

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

ELISA PERIPOLLI

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA DE
REPRODUTORAS SUÍNAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

ELISA PERIPOLLI

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA DE
REPRODUTORAS SUÍNAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência para obtenção do Diploma de
Graduação em Zootecnia da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientador(a): Prof. Dr. André Luís Ferreira
Lima

**FLORIANÓPOLIS - SC
2014**

ELISA PERIOLLI

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA DE
REPRODUTORAS SUÍNAS**

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

Florianópolis, 20 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira

Prof.^a Dr.^a Lucélia Hauptli

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, por serem sempre presentes em minha vida e pelo imenso e puro amor a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

Á minha família, em especial aos meus pais Odilo e Ingrid, por toda confiança a mim depositada e por lutarem ao meu lado para a realização dos meus sonhos, tornando meus sonhos seus sonhos também. Vocês me dão força para sempre lutar e nunca desistir dos meus objetivos. Vocês são meu exemplo honestidade, força de vontade, cumplicidade, determinação e amor. Obrigada por sempre se fazerem presentes em minha vida.

Ao meu namorado e melhor amigo Hugo, por me compreender e me ajudar durante a minha graduação. Por aturar meus momentos de estresse nos finais dos semestres e por sempre acreditar no meu potencial, me incentivando ao máximo na realização dos meus sonhos.

Aos meus amigos Letícia, Gabriela e Max pelas risadas e pelos momentos de descontração durante esses cinco anos. Vocês fizeram com que a graduação fosse mais divertida e me proporcionaram momentos inesquecíveis.

Ao meu professor, amigo e orientador Prof^o André Luís Ferreira Lima pela oportunidade de desenvolver meu estágio e trabalho de conclusão de curso. Obrigada por fazer com que eu me apaixonasse ainda mais pela genética e pelo carinho e dedicação durante nossa convivência.

Ao meu professor Renato Irgang pelos seus conselhos, ensinamentos e pela dedicação aos seus alunos e a suinocultura. Obrigada por me proporcionar a realização de trabalhos e estágio extracurricular.

RESUMO

A carne suína é a principal fonte de proteína animal do mundo, colocando o Brasil como destaque deste segmento ao deter o quarto maior plantel suinícola. A grelina é um hormônio que está envolvido em diversas funções biológicas e estudos evidenciaram que a variação nos níveis de expressão e na atividade deste hormônio afetam alguns mecanismos fisiológicos relacionados ao consumo e conversão alimentar em suínos, sendo proposto, portanto, estudar esse gene como gene candidato para identificação de marcadores genéticos de interesse econômico. Caso essas variações genéticas entre os indivíduos estejam associadas a características de interesse econômico na suinocultura, o ganho genético da mesma poderá ser otimizado nos programas de melhoramento genético da espécie. Objetivou-se verificar a possível existência de polimorfismos no gene da grelina em reprodutoras suínas das raças Landrace e Large. Foi realizada a coleta de pelos e seus respectivos folículos pilosos de um grupo de 60 animais, sendo 30 animais Landrace e 30 Large White de uma granja de reprodutores de Santa Catarina. Os experimentos necessários para a identificação de polimorfismo no gene em estudo foram realizados no Laboratório de ensino e pesquisa em genética animal (LEPGA) no Depto de Zootecnia e Desenvolvimento Rural, Centro de Ciências agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras de folículos pilosos foram submetidas à extração de DNA pelo método fenol-clorifórmico-álcool-isoamílico adaptada e o DNA genômico extraído foi quantificado e amplificado mediante a PCR. Para verificar o resultado da reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese e o fragmento obtido foi submetido à técnica de PCR-RFLP utilizando-se a enzima de restrição Alu-I (New England BioLabs®). Diante do estudo, observou-se que a marcação molecular com a técnica de PCR RFLP utilizando a enzima Alu-I apresentou padrão monomórfico para o grupo de reprodutoras avaliadas.

Palavras-chave: Marcadores Moleculares; Suinocultura; Sequenciamento; Conversão Alimentar; Genética de populações

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação do DNA polimerase sob os oligonucleotídeos iniciadores.....	20
Figura 2: Representação esquemática de um polimorfismo do tipo SNP.	21
Figura 3: Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA. Gel de Agarose a 0,5%.	26
Figura 4: Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores Ghr FWD e REV. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen)	27
Figura 5: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease Alu-I. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen)	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro

GH – Growth Hormone

GHRH – Growth Hormone Releasing Hormone

PSE – Pale, soft and exudative

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SFP – Single Feature Polimorfism

Taq – *Thermus aquaticus*

PCR-RFLP - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição

PCR-SSCP - Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples

RPM – Rotação por minuto

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

V - Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1.OBJETIVO GERAL.....	11
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 PANORAMA DA SUINOCULTURA	12
3.2 GRELINA.....	13
3.3 MARCADORES MOLECULARES E POLIMORFISMOS DO TIPO SNP.....	16
3.3.1 MELHORAMENTO GENÉTICO E TÉCNICAS DE MARCAÇÃO MOLECULAR..	16
3.3.2 POLIMORFISMOS DO TIPO SNP.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é considerada a principal fonte de proteína animal no mundo, representando grande parte do consumo e da produção de carnes. O Brasil ocupa a quarta posição entre os produtores mundiais do segmento, e vem se destacando nos últimos anos como um dos principais produtores e exportadores. O país apresenta um bom desempenho frente à cadeia produtiva devido ao aumento do incremento tecnológico e da especialização e coordenação entre os elos da cadeia produtiva, além de grandes investimentos no melhoramento genético da espécie, permitindo reduzir os níveis de gordura da carne, colesterol e calorias, tornando a carne cada vez mais magra e nutritiva.

O grande avanço brasileiro no setor suinícola e os bons dados estatísticos apresentados pela espécie é o resultado de um intenso investimento no melhoramento genético, direcionando acasalamentos para a obtenção de ganho genético e fenotípico em características de interesse econômico passíveis de exploração. O melhoramento genético iniciou-se através da observação entre as interações oriundas das espécies animais e do ambiente, fornecendo dados fenotípicos do animal em questão. Porém, fatores genéticos e ambientais podiam inferir na relação entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo, superestimando ou subestimando os dados fenotípicos. Com isso, deu-se início ao desenvolvimento de marcadores moleculares para o estudo genético das espécies, fornecendo uma ferramenta para uma melhor avaliação animal, proporcionando assim, uma melhor acurácia de seleção.

