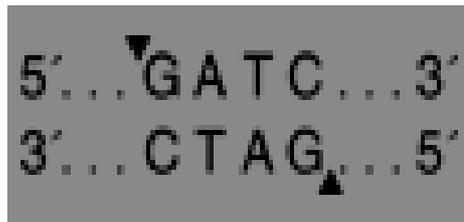
Para verificar o resultado da reação de amplificação, uma alíquota de cinco µL de cada amostra foi diluída em 3µL de azul de Bromofenol, xileno-cyanol e glicerol e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,05 µG/ml) a 80V por aproximadamente 50 minutos. Após esta etapa, o gel foi exposto a luz U.V e foto documentado para confirmação da eficiência da PCR.

Após o isolamento, e a amplificação da região de interesse do gene da grelina pela PCR, as amostras foram submetidos à técnica de PCR-RFLP, que consiste na digestão por enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas de bases no DNA, em que a alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus do genoma, gerando um polimorfismo. Dessa forma, se o DNA for digerido com a enzima de restrição

adequada, o locus polimórfico pode ser observado pela alteração no tamanho do fragmento do DNA.

Neste estudo, foi utilizada, nas reações de RFLP, a enzima de restrição Mbo-I (New England BioLabs®). A sequência palindrômica e o sítio de restrição desta endonucleases está representado na Figura 1.

Figura 1. Sítio de restrição da enzima Mbo-I.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

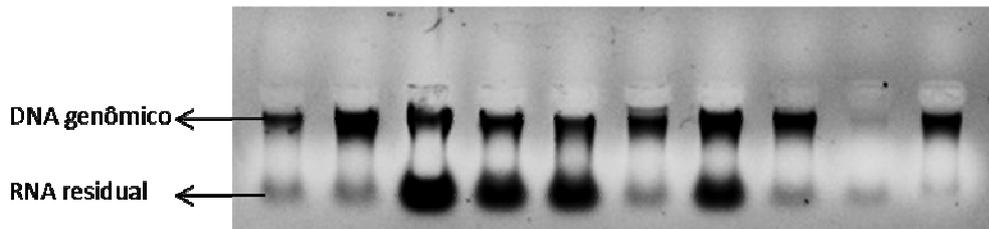
As digestões foram realizadas em um volume de 20 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 5 unidades de cada enzima restrição. As amostras foram digeridas por uma hora a temperatura de 37°C em termociclador Biometra®.

Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,0%), em tampão TBE 1X com brometo de etídio a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta e o gel foi foto documentado.

4 RESULTADOS

Os procedimentos de extração do DNA genômico pelo método adotado mostraram-se eficientes para todas as amostras consideradas neste estudo. Na Figura 2 é possível visualizar as bandas de DNA extraído das amostras de pelos dos animais.

Figura 2: Resultado das extrações de DNA utilizando o método de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico), adaptado por Lima (2003)



Fonte: elaborado pelo autor, 2014

É possível também, observando a Figura 2, verificar que as amostras apresentaram RNA após as extrações. Entretanto, a presença deste ácido nucleico não interferiu na realização das etapas seguintes deste estudo, isto é, as análises de PCR e RFLP. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2003), autora do qual esta metodologia foi adaptada, e Camargo et al. (2008), que também utilizaram este procedimento para extração de DNA de pelos bubalinos.

Os resultados obtidos nas análises de PCR estão ilustrados na Figura 3.

Figura 3: Resultados das análises de PCR em volume final de 25 μ L/amostra, contendo 0,5 μ M de cada "primer", tampão PCR 1X, 100 μ M de dNTPs, 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®)

