

**NÚBIA MICHELLE VIEIRA DA SILVA**

**POLIMORFISMO GENÉTICO DA LEPTINA E DO RECEPTOR DO  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM CAPRINOS**

RECIFE

JULHO 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POLIMORFISMO GENÉTICO DA LEPTINA E DO RECEPTOR DO  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para a obtenção do título de *Mestre*, área de Produção de Ruminantes.

Orientadora: Maria Norma Ribeiro

Co-orientadores: Manoel Adrião Gomes Filho

Laura Leandro da Rocha

RECIFE

JULHO 2010

## Ficha Catalográfica

S586p Silva, Núbia Michelle Vieira da

Polimorfismo genético da leptina e do receptor do hormônio  
do crescimento em caprinos / Núbia Michelle Vieira da Silva. –

2010.

77 f. : il.

Orientadora: Maria Norma Ribeiro

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade  
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia  
Recife, 2010.

Referências.

1. Caprino 2. Marcadores moleculares 3. Características de  
crescimento I. Ribeiro, Maria Norma, orientadora II. Título

CDD 636.39

POLIMORFISMO GENÉTICO DA LEPTINA E DO RECEPTOR DO  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM CAPRINOS

NÚBIA MICHELLE VIEIRA DA SILVA

Dissertação definitiva aprovada em 23 de Julho de 2010, pela Banca Examinadora.

Orientadora: \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Maria Norma Ribeiro, D. Sc

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Prof. Manoel Adrião Gomes Filho, D. Sc

\_\_\_\_\_  
Ana Mary da Silva, D.Sc

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Lúcia Helena de Albuquerque Brasil, D. Sc

*Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo.*

Clarice Lispector

### **Dedico**

À minha mãe Graça e ao meu irmão Nivaldo,  
Pela compreensão, incentivo e carinho.

### **Ofereço**

Ao meu pai Nivaldo (*in memoriam*)

*AGRADECIMENTOS*

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRPE, pela oportunidade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Banco do Nordeste, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Norma Ribeiro, pela orientação, paciência, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, pela orientação e ensinamentos recebidos.

Ao laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - FAMA, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pela oportunidade oferecida e por disponibilizar as instalações e equipamentos necessários para a elaboração deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Raquel M. Coimbra do laboratório de Genética Aplicada – LAGA (UFRPE) pelo livre acesso às instalações e equipamentos.

Ao Prof. Éderson Akido Kido do departamento de Genética/CLB/UFPE, pela colaboração a este trabalho.

Aos professores doutores por terem aceitado fazer parte da Banca Examinadora.

Ao professor Pedro Humberto Félix de Souza, médico veterinário do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – DTCS da UNEB, que permitiu a coleta de material biológico e dado de produção dos animais da instituição.

Aos criadores conceituados de caprinos da raça Anglo-Nubiana e Boer dos municípios de Bezerros (Fazenda Riacho do Mel), Chã Grande (Fazenda Alto do Cruzeiro) e Juazeiro (Fazenda Canaã), por terem cedido material biológico e seus dados de produção para a realização do trabalho, minha sincera gratidão.

Aos tratadores Gina, Duda e Jacson pela colaboração durante as coletas.

Aos amigos: Genison, Lígia e Anselmo, pelos contatos que ajudaram nas diferentes fases desta dissertação.

Aos amigos do laboratório FAMA Sandra, Diogo, Jeise, Zoraíde e Elaine pela convivência e troca de experiências durante este período.

Às amigas do laboratório LAGA Karine, Cláudia e, em especial à Patrícia, pela paciência nos ensinamentos das técnicas.

Às amigas Laura e Bete, pela ajuda e troca de ideias nas diferentes fases desta dissertação.

Um agradecimento especial ao Sr. Georges Fotius, que contribuiu desde a coleta do material até às sugestões e correções do trabalho.

Aos amigos Aninha, Eduardo e Felipe, meus auxiliares diretos, pela preciosa ajuda concedida às coletas e pela boa vontade que sempre demonstraram.

Aos amigos Kess, Paulo, Rosália, Rejane, Antonio e Paty pela paciência, amizade e pelos momentos de desconcentração, e ao amigo Jairon Freitas, pelas horas de conversa no MSN.

Expresso ainda o meu reconhecimento a todos que acompanharam a minha vida acadêmica, transmitindo princípios e conhecimento ao longo dos últimos anos, e que nem sempre estando presentes, existem em mim e me ajudam a ter força e coragem para enfrentar os obstáculos difíceis.

Obrigada a todos que referi e aos que ficaram por referir, mas que não esqueço.

