

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA

GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MILENA LEMES

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DE
ESTRÓGENO EM SUÍNOS

FLORIANÓPOLIS, SC

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA

GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MILENA LEMES

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DE
ESTRÓGENO EM SUÍNOS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado no curso de Graduação em
Zootecnia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para
obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira
Lima.

FLORIANÓPOLIS, SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lemes, Milena
/ Milena Lemes ; orientador, André Luís Ferreira Lima,
2022.
29 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Marcadores Moleculares. 3. Landrace.
4. Large White. 5. Reprodução. I. Luís Ferreira Lima, André
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Zootecnia. III. Título.

Milena Lemes

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR
DEESTRÓGENO EM SUÍNOS**

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada, aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2022

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Andre Luis Ferreira Lima
Data: 17/03/2022 09:51:23-0300
CPF: 277.135.588-45
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

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



Documento assinado digitalmente
Lucelia Hauptli
Data: 17/03/2022 10:01:52-0300
CPF: 934.061.930-72
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

**Prof.^a Dr.^a. Lucélia Hauptli,
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina**



Documento assinado digitalmente
Priscila Arrigucci Bernardes
Data: 17/03/2022 10:19:47-0300
CPF: 365.913.148-22
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

**Prof.^a. Dr.^a. Priscila Arrigucci Bernardes,
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha
família Sergio, Gessy e Luana.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Sergio Lemes e Gessy Lemes, por sempre estarem dispostos a me apoiar e compreender ao longo dos anos. Todos esses anos de dedicação e esforço para alcançar meus objetivos só foram possíveis por conta deles. A minha irmã Luana Lemes que sempre será meu ponto de apoio e exemplo de força.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima por acreditar nas minhas visões, ensinar a ter paciência e mostrar que até mesmo em momentos difíceis devemos acreditar nas nossas capacidades.

As professoras e amigas Lucélia Hauptli e Priscila de Oliveira Moraes que a cada conversa e aula fizeram eu me apaixonar ainda mais pela profissão, mostrando como é essencial sempre seguir se aperfeiçoando e nunca parar de aprender.

Agradeço aos professores Márcio Cinachi Pereira, Sandra Regina Teixeira Carvalho, Diego Peres Netto, Milene Puntel Osmari e Fabiano Dahlke por me incentivarem e motivarem a ser uma excelente profissional, além de, servirem como inspiração de coragem, desenvolvimento e conhecimento.

Aos meus amigos Marina Marly Dalla Betta, Luiz Felipe Rodrigues Nogueira, Ríllary Niehues Wiggers e Luis Knoth que em meio a uma pandemia nossa amizade permaneceu da mesma forma, servindo de pilar para todas as minhas conquistas.

Ao meu amigo Gustavo Volpato por todo apoio e energia que dá para que todas as coisas aconteçam da melhor forma possível.

A minha colega de Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal – LEPGA Aline Chiarelli Cristofolini que sempre me instruiu com muita paciência e disposição.

As minhas companheiras de estágio Rafaela Weis Stralotto, Natalia Marques da Silva, Alexandra Nichele e Marina Botega Lang que juntas fizeram os momentos de estágio os mais divertidos e memoráveis.

“Não há atalhos para nenhum destino onde se vale a pena chegar.”

(Beverly Sills)

RESUMO

A principal fonte de proteína animal do mundo é a carne suína, o que coloca o Brasil em destaque neste segmento ao possuir a quarta posição mundial em total de produção. O Hormônio Receptor de Estrógeno – ESR é um hormônio esteroide e seus receptores desempenham no organismo dos animais um papel importante durante a reprodução, principalmente quando o tamanho da leitegada é determinante para o desenvolvimento da produção ao longo dos anos, sendo proposto, portanto, estudar esse gene como um candidato para identificação de marcadores genéticos de interesse econômico. O ganho genético dentro dos programas de melhoramento genético da espécie pode ser otimizado caso essas variações genéticas entre os indivíduos estejam associadas a características de interesse econômico na suinocultura. Objetivou-se verificar a possível existência de polimorfismos no gene Receptor de Estrógeno em reprodutores suínos das raças Landrace e Large White. Os folículos pilosos coletados foram submetidas à extração de DNA pelo método Fenol-Clorifórmico-Álcool-Isoamílico, e o DNA genômico extraído foi quantificado e amplificado mediante a PCR, para verificar o resultado da reação de amplificação, as amostras foram expostas à eletroforese. As amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *PvuII*. Diante do estudo, observou-se que a marcação molecular com a técnica de PCR RFLP utilizando a enzima *PvuII* apresentou padrão polimórfico para o grupo de animais avaliados. Foram identificados os padrões de migração AA, Aa e aa, e as frequências alélicas obtidas foram A= 0.345 e a= 0.655.

Palavras chave: Marcadores Moleculares; Landrace; Large White; Reprodução; RFPL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultado das extrações de DNA utilizando o método de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico), adaptado por lima (2003).....	21
Figura 2: Imagem do resultado das análises de PCR com os iniciadores. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.	21
Figura 3: Imagem do resultado das análises de RFLP. Gel de agarose a 3,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.	22
Figura 4: Padrões de migração encontrados nas amostras de RFLP-pela enzima PvuII.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequências genotípicas e frequências alélicas obtidas na população ($p < 0,05$) * ... 23

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1. Realidade da suinocultura atual e sua importância econômica.....	12
3.2. Raças – Landrace e Large White	14
3.3. Melhoramento genético na suinocultura.....	15
3.4. Hormônio Receptor de Estrógeno (ESR).....	16
3.5. Marcadores moleculares e polimorfismo do tipo SNP	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Coleta de amostras e extração de DNA genômico	18
4.2. Análises de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR).....	19
4.3. Análises de Polimorfismo de tamanho dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) .	20
4.4. Procedimentos estatísticos	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
7. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é utilizada pela humanidade como fonte eficiente de alimento, primeiramente pela forma simples de produção, além de, sua carne e seus subprodutos possuírem alto valor nutricional. Até o início da década de 1960, os suínos tinham como principal objetivo a obtenção de gordura, utilizada no consumo, preparo e conservação dos alimentos (MORAES et al., 2012).