Ainda há, entretanto, muitas melhorias que podem ser aplicadas e desenvolvidas na criação suinícola, visando maximizar sua eficiência como um todo. Toma-se como exemplo a seleção assistida por marcadores, que proporciona um melhor controle dos produtos gerados, aumentando a qualidade e diminuindo a variação da matéria produzida. Os polimorfismos genéticos podem ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores, identificando e selecionando indivíduos que possuem alelos favoráveis para os genes envolvidos, alelos estes, que podem estar associados a uma ou várias características fenotípicas de interesse econômico na suinocultura. O importante é encontrar marcadores moleculares associados a características de importância econômica, como por exemplo, a produção de grelina em suínos.

A grelina é um hormônio envolvido em diversas funções biológicas, desempenhando um importante papel como regulador endógeno da liberação do hormônio do crescimento, na regulação do comportamento ingestivo, no crescimento e desenvolvimento tecidual, além de

aumentar a motilidade gastrointestinal e auxiliar na secreção de enzimas pancreáticas. Estudos revelam que a variação nos níveis de expressão e na atividade do hormônio grelina afetam direta ou indiretamente alguns mecanismos fisiológicos relacionados ao consumo e conversão alimentar e que essas variações podem ser atribuídas ao polimorfismo no gene nos animais. Caso essas variações genéticas entre os indivíduos estejam associadas a características de interesse econômico na suinocultura, o ganho genético da mesma poderá ser otimizado nos programas de melhoramento genético da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a possível existência de polimorfismos no gene da grelina em reprodutoras suínas das raças Landrace e Large White para proporcionar uma ferramenta aplicável, em termos populacionais, com vistas ao melhoramento genético da espécie.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar um fragmento correspondente ao éxon I e intron I do gene da Grelina utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos na PCR, utilizando-se a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama da Suinocultura

A carne suína é a fonte de proteína de origem animal mais importante do mundo e também a carne mais consumida, alcançando uma produção de 100 milhões de toneladas, sendo que deste total, metade é produzido pela China e o restante pela União Europeia, Estados Unidos e Brasil (PEREIRA, 2012a). O Brasil é o quarto maior exportador e detém o quarto maior plantel suinícola. O desenvolvimento da suinocultura no país constitui-se um importante fator de crescimento econômico, promovendo a multiplicação de renda e emprego nos mais diversos setores econômicos ligados à cadeia (PEREIRA, 2012a).

Dados da ABIPECS demonstram que em 2013 o Brasil detinha um plantel de matrizes de 2.321.385 animais distribuídas em produções industriais e de subsistência e que deste total, as maiores concentrações em ordem crescente de importância localizam-se nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais (ABIPECS, 2014a).

De acordo com a ABIPECS, em 2013 o Brasil exportou 517.333 mil toneladas de carne suína, uma diminuição de 11,04% em relação a 2012. As exportações realizadas em 2013 renderam R\$ 1.358.821 e o preço médio pago pelo quilo da carne neste mesmo ano foi de R\$ 2,627 (ABIPECS, 2013b). O principal destino da carne suína brasileira em 2013 vendida em cortes foi a Hong Kong, Federação da Rússia e Ucrânia (ABIPECS, 2013c).

O sucesso da suinocultura no Brasil deve-se ao desenvolvimento e aprimoramento de fatores essenciais ligados a sanidade, nutrição, bom manejo da granja e dos animais, aliada a produção integrada e ao aprimoramento gerencial dos produtores, colocando o país em destaque no cenário mundial. Outro fator que contribuiu para os bons dados estatísticos da espécie refere-se à evolução genética durante os últimos 20 anos, o que acarretou na redução de 31% da gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, fazendo com que a carne suína fosse almejada devido aos seus aspectos de baixo teor de gordura, alto teor nutritivo e seu sabor característico (MAPA, 2014).

Um dos grandes aliados da suinocultura, além do melhoramento genético, é a nutrição, tornando-se um ponto chave no estabelecendo de um sistema competitivo, uma vez que a nutrição representa um custo muito elevado, podendo alcançar valores em torno de 77% da produção (CENTRAL DE INTELIGÊNCIA DE AVES E SUÍNOS, 2014; ROSSI et al,

2013). A maximização da eficiência alimentar na cadeia suinícola e sua competitividade no mercado é um desafio importante no setor e depende de fatores tais como custo de operação, tamanho da leitegada, taxa de ganho de peso, conversão alimentar, entre outros (ROSSI et al., 2013).

Os números apresentados acima demonstram a importância desempenhada pela suinocultura no Brasil e no estado de Santa Catarina em função da sua cadeia produtiva, sendo um componente importante para a geração de renda, empregos diretos e indiretos, através do desenvolvimento de tecnologias e da economia das localidades envolvidas com a atividade. Com isso, o desenvolvimento de um estudo molecular do hormônio grelina na espécie suína é de suma importância, visando proporcionar uma ferramenta aplicável em termos populacionais, com vista ao melhoramento genético da espécie e tornando a atividade cada vez mais competitiva, visto que este hormônio possui efeitos fisiológicos que influenciam características relacionadas ao consumo e conversão alimentar.

3.2 Grelina

O nome grelina originou-se da palavra *ghre*, que na linguagem Protoindo-europeia corresponde à palavra inglesa *grow*, que tem como significado crescimento. Seu nome, *Grow Hormone Release*, descreve uma das principais funções desse peptídeo, a liberação do hormônio de crescimento (ROMERO & ZANESCO, 2006).

A grelina é um peptídeo composto por 28 aminoácidos e apresenta duas formas endógenas principais: a forma des-acilada e a acilada na serina 3, esta última, entretanto, é comumente conhecida como grelina (DONG et al., 2009) e possui uma modificação sobre a serina 3, sendo esta modificação essencial para sua atividade liberadora de GH (ROMERO & ZANESCO, 2006; SATO et al., 2011).

A grelina foi descoberta por Kojima e seus colaboradores em 1990, por meio de estratos da mucosa estomacal de ratos (SATO et al., 2011). Através da descoberta da grelina em ratos, muitos pesquisadores e suas equipes objetivaram estudar com maior intensidade este peptídeo em outras espécies animais, tais como humanos, roedores, pássaros, peixes, dentre outras (DONG et al., 2009).