## INDICE

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introdução Geral.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Importância da caprinocultura de corte para a pecuária brasileira.....	7
2.2 Taxonomia caprina.....	9
2.3 Raças caprinas utilizadas.....	10
2.3.1. Anglo-Nubiana.....	10
2.3.2. Boer.....	11
2.4. Uso de marcadores moleculares no melhoramento animal.....	12
2.5. Polimorfismo Genéticos.....	16
2.6. PCR-RFLP.....	17
2.7. Microssatélite.....	18
2.8. Identificação de locus de interesse econômico .....	19



2.8.1 Gene Candidato.....	19
2.8.2. Varredura Genômica.....	21
2.9. Leptina.....	21
2.10. Hormônio do crescimento GH.....	24
2.11. A Bio-informática na Genética Molecular.....	26
3. OBJETIVO .....	29
3.1.Objetivos Específicos.....	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
5.1. Animais.....	44
5.2. Colheita de material biológico para extração de DNA .....	44
5.3. Análises Laboratoriais.....	45
5.4. Extração, quantificação e diluição de DNA.....	45
5.5. Amplificação dos fragmentos por PCR (Polymerase Chain Reaction).....	46
5.1. Otimização das condições de amplificação por PCR do gene do ghr.....	47
5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	48
5.7.Otimização das condições de amplificação por PCR do gene da leptina na região do éxon2.....	49

5. 8. Técnica PCR-RFLP Hinf-I (Reação de polimerização em cadeia – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição).....	51
5.9 Análises Estatísticas.....	52
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## LISTAS DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Eletroforograma contendo amostras de DNA genômico extraído..... 46
- FIGURA 2.** Eletroforograma contendo produtos amplificados do gene da *Leptina* do *éxon 2* em 17 animais das duas raças, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 2,0%. .....50
- FIGURA 3. A.** Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela enzima de restrição *Hinf I* para o gene *Leptina* na região do *éxon 2*, com visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida 5,0%. M: Marcador de DNA 10pb..... 54
- FIGURA 4. A.** Eletroforograma contendo os produtos da PCR para o gene GHR, com visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida 5%. M: Marcador de DNA 100pb (A). Detalhe dos padrões de migração dos três genótipos encontrados na população(B). .....56

## LISTAS DE TABELAS

**Tabela 1.** Frequências alélicas, heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para a leptina nas duas raças estudadas. Pesquisa realizada no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) em 2010..... 53

**Tabela 2.** Frequência alélica, heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para o GHR nas duas raças estudadas. Pesquisa realizada no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-(FAMA)..... 57

**Tabela 3.** Número de observações (N), média de peso ao nascer (PN), média de peso à desmame (PD), de acordo com genótipos para o gene *ghr* nas populações Anglo-Nubiana e Boer. Pesquisa realizada no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-(FAMA) em 2010.....58

## LISTAS DE ABREVIATURAS

dbEST- Expressed sequence Tags Database (Pequenas sequências espessas)

DNA – *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

FAMA – Laboratório Animal de Fisiologia Molecular Aplicada

SSR-GHR – Microsatélite do receptor do hormônio do crescimento

He – Heterozigosidade esperada

Ho – Heterozigosidade observada

LEP – Leptina

MAS – Seleção assistida por marcadores genéticos

PCR- *Polymerase chain reaction* (Reação de polimerase em cadeia)

PD – Peso ao desmame

PN – Peso ao nascer

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)

SNP – *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de sequência nucleotídeo)

**RESUMO**

Objetivou-se estudar a relação entre o polimorfismo no gene da Leptina (LEP), especificamente o éxon 2, e o microssatélite do receptor do hormônio do crescimento (SSR-GHR) com as características de peso ao nascer e desmame em caprinos das raças Anglo-Nubiana e Boer, a fim de identificar marcadores que possam ser úteis na seleção desses animais de elevado mérito genético. Foram obtidas as frequências alélicas e a heteroziguidade com auxílio do programa Toolkit (PARK, 2001). O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito com auxílio do GENEPOP, conforme Rousset (2008), no qual os marcadores se mostraram em desequilíbrio para as populações. Para a LEP, os valores de heteroziguidade observada foram bem maiores do que os esperados e todos os animais apresentaram o mesmo padrão eletroforético com dois alelos (150 e 152 pb). No loco do *ghr* observaram-se cinco alelos com tamanho variando de 90 a 125 pb. Para verificar a influência dos genótipos dos fragmentos polimórficos do *ghr* e da *leptina* sobre o desenvolvimento dos animais foram utilizados os pesos ao nascer (PN) e ao desmame (PD), para os quais foi feita análise de variância e teste de médias com auxílio do procedimento GLM do programa (SAS, 1999). Observou-se um efeito significativo dos genótipos do *ghr* sobre os pesos ao nascer (PN) e à desmame (PD). Sugere-se então, um estudo destes polimorfismos em maior número de animais para confirmação do efeito sobre características de crescimento.