Verificou-se diversas mudanças no produto que se busca na produção dos suínos nas últimas décadas, sendo um animal que, em sua grande maioria atualmente é destinado a industrialização, perante um rendimento maior de carne se comparado a gordura na carcaça. Essa mudança significativa de rendimento é resultado da modificação dos hábitos de consumo alimentar e de vida da população, que iniciando a utilização mais intensa de óleo vegetal em detrimento da gordura animal no preparo dos alimentos e a busca por cortes da carne mais magros. (DEIMLING, 2014)

Analisando o comportamento de consumo da carne suína é possível avaliar o funcionamento da cadeia produtiva. Segundo ARAGÃO e CONTINI (2021), a carne suína é a mais consumida mundialmente, sendo a China principal consumidor e produtor, seguida da União Europeia, Estados Unidos, Brasil, Rússia e Vietnã, sendo que de acordo com a EMBRAPA (2021) esses países representaram 89% do consumo global em 2021.

O mercado consumidor é o fator determinante na demanda e preferência no setor de carnes. O aumento da renda, crescimento populacional e a urbanização geram um aumento da rigidez nessa demanda e, se for considerado esses fatores, o crescimento do consumo em países desenvolvidos ocorre de maneira mais lenta que os que estão em desenvolvimento. Além dos, fatores internos do mercado consumidor, pois o uso econômico de qualquer espécie de animal doméstico também depende de seu potencial eficiência de produção.

O desenvolvimento de técnicas moleculares influenciou na compreensão de como os genes afetam as características de interesse econômico, tornando acessível o reconhecimento e a utilização de polimorfismos de DNA com marcadores moleculares (LEDUR, 2001). Por meio dessa identificação é possível selecionar os indivíduos que possuem alelos vantajosos para os genes envolvidos, os quais, podem estar associados a uma ou mais características fenotípicas.

Se estes polimorfismos existirem e forem capazes de ser associados a características de interesse econômico favoráveis à suinocultura, como maior precocidade sexual e a capacidade

reprodutiva, genes relacionados com hormônios reprodutivos, como por exemplo o gene receptor de estrógeno, poderão ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares, proporcionando, desta forma, maior ganho genético para estas características.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a ocorrência de polimorfismo na região estrutural do gene receptor de estrógeno, utilizando a da técnica de PCR-RFLP, em uma população de suínos reprodutores da raça Landrace e Large White, de modo a verificar a possível viabilidade de implementação de um programa de seleção assistida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

De maneira geral, este projeto foi conduzido no intuito identificar polimorfismos no gene do Hormônio Receptor de Estrógeno (ESR) em suínos, utilizando técnicas que possuem acurácia na detecção de SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) associadas ao baixo custo de aplicação relativo ao número de indivíduos avaliados.

2.2. Objetivos específicos

Extrair o DNA genômico de amostras de pelos (folículos) previamente coletadas (CEUA/UFSC - PP00873)

Isolar e amplificar uma região específica do gene ESR nos animais a partir do DNA genômico, utilizando a técnica de PCR;

Identificar a possível existência de polimorfismos do tipo SNP utilizando a técnica de RFLP para, em havendo polimorfismos na região isolada, genotipar os animais na população estudada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Realidade da suinocultura atual e sua importância econômica

Nas últimas décadas o Brasil teve um crescimento elevado na produção de suínos, resultado de investimentos em ampliações e evolução de produtividade nas granjas. Segundo a ABCS (2016) ocorre uma diferenciação no sistema de produção dependendo da região do país, em que nos estados no Sul em sua maioria os produtores são de granjas com até 500 matrizes, sendo integrados ou cooperados de agroindústrias. Na região Sudeste há predominância de produtores independentes. Nos estados do Centro-Oeste observa-se as maiores escalas de produção por propriedade, tendo em média 1000 matrizes e, por fim, as regiões Norte e Nordeste tem 100% de sua produção independente e em pequena escala.

A produção da carne suína em 2021 foi marcada por crescimentos expressivos em relação ao mesmo período do ano de 2020, estando ainda posicionada como maior responsável pela oferta de proteína animal (ABPA, 2021). Todavia, há previsões que de que produção de aves ultrapassará a carne suína, tornando-se a encarregada pelo maior fornecimento de alimentos de origem animal nas próximas décadas (NEVES et al., 2016). O crescimento da produção de

suínos em média é de 0,5% ao ano, sendo que 1995 a 2015 teve um aumento de 42%, passando de 78,2 milhões de toneladas para 111,7 respectivamente (CIAS, 2020). Porém, em 2020 houve uma queda para 101 milhões de toneladas e essa redução está relacionada à problemas sanitários com a Peste Suína Africana (PSA), em que observou-se maiores proporções na China, mas também no Vietnã, nas Filipinas e nos Estados Unidos. Apesar disso, as estatísticas indicam um aumento na produção global podendo chegar a 130 milhões de toneladas em 2024 (FAO, 2019).