A grelina é predominantemente produzida pelas células do trato gastrointestinal e secretada no plasma sanguíneo (MOLIK et al., 2001; DONG et al., 2009), porém, pode ser

produzida em menores quantidades pelo sistema nervoso central, rins, placenta, coração (ROMERO & ZANESCO, 2006), na pituitária e em alguns núcleos celulares em ratos. (DONG et al., 2009). Estudos recentes evidenciaram que as células produtoras de grelina apresentaram uma vasta expressão no estômago de vacas, ovelhas, suínos e cavalos, especialmente na região cardíaca e pilórica no estômago de suínos e também no trato gastrointestinal dos mesmos (DONG et al., 2009).

A alimentação é o fator mais conhecido para a regulação da secreção da grelina. Quando em jejum, sua concentração plasmática aumenta, ao passo que após a ingestão de alimentos sua concentração plasmática diminui (SATO et al., 2011). Outros fatores também colaboram para a secreção da grelina, como o conteúdo nutricional e o nível hormonal. Estudos revelaram que a suplementação dietética com Óxido de Zinco em leitões melhorou a produção de grelina da mucosa gástrica. Também se pôde observar um aumento no RNAm da grelina na membrana da mucosa gastrointestinal e o aumento plasmático de grelina após a infusão oral de Triptofano em leitões desmamados. Em se tratando dos hormônios, estudos apontam que após a administração de insulina e leptina em ratos, a concentração de RNAm da grelina aumentou (DONG et al., 2009).

A grelina é considerada um hormônio intestinal com efeitos diretos, possuindo uma variedade de funções biológicas, além de ser o único hormônio estimulante do apetite do intestino até então conhecido (KAIYA et al., 2008). Além de regular o comportamento do consumo alimentício, a grelina desempenha um papel na regulação do balanço e homeostase de energia em vertebrados; regula o crescimento e desenvolvimento tecidual; o aumento da motilidade do trato gastrointestinal e o ganho de peso corporal. Além das funções citadas acima, a grelina é um hormônio que promove a proliferação celular intestinal e inibe sua apoptose durante os estados inflamatórios e estresse oxidativo (MOLIK et al., 2001; KAIYA et al., 2008).

A estimulação do apetite causada pela grelina dá-se através da ativação e estimulação de neuropeptídeos hipotalâmicos orexígenos, como o NPY (MOLIK et al., 2001). A grelina atua como um sinal da fome dos tecidos periféricos, informando o cérebro sobre o conteúdo de nutrientes no estômago (DONG et al., 2009), de modo que injeções intravenosas e subcutâneas desse hormônio estimulam os neurônios do hipotálamo, aumentando a ingestão de alimentos (SATO et al., 2011).

De acordo com Dong et al (2009), leitões desmamados foram induzidos durante cinco dias, três vezes ao dia por infusão intravenosa de grelina humana e como resultado obtiveram um ganho de peso positivo e um aumento no tempo de consumo quando comparados aos

animais do tratamento controle. Em um estudo contrário, suínos em crescimento foram imunizados contra a grelina e pôde-se perceber uma diminuição da ingestão alimentar em 15% e do peso corporal em 10% quando comparados com os animais do tratamento controle (Dong et al., 2009.)

Estudos recentes afirmam que a grelina exerce uma atividade específica na liberação do GH (DONG et al., 2009; ROMERO & ZANESCO, 2006), sendo que sua estimulação na liberação deste hormônio é duas a três vezes maior do que a estimulação feita pelo GHRH. Porém, observou-se um efeito sinérgico importante entre a grelina e o GHRH, demonstrando que a coadministração de ambos resulta em uma maior liberação de GH (SATO et al., 2011).

Após a injeção intravenosa de grelina, a liberação de GH atinge seu pico em no máximo quinze minutos, a partir das células primárias da pituitária. Porém, a indução da liberação de GH após a injeção de grelina é diminuída drasticamente quando o nervo vago é rompido, indicando a importância desse nervo para os efeitos estimulantes da grelina (SATO et al., 2011).

A grelina também desempenha um papel fisiológico na regulação da motilidade gastrointestinal, acelerando o esvaziamento gástrico (DONG et al., 2009). De acordo com Sato et al., (2011), a administração intravenosa de grelina aumenta a secreção de ácido gástrico e sua resposta máxima a grelina é quase tão elevada quanto a provocada por tratamento subcutâneo de histamina (3mg/kg), uma amina que exerce função reguladora na fisiologia intestinal.

Estudos demonstraram que em humanos e em ratos o gene da grelina é composto por cinco éxons e quatro íntrons (KAIYA et al., 2008; SATO et al., 2011). Em animais vertebrados não mamíferos a sequência do gene da grelina, bem como sua organização de éxons e íntrons tem sido demonstrada em peixinhos dourados, Tilápia do Nilo, Truta Arco-Íris, Frango e Peru. Nessas duas primeiras espécies animais, o gene é composto por quatro éxons e três íntrons e nas três últimas é composto por cinco éxons e quatro íntrons, como visto em ratos e nos seres humanos (KAIYA et al., 2008).

A partir do conjunto de respostas fisiológicas ao qual a atuação do hormônio grelina está associada, a utilização de técnicas de marcação molecular no gene deste hormônio em populações de suínos deve ser considerada, permitindo a identificação de polimorfismos genéticos que podem estar associados a características fenotípicas de interesse na suinocultura, que possam apresentar retornos econômicos.

3.3 Marcadores Moleculares e Polimorfismos do tipo SNP

3.3.1 Melhoramento genético e técnicas de marcação molecular

A partir do século XX, a produção animal começou a ser conduzida como uma atividade comercial, deixando para trás seu carácter de subsistência. Como resultado desse novo modelo de exploração, aumentou-se a demanda por animais que apresentassem melhor desempenho e que fossem mais adaptados às diversas condições ambientais, iniciando assim, os programas de melhoramento de raças de bovinos, suínos, aves, ovinos, caprinos, entre outras (COUTINHO & ROSÁRIO, 2010).