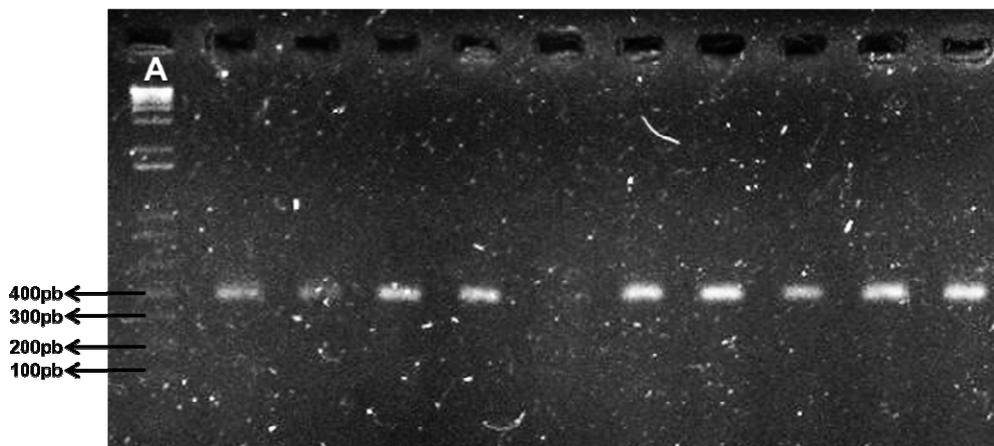


Figura 3. Imagem representativa do resultado das análises de PCR Com os iniciadores GhrR2 FWD e REV. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) .

Nesta figura é possível verificar que os iniciadores GHR2 FWD e REV, utilizados nas reações de PCR foram eficientes em isolar e amplificar a região de interesse do gene da grelina, gerando amplicons de aproximadamente 400pb em todas as amostras.

Após a realização da PCR, as amostras foram então digeridas com a enzima Mbo-I, na aplicação da técnica de RFLP. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Figura 4: Resultado das análises de RFLP, utilizando a enzima Mbo-I (New England BioLabs®), com volume final de 20 µL/amostra contendo 10 µL do produto de PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 5 unidades de cada enzima de restrição.

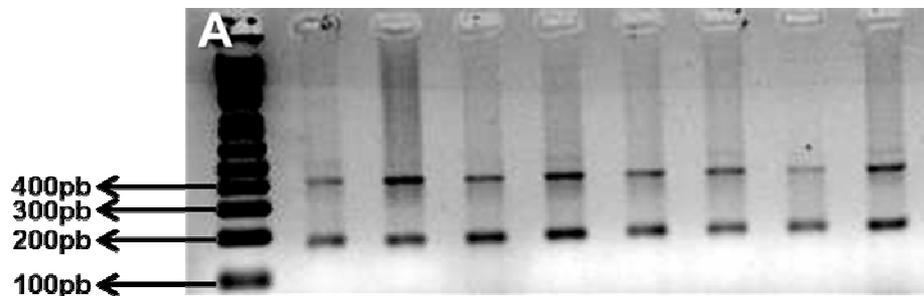


Figura 4. Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease Mbo-I. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) .

Foram gerados dois fragmentos, com aproximadamente 400pb e 200pb, respectivamente, após a digestão dos produtos de PCR. Entretanto, o mesmo padrão de migração de bandas foi obtido em todas as amostras testadas, evidenciando um monomorfismo para a região estudada do gene da grelina, utilizando-se a enzima Mbo-I. De acordo com Ayres (2006), a ocorrência de monomorfismos genéticos pode ser atribuída ao fato dos animais avaliados já integram um programa de seleção. Desta forma, pode-se inferir que a seleção para

outras características possa ter gerado, indiretamente, uma diminuição na variabilidade genética da população.

Embora os resultados deste trabalho tenham mostrado monomorfismo para a região estudada, é possível que existam sítios polimórficos para o gene da grelina associados à outras enzimas de restrição. Wojtysiak e Kaczor (2011) encontraram polimorfismos no gene da grelina em suínos Landrace utilizando a técnica de PCR-RFLP com a enzima Brs-I. Isto indica que estudos futuros ainda são necessários, testando-se outras enzimas ou outras técnicas de identificação de polimorfismos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na extração de DNA utilizando o Método de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, adaptado por Lima (2003) mostrou-se eficiente, possibilitando separar o material genético dos demais componentes da célula de origem do DNA. Para o teste de PCR, os iniciadores FORWARD e REVERSE construídos através de informações no GenBank, mostraram-se eficientes em isolar e ampliar o sítio de interesse, ou seja, a região estrutural do gene da grelina correspondente ao Exon II e Introns I e II. A enzima MboI mostrou-se eficiente em clivar os sítios de restrição na técnica de PCR-RFLP, porém, os resultados encontrados nas 60 amostras foram negativo para o polimorfismo, levando a conclusão de que a migração dos fragmentos no Gel de agarose (2%) na eletroforese demonstraram-se com o mesmo padrão, evidenciando assim um monoformismo.