A China, maior produtora mundial teve um aumento produtivo até 2013 com o ápice de produção em 58.137 milhões de toneladas, uma redução para 54.316 toneladas em 2016, e para 36.000 toneladas em 2020. Essa queda de produção, como já mencionado está relacionada a problemas sanitários envolvendo o surto de PSA, assim, sucedendo a diminuição do alojamento de matrizes, decréscimo dos preços dos animais e drástica queda no ritmo da produção (DO CARMO KLAUS et al., 2020).

A União Europeia, segundo maior produtor, rendeu em 2016 um total de 23.671 milhões de toneladas, tendo um índice de crescimento de 2,44% em 2020 subindo para 24.250 milhões de toneladas (CIAS, 2020). Os Estados Unidos, terceiro maior produtor, em 2016 produziu 11.491 milhões de toneladas, com um crescimento médio anual de 2,19% até 2020 chegando em 12.999 milhões de toneladas. Esse crescimento dos valores é reflexo de investimentos que ocorreram nos últimos anos, crescimento na quantidade de animais abatidos e melhoria no ganho de peso das carcaças. (USDA, 2020)

Com uma produção de 3.724 milhões de toneladas em 2016, e um aumento de 2,89% anualmente até 2020, atingindo 4.155 milhões de toneladas, o Brasil se consolida como quarto maior produtor mundial de suínos (NEVES et al., 2016). Apesar de, ser um dos maiores exportadores ocupando a 4ª posição, apenas 19% da produção nacional é exportada, isso significa que, 81% fica destinada ao mercado interno (ARAGÃO e CONTINI, 2021). O mercado de suínos está pleno crescimento e será necessário procurar opções que contribuam para otimizar cada vez mais esses índices (FERREIRA et al., 2020).

Para isso, é importante avaliar como a pandemia estabelecida no ano de 2020, pelo Coronavírus (COVID-19) afetou praticamente todos os setores do mercado, e quais foram seus impactos no mercado. Observou-se uma redução na demanda interna devido à restrição e fechamento de restaurantes e lanchonetes, e passou-se a se concentrar apenas nos supermercados (SCHENEIDER et al., 2020). Apesar disso, as exportações continuaram

crecentes, uma pesquisa realizada por ARAGÃO e CONTINI (2021) em abril de 2020 demonstrou que a carne suína teve um volume corresponde a 34% maior do que no mesmo trimestre do ano anterior. Além de que, a receita das exportações foi 53,5% superior quando registrada no mesmo período de 2019.

Entender os processos que a produção de suínos enfrentou ao longo dos anos no Brasil, ajuda a entender quais podem ser as metodologias utilizadas para melhorar ainda mais os índices produtivos. A suinocultura brasileira é marcada por quatro principais processos produtivos, sendo que a tecnificação, profissionalização, integração e consolidação (NEVES et al., 2016). Os primeiros avanços tecnológicos importantes surgiram entre as décadas de 1950 a 1970, quando ocorreu a criação da maioria das associações de produtores nacionais, estaduais e locais, e esses desenvolvimentos tinham sobretudo o foco no melhoramento genético dos rebanhos planejando um aumento de produtividade (GONÇALVES e PALMEIRA, 2006).

Com os avanços nos processos de melhoramento genético, ocorreu desenvolvimento das pesquisas e experimentos para melhoria da sanidade e nutrição animal, não visando mais apenas a produtividade, mas sim a qualidade da carne (FÁVERO, 2015). Essas evoluções acompanhadas de melhores práticas, processos e sistema de gestão, podem fazer com que o produtor tire o máximo de proveito dessas tecnologias, a quais ele passou a ter acesso, controlando seus custos e melhorando sua rentabilidade (MORAES e CAPANEMA, 2012).

Por conta do alto investimento em tecnologias, a suinocultura brasileira tem apresentado ganhos de produtividade, evidenciados por um maior número de leitões produzidos por matriz, pela redução da conversão alimentar e aumento do ganho de peso, refletindo diretamente no crescimento da produção (MIELE et al., 2011).

Pensando na produção de alimentos do futuro, deve-se considerar o aumento da população mundial, que chegará a 9 bilhões de habitantes em 2050, por isso será necessário produzir alimentos para mais 2 bilhões de pessoas, considerando a necessidade de reduzir custos de produção (MARIN et al., 2016). Com isso, a intensa evolução em pesquisas e tecnologias de métodos já existentes e novos que contribuam com esses fatores é fundamental para a evolução da competitividade da produção brasileira no futuro.

3.2. Raças – Landrace e Large White

Assim como em outros países dedicados aos mercados de exportação, a produção comercial é desenvolvida utilizando cruzamentos entre raças para obter maiores índices de

produtividade (PASTRE et al., 2013). Os descendentes desses animais com alto valor genético para as características de produtividade e reprodutivas gera retorno financeiro para os criadores e satisfaz a demanda do consumidor (LÁZARO et al., 2015) Por isso, é importante ter conhecimento sobre as principais características de origem e fenotípicas, além das principais vantagens das raças trabalhadas.