O melhoramento genético pode ser descrito como o resultado de um processo de direção dos acasalamentos efetuados em raças ou linhas puras para a obtenção de ganho genético e fenotípico, em características de interesse econômico da produção animal. Os acasalamentos mais desejáveis dentro das raças ou das linhas são realizados através da identificação dos melhores reprodutores, sejam eles machos ou fêmeas, através do valor genético da característica de interesse para a seleção. O valor genético de cada indivíduo, para cada característica de interesse, é o resultado de uma combinação estatística da frequência de locus e genes que apresentam efeitos positivos e negativos para aquela característica, na presença das demais características de interesse, somados ao longo de todo o genoma do animal. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende de metas bem definidas e coerentes com o mercado vigente para a espécie melhorada, além de aspectos ligados ao ambiente e o bem-estar animal, permitindo maximizar a produção da matéria-prima ao menor custo e maior qualidade possível. (PEIXOTO; LEDUR; FIGUEIREDO, 2014).

Inicialmente, o melhoramento animal era realizado através das interações entre as espécies e o ambiente, por meio de observações de campo e manipulações experimentais. Essa técnica fornecia dados fenotípicos, que podiam ser baseados em um ou mais aspectos da morfologia, fisiologia ou comportamento das espécies. Entretanto, o uso de dados fenotípicos para inferir a variação genética de populações era bastante questionável, uma vez que algumas características fenotípicas poderiam estar sob estrito controle genético, embora fatores ambientais pudessem influenciar a relação entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo. Assim, a variação genética poderia ser subestimada ou superestimada se fosse baseada unicamente em dados fenotípicos. Essa complexa interação entre genótipo, fenótipo e o

ambiente pode ser considerada um dos principais motivos que impulsionaram o desenvolvimento de marcadores moleculares para o estudo genético de espécies (SILVA, 2012).

Os marcadores moleculares são amplamente utilizados nos estudos de genética populacional, no mapeamento e nas análises de similaridade e podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA específico, expresso ou não (BRAMMER, 2000). A seleção assistida por marcadores molecular objetiva aumentar a precisão da avaliação genética dos indivíduos, proporcionando assim, melhor controle sobre os processos de produção, bem como sobre os produtos gerados, aumentando a qualidade e diminuindo a variação da matéria existente (GIL, 2012). O princípio da utilização dos marcadores é baseado na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (FALEIRO, 2007).

Um exemplo da aplicação de marcadores moleculares bem sucedidos a partir de estudos de genes candidatos têm sido descritos em algumas espécies zootécnicas, como por exemplo, em suínos. Nessa espécie, pesquisadores identificaram polimorfismos no gene receptor da rianodina relacionados com a incidência de carne PSE, e também identificaram um polimorfismo no gene receptor de estrogênio que tem mostrado um aumento no tamanho da leitegada (Ninov, 2007).

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, por James Watson e Francis Crick em 1953, o campo da genética e do melhoramento animal tem progredido consideravelmente. Ao longo dos últimos 30 anos, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (SILVA, 2012), possibilitando assim, 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 & ROSÁRIO, 2010).

Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos na década de 60, as alozimas, marcadores estes, baseados em enzimas. As Alozimas são consideradas múltiplas variantes de uma mesma proteína que ocorrem quando sequências de DNA de dois ou mais alelos, em um mesmo locus, mostram-se divergentes e, então, o RNA correspondente codifica diferentes aminoácidos, dando origem a múltiplas formas de uma mesma proteína. (SILVA, 2012).

Na década de 1980 foram desenvolvidos os primeiros marcadores moleculares de DNA, que permitiram obter dados de diversos loci do genoma, e, também, revelar alelos de

um locus específico do genoma (SILVA, 2012). Alguns dos principais marcadores moleculares que surgiram após a década de 80 e suas principais aplicações são descritos abaixo.

Os marcadores RFLP, RADP e AFLP foram os marcadores de DNA mais utilizados nas décadas de 80 e 90, sendo ainda utilizados para alguns estudos genéticos (GUIMARÃES et al., 2009). A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR utilizando *primers* de sequência arbitrária com aproximadamente 10 nucleotídeos. Por utilizar *primers* de sequência arbitrária, a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada. A técnica de RAPD mostra-se especialmente indicada por ter grande potencial para detectar polimorfismo genético e por permitir a obtenção rápida de resultados (LACERDA et al., 2002). A técnica de AFLP consiste na digestão do DNA através da utilização de enzimas de restrição e posterior amplificação via PCR. Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP. Como vantagem dessa técnica pode-se citar a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver a necessidade do conhecimento prévio de dados da sequência de DNA para a construção dos *primers* utilizados (FALEIRO, 2007).

Os microssatélites são unidades curtas, de aproximadamente dois a cinco pares de bases, repetidas uma após a outra em tandem. A obtenção desses marcadores envolve a amplificação dos microssatélites através da PCR, utilizando *primers* específicos para as regiões que flanqueiam os microssatélites e posterior análise em eletroforese. Uma das vantagens dessa técnica refere-se ao alto nível de polimorfismo que pode ser detectado. Já os minissatélites são unidades de 10 a 100 pares de bases, repetidas uma após a outra e que são flanqueadas por endonucleases de restrição (FALEIRO, 2007).

Os SNPs e SFP são marcadores moleculares com base em informações de sequências de DNA. Os SNPs são utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na variação da posição de um único nucleotídeo (FALEIRO, 2007). Os marcadores do tipo SFP, referem-se aos microarranjos de DNA ou chips, que contêm oligonucleotídeos desenhados para estudos de expressão gênica, os mesmos estão sendo usados para a geração de polimorfismos para genotipagem em grande escala (GUIMARÃES et al., 2009).

Atualmente existem diversas tecnologias aliadas a genética molecular que podem ser utilizadas no estudo de marcadores moleculares, como demonstrado acima, e sua escolha irá depender do objetivo do estudo, infra-estrutura disponível, recursos financeiros disponíveis,

recursos humanos e nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

Das técnicas básicas da biologia molecular desenvolvidas na última década, nenhuma teve tamanho impacto revolucionário entre os pesquisadores da área quando a PCR, descrita pela primeira vez em 1985 (PERSING, 1991; ERLICH, 1989). Essa técnica permite sintetizar *in vitro* milhões de cópias de uma sequência específica do material genético em uma reação simples, rápida e automatizada (ERLICH, 1989; MULLIS, 1990). De acordo com Mullis (1990), a PCR é de fácil execução, não requerendo mais do que um tubo de ensaio, alguns reagentes simples e uma fonte de calor.