REFERÊNCIAS

ANTONINI, S. R. C.; Meneghin, S. P.; Urashima, A. S. Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Araras, SP. Jul. de 2004. **Apostila**.

AUSUBEL, F. M.; Brent, r.; Kingston, R. E.; Moore, d. d.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley , 2003. 4755 p.

BARENDSE, W.; Armitage, S.M.; Kossarek, L.M. et al. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v.6, n.3, p.227-35, 1994.

BEDNAREK, M. A.; Feighner, S. D.; Pong, S. S.; Mckee, K. K.; Hreniuk, D. L.; Silva, M. V.; Warren, V. A.; Howard, A. D.; Van Der Ploeg, I.H.; Heck, J. V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: Minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **J. Med. Chem.**, v. 43, n.23, p. 4370–4376, 2000.

BELLAVER, C.; Ludke, J. V. Considerações sobre os alimentos alternativos para dietas de suínos. In: **ENCONTRO INTERNACIONAL DOS NEGÓCIOS DA PECUÁRIA. ENIPEC**. Cuiabá. 2004.

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.324,n.5926, p.522-528, 2009.

BURT, D. W.; Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, 58 (1): 5-13, 2002.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no Manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 38, 64-71, 2009.

CONHALATO, G.S., 1998. **Exigência de lisina digestível para frangos de corte machos**. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástricos) – Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV. 79p.

COUTINHO, L. L.; Fernandes, M.; Jorge, E. C. Biotecnologia Animal. Estudos Avançados. **Scielo Brasil**. v.24.n.70, 2010.

CHARDON, P.; Vaiman, M.; Kirszenbaum, M.; et al. Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the pig. **Immunogenetics**, v.21, n.2, p.161-71, 1985.

CRUZ, A. F. ; SOUZA, A. G. ; RIBEIRO, F. L. Estimativas do volume de dejetos suínos na região de Rio Verde – Goiás. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, XLIV., 2006, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2006. (CD-ROOM).

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, imprensa universitária, 1994. Cap.4, p. 103-129: Ganhos por seleção.

DATE, Y. ; KOJIMA, M. ; HOSODA, H. ;, SAWAGUCHI, A. ; MONDAL, M. S. ; SUGANUMA, T. et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rat and human. **Endocrinology**. 2000; 141(11):4255-61.

DEKKERS, J. C. M.; Breeding in the 21th century: application of molecular technology. Proc. Assoc. **Advmt. Anim. Breed. Genet.** V. 13, p. 1-16, 1999.

FERREIRA, M. E. ; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3, ed. Brasília: **Embrapa**, 222 p.

GIL, F. F. M., **Polimorfismo no Gene do Hormônio Grelina em Búfalas (Bubalus Bubalis) e sua Associação com Produção e Qualidade do Leite**. Tese de Doutorado, (Programa de Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campos de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, 2012.

GUÉRIN, G. ; BAILEY, E. ; BERNOCO, D. et al. The second generation of the International Equine Gene Mapping Workshop half-sibling linkage map. **Animal Genet**, v.34, n.3, p.161- 168, 2003.

GUIMARÃES, P. E. M. ; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças entre um código. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.26, p.24-27, 2002.

GUIMARÃES, S. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: Fepmvz Editora, 2012. p. 614-647.

GONÇALVES, R.G., PALMEIRA, M. E. Suinocultura Brasileira. **Revista Brasileira de Economia**. n. 71, 2006. Disponível em <<http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/06/rgg.htm>> Acesso em: 29 maio 2014.

INOUE, Keles Regina Aantony. **Estimativa do potencial de emissão de gases de efeito estufa em diferentes sistemas de tratamento de águas residuárias da suinocultura**. 2013. 75 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dea/ambiagro/gallery/publicações/tesekelesds.pdf>>. Acesso em: 29 maio 2014.

JOHANSSON, M.; Ellegren, H.; Andersson, L. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. **Journal of Heredity**, v.83, n.3, p.196-198, 1992.

KOJIMA, M.; Hosoda, H.; Date, Y. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, p. 656-660, 1999, London.