A raça Landrace tem como origem a norte da Espanha e regiões de Portugal, França e Itália. Tem como principais características fenotípicas a pelagem branca, grande profundidade e comprimento corporal, além de, um perfil cefálico e retilíneo com orelhas do tipo céltico (ABCS, 2014). São utilizados em cruzamentos, principalmente nas linhas maternas, isso por ter como fatores favoráveis a precocidade sexual, prolificidade, grande capacidade de produção de leite com 6 a 8 pares de tetos, baixa deposição de gordura, altas taxas de crescimento e eficiência alimentar (DIAS, 2011)

A raça Large White é originária do condado de Yorkshire na Inglaterra. Tem como principais características pelagem branca, orelhas eretas, perfil fronto nasal subconcavilíneo e concavilíneo (ABCS, 2014) As linhas materna e paterna são utilizadas para cruzamentos, isso por fatores como precocidade sexual, alta prolificidade, 6 a 8 pares de tetos, excelente taxa reprodutiva e crescimento diário com produção de carcaças com alto rendimento e qualidade de carne (DIAS, 2011)

3.3. Melhoramento genético na suinocultura

O mecanismo básico do melhoramento genético animal consiste na seleção dos progenitores geneticamente superiores para as características de interesse, e dos sistemas de acasalamento destes progenitores, geralmente baseados em seus respectivos parentescos e distâncias genéticas. Para aprimorar os genótipos disponíveis, assim como também determinar os melhores acasalamentos, são utilizados conceitos de genética e estatística, com o objetivo de obter uma população de filhos superior à média dos pais, para adquirir avanços por um longo período para as características desejadas. Realiza-se esse procedimento para obter acasalamentos vantajosos. Os reprodutores considerados melhores são identificados, sejam eles machos ou fêmeas, por meio do valor genético das características de relevância para a seleção (PEIXOTO et al., 2014).

3.4. Hormônio Receptor de Estrógeno (ESR)

A reprodução exerce um papel muito importante para o sucesso da produção animal, principalmente quando o tamanho da leitegada é determinante para esse desenvolvimento, pois, se considerado o custo de produção dos leitões observa-se que é inversamente proporcional ao tamanho da leitegada (KMIEC et al., 2002). Como os números de leitões estão associados a genes reprodutivos é difícil de selecioná-lo, visto que, é uma característica considerada de baixa herdabilidade.

ROSTHSCHILD et al (1995) identificaram a mutação no gene receptor de estrógeno (ESR) em suínos, no ano seguinte o associou a características reprodutivas, e o correlacionou principalmente ao tamanho da leitegada. O ESR está localizado no final do primeiro ramo cromossômico dos suínos (p25 – p24) e é um gene candidato para características reprodutivas. Este pertence ao grupo intracelular de receptores, e tem o comprimento da proteína de 595 aminoácidos, sendo igual para suínos e humanos (TERMAN et al., 2006).

Os hormônios esteroides e seus receptores desempenham no organismo dos animais um papel importante durante a reprodução. No decorrer do estágio inicial, as células em tecidos alvos possuem proteínas que se conectam especificamente ao hormônio, sendo que, o Estrogênio está estritamente envolvido com a gravidez, e sua função é regulada pelo receptor de estrógeno (ER) (ROSTHSCHILD et al., 1996). Apesar de, estar associado a maturação das glândulas de leite e a embriogênese nas fêmeas, ele também tem impactos significativos na espermatogênese, presumindo-se que, mutações nos seus receptores podem causar alterações nos parâmetros do sêmen, ou seja, estando relacionado a produtividade de ambos os sexos reprodutores. (TERMAN et al., 2006).

A partir do conjunto de respostas fisiológicas relacionadas ao efeito do Hormônio Receptor de Estrógeno (ESR), pode-se considerar a utilização de tecnologias como marcadores moleculares em reprodutores suínos para identificação de polimorfismos genéticos, e que possam estar relacionados a características de interesse econômico.

3.5. Marcadores moleculares e polimorfismo do tipo SNP

A identificação de indivíduos geneticamente superiores para programas de seleção está diretamente relacionada aos tipos de características de interesse. Geralmente, estas características são classificadas, pelo número de genes associados à sua expressão. As características denominadas qualitativas, geralmente possuem poucos pares de alelos na

expressão de seu fenótipo e são menos susceptíveis à ação de fatores ambientais. Já as características denominadas quantitativas, possuem centenas ou mesmo milhares de alelos em sua expressão fenotípica e são, frequentemente, mais susceptíveis à ação ambiental. (ELER, 2017).

Uma das principais ferramentas na identificação de indivíduos geneticamente superiores a serem selecionados para características quantitativas é a avaliação genética. Nessa, em geral verifica-se a contribuição de um indivíduo como progenitor de uma população com base na sua fração genética aditiva. Como uma maneira de auxiliar esta identificação, algumas características quantitativas têm seus efeitos atribuídos aos chamados “genes de efeito maior”. Neste caso, a identificação de alelos de efeito maior favoráveis à característica de interesse pode auxiliar o processo de seleção.

Um dos primeiros genes de efeito maior efetivamente implementado em programas de seleção de suínos foi o gene do Halotano (Hal^{NN} , Hal^{Nn} e Hal^{nn}), também conhecido como gene da Síndrome do Stress Suíno (PSS). Esta síndrome, identificada por LUDVIGSEN (1953), era associada inicialmente a más condições de embarque e manejo pré-abate dos animais. Caracteriza-se pelo aumento na temperatura corporal, dispneia e espasmos musculares e tem como principal consequência reflexos extremamente negativos na carne do animal, denominada PSE (Pálida, mole e exsudativa).

HARRISON et al. (1968) identificaram que alguns animais, quando expostos ao anestésico Halotano, apresentavam sintomas semelhantes à PSS. Isto viabilizou o desenvolvimento do chamado “teste do Halotano” por SYBESMA e EIKELENBOOM (1969) e ALLEN et al. (1970). Neste, os animais eram submetidos à presença do anestésico e identificados, a partir da presença ou ausência de manifestação dos sintomas, como portadores ou não do alelo causador da PSS e, conseqüentemente, da carne PSE. Desta forma, a seleção dos reprodutores com o auxílio do teste do Halotano tornou-se mais acurada para a diminuição das frequências dos alelos causadores da PSS e melhorando geneticamente os animais para a diminuição da incidência da carne PSE.