A PCR sintetiza sequências enzimáticas específicas de DNA *in vitro*, dirigida por dois oligonucleotídeos iniciadores que se ligam às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde, amplificando e detectando sequências específicas de ácidos nucleicos do DNA alvo pela ação de uma DNA polimerase termo resistente (ERLICH, 1989; PERSING, 1991; PEREIRA, 2012c). Os passos envolvidos nesse processo são executados por uma máquina denominada de termociclador (PEREIRA, 2012b). Cada ciclo é composto por uma etapa de aquecimento a 95°C para desnaturar o DNA molde em duas fitas simples; uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), na qual a temperatura é reduzida até ser considerada ótima para os *primers*, variando a aproximadamente 64°C e por fim, a etapa de polimerização, que consiste na extensão do iniciador no sentido 5'-3' a uma temperatura ótima de 72°C para a ativação da enzima DNA polimerase (ERLICH, 1989; PEREIRA, 2012b).

Um oligonucleotídeo é uma cadeia composta por bases de nucleotídeos especificamente encomendadas, que, sob condições corretas, irá se ligar especificamente com uma sequência complementar de nucleotídeos em uma única vertente de DNA (MULLIS, 1990). O produto da hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores pode servir como molde para a amplificação seguinte, de modo que uma série repetitiva de ciclos envolvendo a desnaturação do molde, hibridação do iniciador e o prolongamento dos iniciadores recombinados pelo DNA polimerase resulta na acumulação exponencial de um fragmento específico (ERLICH, 1989).

A enzima DNA polimerase foi descoberta em 1955 por Arthur Konberg e seus colaboradores (MULLIS, 1990), em resposta a utilização do fragmento de Klenow de *E. coli* DNA polimerase (ERLICH, 1989). Esse fragmento de *E. coli* apresentava uma temperatura ótima de 37° C, porém, era inativado através das altas temperaturas necessárias para a separação das fitas de DNA, necessitando a adição de uma nova enzima a cada ciclo de PCR.

Com a introdução de um DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) no primeiro ciclo de PCR, eliminou-se a necessidade de quaisquer outras adições de enzimas (ERLICH, 1989).

A enzima Taq polimerase possui como uma de suas funções sintetizar uma nova cadeia de DNA, promovendo o alongamento dos oligonucleotídeos iniciadores, através da fixação de um nucleotídeo complementar à sua extremidade. O nucleotídeo que a enzima atribuirá será complementar à base na posição correspondente na cadeia molde, por exemplo, se o modelo de nucleotídeos adjacentes é um A, a DNA polimerase atribui uma base T; se o modelo é um nucleotídeo G, a enzima atribui um C (Figura 1). Em uma dupla hélice do DNA, cada filamento serve como um modelo para o outro durante a replicação e reparação (ERLICH, 1989).

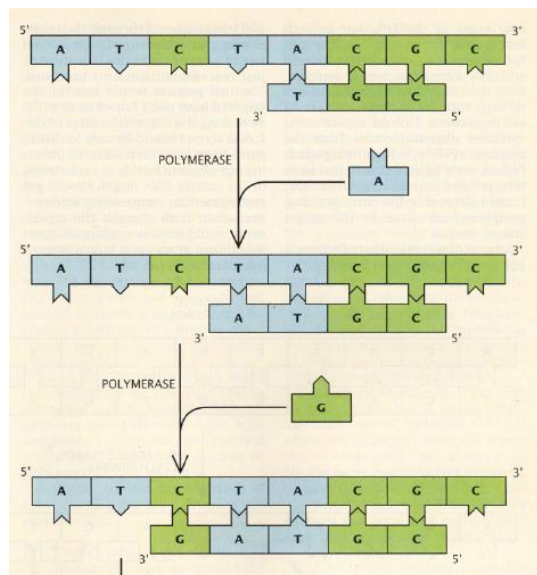


Figura 1: Ação do DNA polimerase sob os oligonucleotídeos iniciadores (Adaptado de MULLIS, 1990).

As técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP utilizam as práticas da PCR como primeira etapa nos procedimentos laboratoriais. A PCR-RFLP é uma técnica popular para genotipagem, na qual os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. O primeiro passo para uma análise de PCR-RFLP é a amplificação de um fragmento contendo a variação, seguido por tratamento do fragmento amplificado com uma enzima de restrição apropriada. Cada enzima cliva o DNA em seqüências nucleotídicas específicas. Dado que a presença ou ausência do reconhecimento das enzimas de restrição resulta na formação de fragmentos de restrição de diferentes dimensões, a identificação dos alelos pode ser feito por eletroforese (RASMUSSEN, SD). A PCR-SSCP é

baseada em pequenas variações na sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado. Essa técnica expõe os fragmentos de DNA a uma reação físico-química com o objetivo de quebrar as pontes de hidrogênio da dupla fita separando-a para posterior rearranjo entre as fitas simples em cada uma das amostras. A ocorrência de mudança de base nitrogenada na fita simples de uma amostra, pode ocasionar um rearranjo diferenciado na cadeia, que determina um padrão diferenciado de migração da banda, indicando a presença de polimorfismo (GUIMARÃES, 2012).

3.3.2 Polimorfismos do tipo SNP

Os polimorfismos de sequência nucleotídica são fontes de abundante variação genética. Esse tipo de marcador genético é muito interessante para estudos filogenéticos de evolução dentro da espécie, mapeamento genético e, principalmente, na diferenciação de alelos do mesmo gene (FALEIRO, 2007). Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) são oriundos de variações existentes na sequência de DNA dos indivíduos de uma mesma população, variações essas, geradas por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção das mesmas, como demonstrado na Figura 2 (FALEIRO, 2007; PEREIRA, 2012b).