KOWALEWSKA, Łuczak, I.; Szembek, M.; Kulig, H. Ghrelin gene polymorphism in dairy cattle. **Journal of Central European Agriculture**, v. 12, n. 4, p. 744-751, 2011.

LIMA, Silmara Paula Gouveia. Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino, em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. **Dissertação Mestrato**). Univerisade Estadual Paulista, FCAV, 2003.

LI, R.; LI, Y.; FANG, X. et al. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. **Genome Research** [Epub ahead of print], May 6, 2009.

LOPES, P.S. **Melhoramento Genético de Suínos**. Viçosa, MG. (2004).

MAEDA, M.; Murayama, N.; Ishii, H. et al. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**, v.34, n.5, p.290-298, 1989.

MIELE, M.; Machado, J. S. Panorama da carne suína brasileira. **Especial Suinocultura**, jan. de 2010.

MILAZZOTTO, M. P. **Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas Bos primigenius indicus (Nelore)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2001.

MULLIS, K.; Faloona, F. *Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction*. **Methods of Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NAKAZATO, M.; Murakami, N.; Date, Y.; Kojima, M.; Matsuo, H.; ANGAWA K. *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. **Nature**, v. 409, p. 194-198, 2001.

ORITA, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H. et al. *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as singlestrand conformation polymorphisms*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.86, n.8, p.2766-70, 1989.

PINTO, R., 2002. **Exigência de metionina mais cistina e de lisina para codornas japonesas nas fases de crescimento e de postura**. Viçosa: UFV, 104p. Tese (Doutorado em Nutrição de Monogástricos) – Universidade Federal de Viçosa.

ROHRER, G.A. ; ALEXANDER, L.J. ; KEELE, J.W. et al. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v.136, n.1, p.231-45, 1994.

ROMERO, C. E. M.; Zanesco, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 1, 2006.

ROPPA, L. **Carne suína: mitos e verdades**. 2001 Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br>>. Acesso em: 15 maio 2014.

ROPPA, Luciano. Tendências da suinocultura mundial e as oportunidades brasileiras. **ANUALPEC**, 2002. p. 281-284.

ROSICKA M, Krsek M, Matoulek Z, Jarkovska Z, Marek J, Justova V, et al. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. **Physiol Res**. 2003; 52(1):61-6.

SÁ, . F. G. De; BATISTA, j. A. N.; oliveira neto, o. B.; fragoso, r.R.; monteiro, a. C. Clonagem e expressão de genes. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, 52 p. **Apostila**.

SAIKI, R.K.; Bugawan, T.L.; HORN, G.T. et al. *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes.* **Nature**, v.324, n.6093, p.163-166, 1986.

SALBE AD, Tshop MH, Delparigi A, Venti C, Tataranni PA . *Negative relationship between fasting plasma ghrelin concentrations and ad libitum food intake.* **J Clin Endocrinol Metabol**. 2004; 89(6):2951-6.

SEJRSEN, K.; Purup, S.; Vestergaard, M.; Weber, M. S.; Knight, C. H. Growth hormone and mammary development. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 17, p. 117–129, 1999.

SILVEIRA, P. R. S.; Talamini, D. J. D. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Revista CFMV**, Brasília, v. 13, n. 42, p. 11-20, 2007.

SUN, J.; Jin, Q.; Zhang, C.; Fang, X.; Gu, C.; LEI, C.; Wang, J.; Chen, H. *Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (GHRL) and Syndecan-1 (SDC1) genes that are associated with growth traits in cattle.* **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 3153–3160, 2011.

TANPURE, T.; Dubey, P. K.; Singh, K. P.; Kathiravan, P.; Mishra, B. P.;Niranjan, S. K.; Katarai, R. S. Pcr-sscp Analysis of leptin gene and its association with milk production traits in river buffalo (*Bubalus bubalis*). **Trop Anim Health Prod**, 2012.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (ed.) **Melhoramento e produção e milho**. Cmapinas: Fundação Cargill, 1987, v.1, p. 137-214.

WEAVER, R. F. Molecular biology. Lawrence. University of Kansas, 2001. 880 p.

WOJTYSIAK, D. & KACZOR, U. Effect of polymorphisms at the ghrelin gene locus on carcass, microstructure and physicochemical properties of longissimus lumborum muscle of Polish Landrace pigs. **Meat Science**, v.89, p.514-18, 2011.