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, a partir de 1953 com a descoberta da estrutura do DNA e posteriormente em 1970, com a tecnologia do DNA recombinante combinada ao advento dos marcadores moleculares, vislumbrou-se a possibilidade de melhorar as informações oriundas do fenótipo com aquelas oriundas diretamente do DNA, de modo que

os processos de identificação e seleção dos animais com genótipos superiores pudessem ser realizadas mais eficientemente (COUTINHO e ROSÁRIO, 2010).

A utilização destas técnicas de marcação molecular, permitiu genotipar os animais para alelos de efeito maior em características de interesse e promover uma ferramenta de auxílio nos programas de seleção, caso os genótipos identificados possuam efeitos estatisticamente associados aos fenótipos destas características. Este é o conceito de seleção assistida por marcadores moleculares (S.A.M.M.). Nesta, a seleção dos indivíduos será realizada pelos seus genótipos previamente identificados, o que aumenta consideravelmente o ganho genético devido à diminuição no intervalo de gerações e ao aumento na acurácia de seleção. (REGITANO e COUTINHO, 2001).

A escolha da técnica de genotipagem dos animais está diretamente relacionada ao do objetivo do estudo, infraestrutura, recursos financeiros e recursos humanos disponíveis. Como exemplo das técnicas mais utilizadas pode-se citar a Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR- RFLP) (FALEIRO, 2007). Nesta, a região de interesse do gene dos animais é isolada a partir de amostras de DNA genômico e digerida por endonucleases de restrição. Se houver diferenças nos sítios de corte da endonuclease entre os animais, o polimorfismo genético fica caracterizado e a população será genotipada. (REGITANO e COUTINHO,2001).

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1. Coleta de amostras e extração de DNA genômico

O grupo de animais avaliados neste projeto é pertencente a granjas de produção de suínos localizadas no Estado de Santa Catarina. O estudo foi realizado no período de 06 de março de 2018 a 01 de março de 2019, nas dependências do laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, localizado no Centro de Ciências Agrárias – CCA no município de Florianópolis/SC.

Para os procedimentos de extração do DNA genômico foram utilizadas amostras remanescentes de pelos de 42 animais, sendo 18 da raça Landrace e 24 Large White de um projeto de pesquisa prévio e com aprovação na CEUA/UFSC (PP00873), em consonância com o princípio dos “3Rs”. O DNA genômico foi extraído dos folículos pilosos utilizando-se o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, adaptado de LIMA (2003).

Este método consiste em submeter às amostras com os folículos (aproximadamente 40 folículos/amostra), a incubações com TE-Tween e Proteinase-K, seguidas da extração efetiva do DNA com PCL (Fenol-Clorofórmio- Álcool Isoamílico / 25:24:1), precipitação com acetato de Sódio (0,3 M) e etanol absoluto e ressuspensão do DNA em tampão TE (10 mM Tris HCl pH = 7,6 e 1mM EDTA pH = 8,0) na proporção de 10:1, sendo posteriormente armazenadas a 4 °C.

Uma alíquota de 10 µL da solução de cada amostra do DNA genômico foi diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr (ou similar) a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização do DNA genômico foi conduzida por meio da luz ultravioleta (UV) e o gel foto documentado, permitindo assim a visualização da concentração e pureza do DNA extraído.

4.2. Análises de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para isolar a região codificadora do gene ESR abaixo foi desenhada a partir de informações disponíveis no GenBank inerentes à espécie suína e outras espécies com similaridade genética. As amostras de DNA genômico foram as regiões de interesse isoladas e amplificadas por PCR, em reações contendo 100 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 1X PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 µM de dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase num volume final de 25 µl. A sequência dos iniciadores utilizados foi:

ESR - Forward 5' CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3'

ESR - Reverse 5' CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3'

Após a amplificação, uma alíquota 5 µl de cada amostra foi diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos.

Para o estudo em questão foi necessário a realização da PCR-touchdown, que visa uma melhor visualização de genes inferiores a 100pb, por isso, a partir do resultado da PCR outra reação de amplificação foi realizada com a mesma programação de temperatura e tempo, porém, com gel de agarose numa proporção de 2,5% por aproximadamente 1h e 15 min na mesma voltagem. A visualização do DNA genômico foi feita em luz ultravioleta (UV), e o gel

foto documentado em aparelho de Sistema de Foto Documentação, objetivando avaliar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado.

4.3. Análises de Polimorfismo de tamanho dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

Os produtos obtidos nas reações de PCR foram digeridos com tempo e temperatura descrito no protocolo fornecido pelo fabricante das enzimas, utilizando-se 10 µL da reação de amplificação, 1/10 de tampão para a enzima de restrição e 5 unidades da enzima de restrição *PvuII*, em um volume final de 20 µL.

Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3,0%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM pH 8,3) com corante Sybr a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foram realizadas em luz ultravioleta (UV) e o gel foi foto documentado.

4.4. Procedimentos estatísticos

Com a confirmação da existência do polimorfismo genético na região estudada, as frequências gênicas (A^1 e a^2) e genóticas (A^1A^1 , A^1a^2 e a^2a^2) obtidas foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados (Equação 1). Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o software estatístico GENEPOP versão 3.1 (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

Equação 1: Onde: n_{ii} , n_{jj} , n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos i e j , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

$$\begin{array}{ccc} x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n} & & x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n} \\ x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} & & x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} & & x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n} \end{array}$$

Fonte: Falconer e Mckay, 1996.