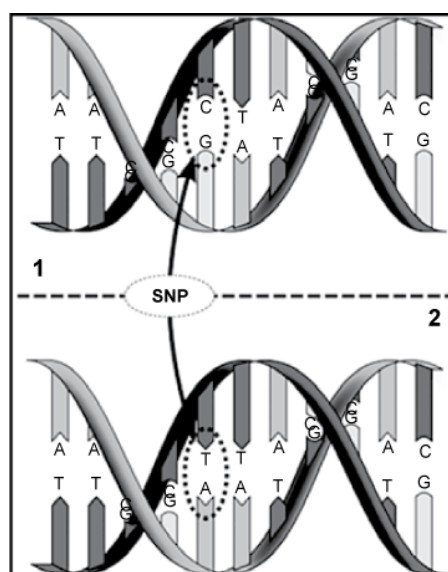


Figura 2: Representação esquemática de um polimorfismo do tipo SNP. (Adaptado de Giannella & Vieira, 2008).

Muitas vezes, a substituição de um único nucleotídeo pode levar à substituição de um aminoácido na proteína e, em consequência, à perda de sua funcionalidade e à modificação fenotípica do animal (FALEIRO, 2007). Para que seja considerado um polimorfismo, é necessário que os alelos existam em frequências maiores do que ocorria devido a mutações recorrentes (PEREIRA, 2012b). De acordo com Gil (2012), os polimorfismos podem ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores, selecionando indivíduos que possuem alelos favoráveis para os genes envolvidos com as características estudadas em questão, baseada na avaliação direta de seu DNA.

Os polimorfismos do tipo SNP podem ocorrer tanto em regiões codificadoras (exons) quanto em regiões não codificadoras (introns) dos genomas. Quando ocorrem em regiões codificadoras, eles podem substituir um aminoácido na sequência protéica, podendo levar a modificações estruturais e funcionais na proteína. Já as mutações que ocorrem nos introns não podem afetar diretamente a estrutura da proteína, entretanto, elas podem impedir a produção do RNAm e inibir a união por *splicing* dos exons (Ninov, 2007).

O estudo dos polimorfismos do tipo SNP pode ser dividido em duas etapas. A primeira consiste na identificação do polimorfismo, na qual a sequência genética de vários indivíduos é comparada e segunda refere-se à genotipagem. Para o processo de genotipagem, pode-se utilizar diversas técnicas, tais como chips de DNA, espectrometria de massa, PCR em tempo Real e RFLP e a escolha da técnica mais adequada depende de fatores tais como precisão, agilidade e custo (Vignal et al., 2002). A técnica da RFLP é a mais utilizada, uma vez que apresenta baixo custo e rapidez de execução quando aplicada em estudos populacionais, além de sua alta reprodutibilidade e seu alcance de ampla cobertura do genoma (GUIMARÃES, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de pelos da região lombar de 60 fêmeas suínas, 30 da raça Landrace e 30 da raça Large White, foram coletadas de granjas de reprodutoras suínas pertencentes ao frigorífico Riosulense, município de Rio do Sul-SC no mês de agosto de 2013. As fêmeas suínas integram um programa de melhoramento genético da espécie e são animais de linhagens de avós e bisavós em se tratando da pirâmide de produção. Cada amostra contendo aproximadamente 50 pelos foi acondicionada em embalagem individual e devidamente identificada. Posteriormente, cerca de 30 folículos/animal foram transferidos para tubos de microcentrifuga (1,5 ml) identificados com a numeração do animal e mantidos a -20° C até o momento da extração do DNA genômico.

As análises para a identificação de polimorfismos do gene do hormônio da grelina em reprodutoras suínas foram feitas no Laboratório de ensino e pesquisa em genética animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Centro de Ciências Agrárias.

Para a etapa de extração do DNA genômico dos folículos pilosos, utilizou-se a metodologia PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico), adaptada de Lima (2003). Inicialmente, foram adicionados 500 µl de solução TE-TWEEN em cada tubo, seguido de incubação no banho a 65°C por 1,5 horas, posteriormente adicionou-se 2 µL de proteinase K (600 µg/µL) e incubou-se a 55°C por 6 horas, ao final, incubou-se a 37°C por uma noite.

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 segundo em agitador automático. Posteriormente, 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.

Em seguida, 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 a 4°C. 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/µl e relação A260/280 entre 1,8 a 2,0.

Para o isolamento e amplificação da região correspondente ao Exon I e Intron I do gene da grelina suína foi desenhado um par de *primers* com base nas informações disponíveis no GenBank (DQ663493, AY3730191 e AB5628971). O par de *primers* desenhado possuía as seguintes sequências de nucleotídeos, respectivamente:

GHR – Forward - 5' CATCCCAGCCCTTCCATGAG 3'

GHR - Reverse - 5' CATAGATGGGCTCACACTGGG 3'

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®, em 35 ciclos, com a seguinte programação: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos; 57°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos. Após estes ciclos, as amostras foram mantidas a 72°C por 5 minutos e a 4°C até serem retiradas do equipamento.

Para verificar o resultado da reação de amplificação uma alíquota de cinco µL de cada amostra foi diluída em 3µL de tampão de corrida (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 fotodocumentado 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, onde 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 trabalho, a aplicação da técnica de RFLP para tentar identificar polimorfismos foi realizada utilizando-se a enzima de restrição Alu-I (New England BioLabs®). A sequência palindrômica e o sítio de restrição desta endonucleases é 5'- AGCT -3.

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 da Alu-I. 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 fotodocumentado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos de extração do DNA genômico das amostras de folículos pilosos utilizados neste trabalho mostraram-se eficientes. Após a extração, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro e todas apresentaram, no mínimo, 100 ng/ μ L para utilização na etapa de PCR. As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 0,5% corado com brometo de etídeo. Após exposição à luz UV, obteve-se uma imagem representativa dos resultados da extração, conforme pode ser observado na Figura 3.