As frequências genóticas esperadas, em equilíbrio, foram estimadas a partir da expansão do binômio descrito por FALCONER & MCKAY, (1996) (Equação 2), além de, ser realizadas análises utilizando-se o software Haploview versão 4.1. (BARRETT et al., 2005).

Equação 2: Em que: X_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_ix_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; X_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2$$

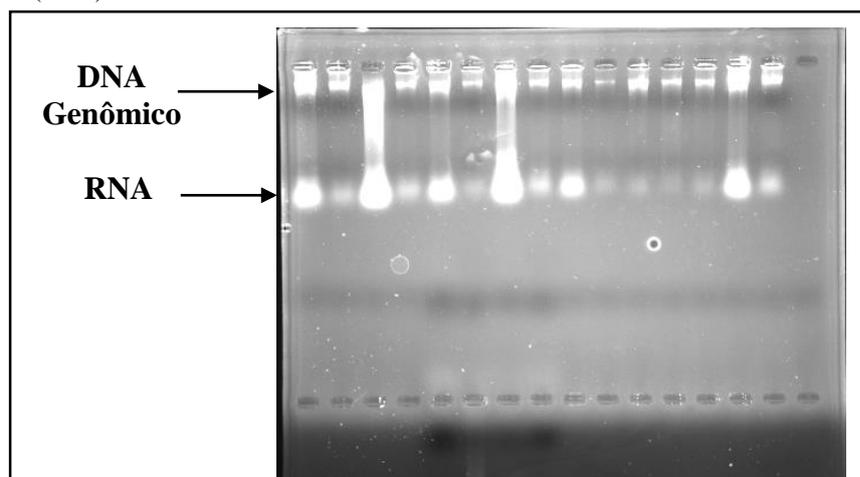
Fonte: Falconer e Mckay, 1996.

Para a determinação das frequências genéticas e genotípicas, foi realizado um teste de Qui-quadrado para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração de DNA genômico adaptado de Lima (2003), referente aos folículos pilosos retirados dos animais mostrou-se eficiente, como demonstrado na Figura 1. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,5%, corados com brometo de etídio e expostos à luz UV. A primeira banda constituída no padrão de migração revelou uma boa quantidade de DNA extraído. As bandas que se formaram no padrão arrastadas são indicativos de degradação do DNA, ao fim forma-se uma linha bem visível, sendo indicador da presença de RNA (LAURENO et al., 2006) de forma que, está ocorrência não prejudicou as etapas seguintes.

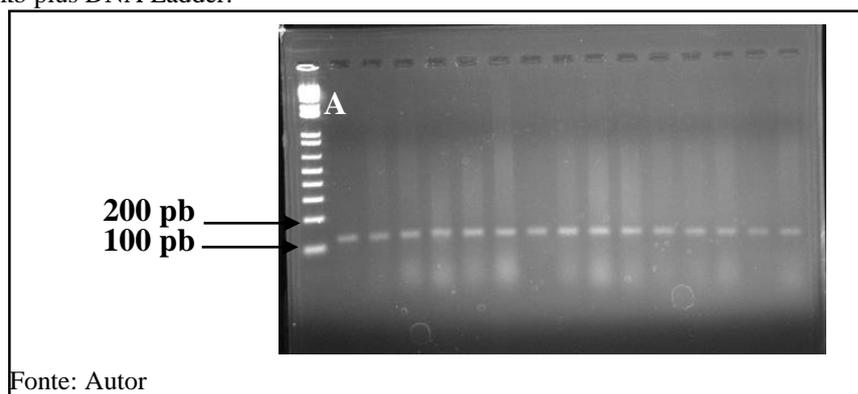
Figura 1: Resultado das extrações de DNA utilizando o método de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico) adaptado por Lima (2003).



Fonte: Autor

O resultado da PCR inicialmente apresentou uma banda de baixa visualização, por isso, foi necessário realizar o método de PCR-touchdown, que contribuiu com a amplificação da imagem dos fragmentos do tamanho esperado (Figura 2), aproximadamente 120pb, provando a eficácia dos primers desenhados para a região em estudo.

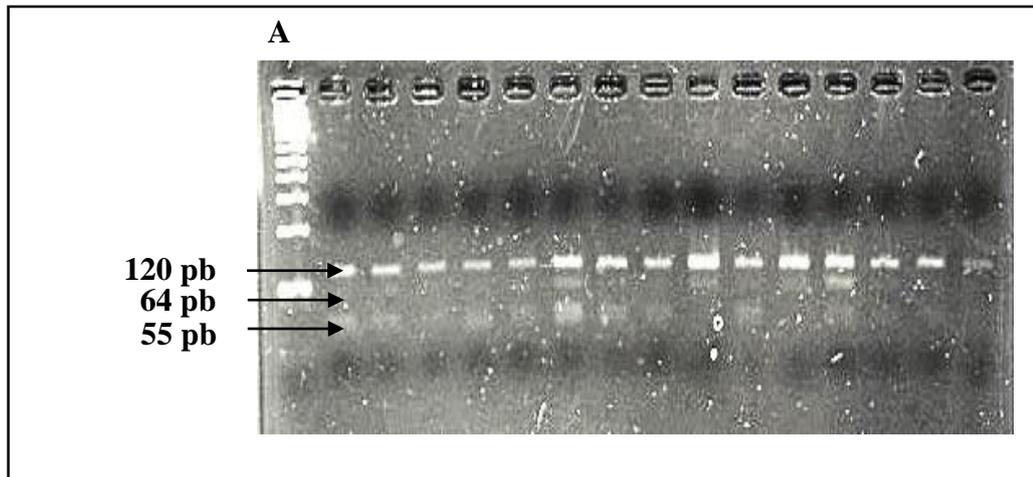
Figura 2: Imagem do resultado das análises de PCR com os iniciadores. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.