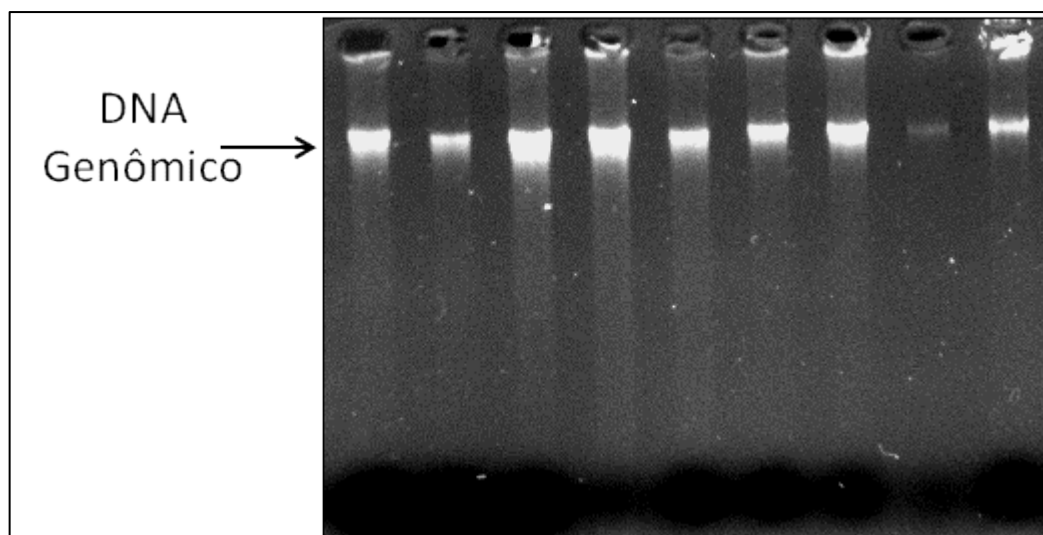


Figura 3: Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA. Gel de Agarose a 0,5%.

Os resultados obtidos na extração corroboram Laureano et al. (2006) que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) em pelos de novilhas da raça Nelore.

A Figura 04 mostra, representativamente, os resultados obtidos após as amostras serem submetidas à PCR. Nela, é possível verificar que os iniciadores GHR 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.

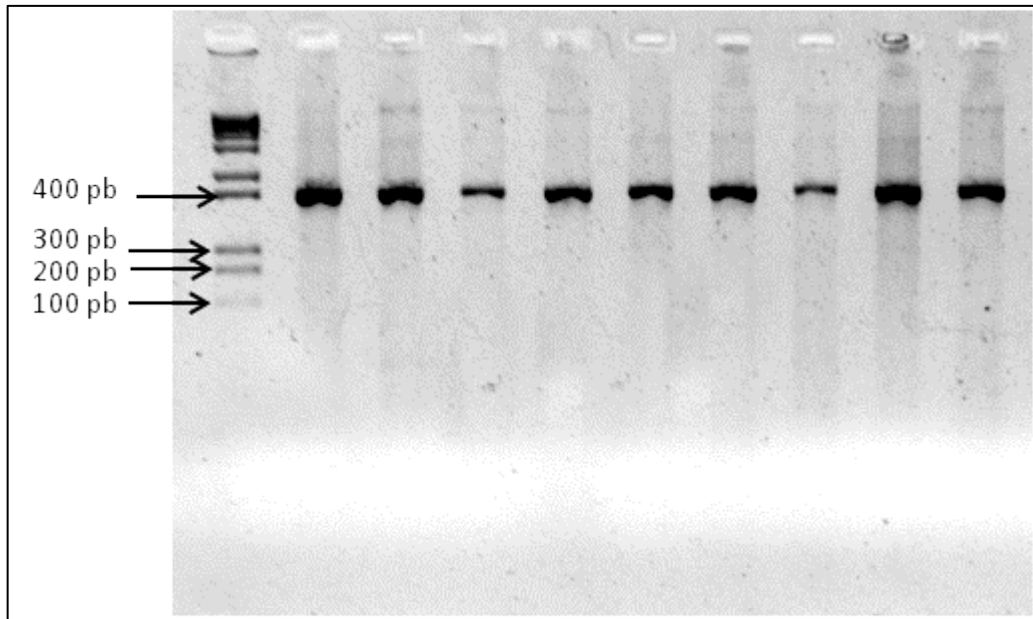


Figura 4: Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores Ghr FWD e REV. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) .

Os resultados obtidos nesta etapa possibilitaram a realização da técnica de RFLP, onde as amostras que continham agora apenas a região de interesse do gene da grelina avaliada neste trabalho foram então digeridas com a enzima Alu-I. Os resultados estão apresentados na Figura 05.

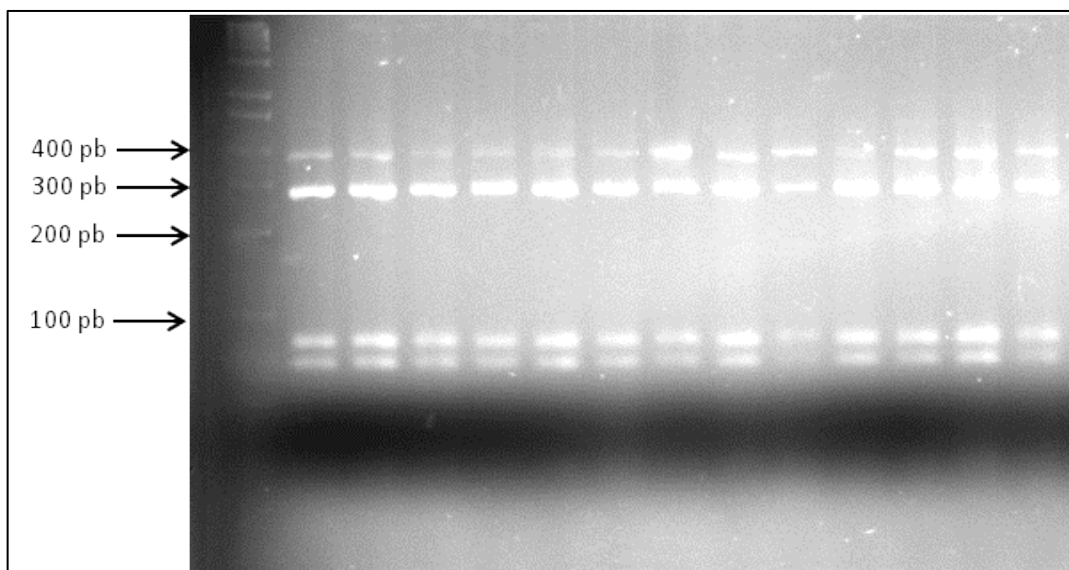


Figura 5: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease Alu-I. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) .

Na aplicação do RFLP, a enzima utilizada digeriu os produtos amplificados na PCR em 4 fragmentos, 2 com bandas de tamanho inferior a 100pb, 1 com fragmentos de aproximadamente 300pb e 1 com aproximadamente 400pb, respectivamente. Este mesmo padrão foi obtido em todas as 60 amostras correspondentes aos animais avaliados neste estudo, caracterizando um monomorfismo genético para a região avaliada com a técnica de RFLP/Alu-I.

Este resultado indica a inexistência de variação genética para a região estudada do gene em relação à sequência de corte para a enzima utilizada. 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 (Ayres, 2006).

Embora não tenham sido encontrados polimorfismos genéticos para a região estudada do gene da grelina suína neste trabalho, é possível que existam sítios polimórficos para o gene da grelina associados a 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, tornando possível o desenvolvimento de trabalhos relacionando o polimorfismo do gene do hormônio da grelina em suínos com a taxa de consumo alimentar e a conversão alimentar da espécie, possibilitando maximizar a eficiência alimentar e tornar a atividade mais competitiva frente ao mercado de carnes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que, embora a realização das extrações de DNA genômico e a aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região de interesse do gene da grelina tenha sido eficaz, a utilização do RFLP com a enzima de restrição Alu-I não possibilitou a identificação de polimorfismos genéticos nos animais avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(a) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado interno. **Brasil-Produção**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 06 de outubro de 2014.

(b) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado externo. **Exportação**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 06 de outubro de 2014.

(c) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado externo. **Principais destinos**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 06 de outubro de 2014.

AYRES, Denise Rocha ; ALBUQUERQUE, Lúcia Galvão de ; COSTA, Raphael Bernal ; LAUREANO, M. M. M. ; OTAVIANO, Antônio Roberto . Polimosfismos no gene da Leptina relacionados com escores visuais de conformação, precocidade e musculatura de bovinos da raça Nelore.. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Jaboticabal. Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006.

BRAMMER, Sandra Patussi. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa, 2000.

CENTRAL DE INTELIGÊNCIA DE AVES E SUÍNOS (Concórdia). Embrapa. **Custos**. 2014. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/dados/custo.php>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

COUTINHO, Luiz Lehmann; ROSÁRIO, Millor Fernandes do. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados** (USP. Impresso), v. 24, p. 123-147, 2010.

DONG, Xiao-Ying et al. Ghrelin and its biological effects on pigs. **Peptides**. 2009 Jun;30(6):1203-11. doi: 10.1016/j.peptides.2009.03.001. Epub 2009 Mar 20.

ERLICH, Henry A. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Immunology**, Vol, 9, No. 6, 1989

FALEIRO, Fábio Gelape. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2007.

GIL, Fernanda Maria Monsalves. **Polimorfismo no gene do hormônio grelina em búfalas (*Bubalus bubalis*) e sua associação com produção e qualidade do leite**. 2012. 57 f. Dissertação (Doutor) - Curso de Zootecnia, Departamento de Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

Guimarães, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, nov./dez. 2009.

KAIYA, Hiroyuki et al. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Volume 149, Issue 2, February 2008, p. 109-128.

LACERDA, Daniela R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana, Ufmg*, v. 2, n. 3, p.87-92, 14 jan. 2002.

LAUREANO, M. M. M., OTAVIANO, A. R., COSTA, R. B., LIMA, A. L. F., SALMAN, A. K. D., TONHATI, H., SENA, J. A. D., SEZANA, J. C., ALBUQUERQUE, L. G. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 8, 2006, Belo Horizonte. Characterization of polymorphisms within insulin-like growth factor-i and prolactin genes of three groups of nellore heifers. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2006. cd.

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 (mestrado)**. Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2003.

MAPA. Animal. Mercado interno. Espécies. **Suínos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 06 de outubro de 2014

MOLIK, K. Ropka et al. New polymorphisms and expression of the porcine ghrelin (GHRL) gene in different pig breeds. **Journal Of Animal And Feed Sciences**, Fg, v. 20, n. , p.186-199, 18 nov. 2011

MULLIS, Karry B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am**. 1990 Apr;262(4):56-61, 64-5.

NINOV, Kerli. Identificação de polimorfismos no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça. 1999. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-05032007-162413/>>. Acesso em: 26 set 2013.

PAABO, Svante et al. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. **The Journal of Biological Chemistry**. 1989 Jun 15;264(17):9709-12.

PEIXOTO, Jane de Oliveira; LEDUR, Mônica Corrêa; FIGUEIREDO, Elsio Antônio Pereira de. Melhoramento genético. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000g0gyjqot02wx5ok026zxpgegv9oxm.html>. Acesso em: 25 nov. 2014.

(a) PEREIRA, Jonas Carlos Campos. Melhoramento Genético dos Suínos. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Embrapa, 2012. p. 614-647.

(b) OLIVEIRA, Henrique Nunes de. Mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Fepmvz, 2012. p. 648-666.

(c) GUIMARÃES, Simone E. F.. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Embrapa, 2012. p. 614-647.

PERSING, DAVID H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. **Journal of Clinical Microbiology**, July 1991, p. 1281-1285 vol. 29, no. 7

RASMUSSEN, Henrik Berg. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. **Denmark: Institute Of Biological Psychiatry**, Mental Health Centre Sect. Hans, S/D.

ROMERO, Carla Eduarda Machado; ZANESCO, Angelina. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 1, n. 19, p.85-91, Jan. 2006.

ROSSI, Carlos Augusto Rigon et al. **Dietas ajustadas para suínos através do modelo InraPorc[®]: desempenho, características de carcaça e impacto econômico**. *Ciência Rural*. 2013, vol.43, n.4, pp. 689-695. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v43n4/a9513cr2012-0721.pdf>>. Acesso em: 06 outubro 2014.

SATO, Takahiro et al. Structure, regulation and function of ghrelin. **J. Biochem.** 2012;151(2):119–128 doi:10.1093/jb/mvr134

SILVA, M. B. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estud. Biol.**, Ambiente Divers. 2012 jul./dez., 34(83), 157-163

VIGNAL, Alian et al. A review on SNP na other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.34, p.275-305, 2002

WOJTYSIAK, Dorota; KACZOR, Urszula. Effect of polymorphisms at the ghrelin gene locus on carcass, microstructure and physicochemical properties of longissimus lumborum muscle of Polish Landrace pigs. **Meat Science**, Volume 89, Issue 4, December 2011, p. 514-518.