Fonte: Autor

Na figura 2, é possível verificar a eficiência dos iniciadores FWD e REV em isolar e amplificar a região de interesse, quando realizado a PCR-touchdown. Após análise dos resultados a técnica de RFLP foi aplicada, sendo as amostras digeridas pela enzima *PvuII*. Os resultados podem ser observados na figura 3.

Figura 3: Imagem do resultado das análises de RFLP. Gel de agarose a 3,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.

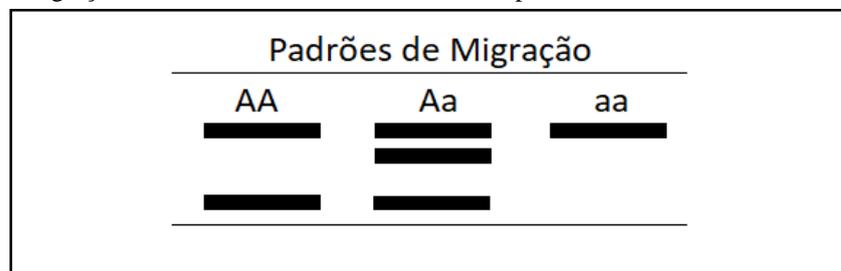


Fonte: Autor

Foi possível identificar três padrões diferentes de migração de bandas (Figura 4), o qual é um indicativo de padrões homozigotos (AA), homozigotos (aa) e heterozigotos (Aa), sendo uma banda com 120pb, outra com 65pb e 55pb caracterizando assim, a existência de polimorfismo genético para a região do gene Receptor de Estrógeno.

Resultados semelhantes foram encontrados por KMIEC et al. (2002), que obtiveram um produto de 120pb digerido pela Enzima de restrição *PvuII*, além de, um genótipo Aa com três bandas de 120, 65 e 55 pb.

Figura 4: Padrões de migração encontrados nas amostras de RFLP-pela enzima *PvuII*.



Fonte: Autor

No presente estudo, dos 42 animais, 18 eram da raça Landrace e 24 eram Large White, sendo que as respectivas frequências gênicas e genótípicas obtidas entre esses animais avaliados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Frequências genóticas e frequências alélicas obtidas na população ($p < 0,05$) *

Raças	N	Genótipos observados			Frequências alélicas *	
		AA	Aa	Aa	f (A)=	f (a)=
Landrace	18	0,222	0,222	0,556	0,333	0,667
Large White	24	0,174	0,304	0,522	0,326	0,674
Total	42	0,214	0,262	0,524	0,345	0,655

* = Frequências observadas e esperadas estatisticamente diferentes pelo teste de χ^2 ao nível de 5% de significância.

Os resultados obtidos com o teste de χ^2 (qui-quadrado) indicam que as frequências observadas na região objeto deste estudo nos animais avaliados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa pode ser uma atribuição dos efeitos de seleção tanto natural quanto artificial dos animais genotipados, os quais são responsáveis pelas alterações nas frequências alélicas em cada geração dessa população.

Em um estudo utilizando RFLP com a mesma enzima de restrição no gene ESR, SANTANA et al. (2006) encontraram as frequências $A= 0.809$ $a= 0.191$ e $A= 0.683$ $a= 0,317$, respectivamente para as raças Landrace e Large White. Esses autores inferiram em seu trabalho que a presença do alelo A influenciou positivamente os fenótipos das características de tamanho de leitegada, Ganho de Peso Diário e Espessura de Toucinho na população de animais Large White que avaliaram.

Esse resultado é um indicador de variabilidade genética, fato que contribui para futuras associações dos genótipos e informações fenotípicas para características de interesse, contribuindo com a seleção realizada pelos marcadores em programas de melhoramento de suínos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as técnicas de extração de DNA genômico e aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região de interesse do gene ESR foram eficazes. Da mesma forma, os resultados mostram que a região estudada é polimórfica para os sítios de clivagem da enzima de restrição *PvuII* no hormônio Receptor de Estrógeno em suínos. Foram identificados os padrões de migração AA, Aa e aa, e as frequências gênicas obtidas foram A 0.345 e a 0.655.

7. REFERÊNCIAS

- ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da Suinocultura Brasileira**. Brasília, DF, 2016.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual**. São Paulo, SP, 2021.
- ALLEN, W. M.; Berrett, S.; Harding, J. D. J.; and Patterson, D. S. P. 1970a. Experimentally induced acute stress syndrome in Pietrain pigs. **Vet Rec** 87:64–69.
- ARAGÃO, Adalberto; CONTINI, Elisio. Estudos socioeconômicos e Ambientais. **O Agro no Brasil e no Mundo: Uma Síntese do Período de 2000 a 2020**. EMBRAPA SIRE, jun. 2021
- BARRETT J.C. et al. **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps**. Bioinformatics, v.21, n.2, 2005.
- CIAS - MAIORES PRODUTORES MUNDIAIS DE SUÍNOS, CIAS **Maiores produtores mundiais de suínos**, Flourish, 2020.
- COUTINHO, Luiz Lehmann; ROSÁRIO, Millor Fernandes do. **Biotecnologia animal. Estudos Avançados** (USP. Impresso), v. 24, p. 123-147, 2010.
- DE FIGUEIREDO, E. A. P.; LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. de O. Melhoramento genético de suínos seguindo o exemplo americano. **Embrapa Suínos e Aves-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2014.
- DEIMLING, Cristiane. **Colonização, pequena produção mercantil e agroindústrias em São Carlos: das " fábricas de banha" ao Frigorífico São Carlos (FRISCAR)-Décadas de 1930 a 1970**. 2014.
- DEPUYDT, J. et al. Association study of an *AvaI* and *PvuII* polymorphism at the porcine estrogen receptor (ESR) gene, with litter size. **ARCHIV FUR TIERZUCHT- ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING**, v. 42, p. 172-174, 1999.
- DIAS, Alexandre César et al. Manual brasileiro de boas práticas agropecuárias na produção de suínos. **Brasília, DF: ABCS**, 2011.
- DO CARMO KLAUS, Eduarda et al. A PESTE SUÍNA AFRICANA NA CHINA E A CARNE SUÍNA BRASILEIRA. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 12, n. 2, 2020.
- ELER, J.P. **Teorias e métodos em melhoramento genético animal: bases do melhoramento genético animal**. Ed FZEA-USP, 251p. 2017
- EMBRAPA. Estatísticas de Produção de Suínos. **Evolução entre 2000 e 2022 (previsão)**. Concordia, SC, 2021.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Longman Press, London, UK, 1996, 4.ed.

- FÁVERO, Jerônimo Antônio; DE FIGUEIREDO, Elsio Antonio Pereira. **Evolução do melhoramento genético de suínos no Brasil**. *Ceres*, v. 56, n. 4, 2015.
- FERREIRA, Adilson Hélio et al. Produção de suínos: teoria e prática. **Brasília: ABCS**, 2014.
- GONÇALVES, Rafael Garcia; PALMEIRA, Eduardo Mauch. Suinocultura brasileira. **Observatorio de la economía Latinoamericana**, n. 71, p. 01-11, 2006.
- GUIMARÃES, Diego Duque et al. Suinocultura: **Estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. 2017.
- HARRISON, G. G.; Beibuyck, F. J. F.; Terblanche, J.; Dent, D. M.; Hickman, R.; and Saunders, S. J. 1968. Hyperpyrexia during anesthesia. **Br Med J** 3:594–595.
- KMIEC, M.; DVORAK, J.; VRTKOVA, I. Estudo da relação entre o polimorfismo do gene do receptor de estrogênio (ESR) e alguns caracteres de desempenho reprodutivo de suínos na raça Landrace polonesa. **Czech Journal of Animal Science**, v. 47, n. 5, pág. 189-193, 2002.
- LÁZARO, S. F. et al. Avaliação genética do tamanho de leitegada em suínos das raças Landrace e Large White. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 274-282, 2015.
- LEDUR, Mônica Corrêa. Genoma do frango—Mapeamento de QTL. **38ª REUNIAO ANUAL**, 2001
- LUDVIGSEN, J. 1953. **Muscular degeneration in hogs (preliminary report)**. 25th Int Vet Cong, Stockholm 1:602–606.
- MIELE, Marcelo et al. O desenvolvimento da suinocultura brasileira nos últimos 35 anos. **Embrapa Suínos e Aves-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011.
- MORAES, Victor Emanuel Gomes de; CAPANEMA, Luciana Xavier de Lemos. A genética de frangos e suínos: a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 119–154, 2012.
- MORAES, Victor Emanuel Gomes de; CAPANEMA, Luciana Xavier de Lemos. A genética de frangos e suínos: a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 119–154, 2012.
- NEVES, M. F. et al. Mapeamento da suinocultura brasileira. **Brasília: ABCS, SEBRAE**. Recuperado de <https://bit.ly/2ZLigBf>, 2016.
- PASTRE, LHM; DE FIGUEIREDO, E. A. P. Caracterização do cruzamento entre as raças suínas landrace x large White x moura para formação de híbridos da linha fêmea. In: **Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (JINC), 7., 2013, Concórdia. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 76-77., 2013.
- RAYMOND, M., ROUSSET, F. GENESPOP version 3.1d: **Population genetics software for exact test and ecumenism**. *Journal of Heredity*. v.86, p.248-249, 1995.

- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L. L. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Editora da EMBRAPA, 2001. cap.1. p-11-25.
- ROTHSCHILD, M. F. et al. Development of a consensus map for chromosome 1 in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 40, 1995.
- ROTHSCHILD, Max et al. O locus receptor de estrogênio está associado a um gene importante que influencia o tamanho da ninhada em suínos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, pág. 201-205, 1996.
- SANTANA, Bárbara Amélia Aparecida et al. Association of the estrogen receptor gene Pvu II restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 273-277, 2006.
- SCHNEIDER, Sergio et al. Os efeitos da pandemia da Covid-19 sobre o agronegócio ea alimentação. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 100, p. 167-188, 2020.
- SYBESMA, W., and EIKELNBOOM, G. 1969. Malignant hyperthermia in pigs. **NethJ Vet Sci** 2:155–160.
- TERMAN, ARKADIUSZ; KMIEĆ, MAREK; POLASIK, DANIEL. Gene receptor de estrogênio (ESR) e características do sêmen de varrascos. **Arquivos Animal Breeding** ,v. 49, n. 1, pág. 71-76, 2006.
- USDA -Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. 2020