**Palavras-Chave:** marcadores moleculares, características de crescimento, caprino.

***ABSTRACT***

This study aimed to evaluate the relationship the polymorphism from the leptin gene (LEP), specifically exon 2, and from the microsatellite of the growth hormone receptor (GHR-SSR) with the weight and weaning characteristics of animal breeds Anglo-Nubian, and Boer, to identify useful markers for selecting goats of high genetic merit. It was obtained the allele frequencies and heterozygosity with the Toolkit (PARK, 2001). The test for the Hardy-Weinberg equilibrium was performed with GenePop program according to Rousset (2008), and showed that the markers were in disequilibrium in populations. Observed heterozygosity values for LEP were greater than expected and all animals showed the same electrophoretic pattern with two alleles (150 and 152 bp). It was detected with GHR *locus* five alleles ranging from 90 to 125 bp examined in populations. The genotypes influence of polymorphic fragments of GHR and leptin on animals development was evaluated using the birth weight (BW) and weaning (PD), by analysis of variance and mean test with the GLM procedure of (SAS, 1999). The genotypes showed a significant effect on birth weight (BW) and weaning (PD). It is necessary to study of these polymorphisms on a larger sample of animals to confirm the effect on growth characteristics.

**Keywords:** molecular markers, growth characteristics, goat.

## ***1. INTRODUÇÃO GERAL***

A década de 1990 foi marcada por um grande progresso na área da biologia molecular, que consiste não apenas no estudo da diversidade genética dos animais domésticos, mas também no conhecimento de genes, com funções biológicas conhecidas em alguns organismos. Esses genes servem de modelos para estudos na área animal, gerando informações úteis para a conservação e melhoramento das raças de animais domésticos.

Muitos avanços foram conseguidos no conhecimento do genoma de inúmeras espécies animais e vegetais. Esses avanços têm contribuído para aumentar a precisão nos estudos com reflexo positivo na produção animal, como é o caso da seleção assistida por marcadores genéticos (MAS), que visa eliminar algumas limitações da seleção baseada no fenótipo (BROWN, 1999). A seleção efetuada diretamente pelo genótipo tem gerado resultados mais acurados, precoces e de baixo custo (DEKKER;HOSPITAL, 2002), dependendo do nível de complexidade da característica em questão.

Devido à necessidade de adequação ao mercado e às exigências por carne de melhor qualidade, a pecuária de corte nacional tem se especializado mais a cada dia (SILVA, 2008).

Com relação à caprinocultura, é notória a crescente preocupação com a qualidade da carne tendo em vista a expansão do mercado. A China, Índia, Austrália, Nova Zelândia e Turquia são os países com maior concentração de rebanhos, enquanto que o Brasil vem ocupando o nono lugar (CORREIA, 2007). O rebanho caprino brasileiro está em torno de 9,450 milhões de cabeças, sendo a região



Nordeste detentora de 8,637 milhões (IBGE, 2007). Embora o Nordeste possua condições edafoclimáticas favoráveis para a criação destes animais, o desenvolvimento do agronegócio da caprinocultura, quanto à sua tecnificação, ainda é inexpressiva, se comparada ao de bovinos e suínos. Dentre as raças caprinas com aptidão para produção de carne estão a Boer e a Anglo-Nubiana, que segundo (MADRUGA et al., 2005), vêm sendo utilizadas recentemente em cruzamentos com rebanhos SPRD (Sem padrão racial definido) e também com raças nativas, como a Moxotó.

A demanda por carnes de caprinos e ovinos, em cortes padronizados, bem como por vísceras devidamente processadas (buchada), tem tido um crescimento considerável nas grandes cidades do Nordeste e do Sudeste do Brasil, principalmente em áreas com segmento populacional detentor de maior poder aquisitivo (CARVALHO, 2003). Nassu et al. (2002) relataram grande tendência de consumo da carne caprina *in natura* em seus cortes mais nobres, visto que apresentam características especiais, alcançando alto valor de mercado.

As principais características da carne são a palatabilidade e seus aspectos organolépticos que envolvem todos os sentidos, sendo que ambas as propriedades podem ser influenciadas por diversos fatores, os quais exercem forte influência na qualidade e na quantidade das gorduras (MADRUGA et al., 2005).

Para a cadeia produtiva da caprinocultura de corte alcançar um nível promissor e competitivo é indispensável o desenvolvimento de tecnologias que possam auxiliar a melhoria na qualidade e eficiência na produção. É necessária uma profunda modificação de logística para que ocorram mudanças no cenário nacional,

em todas as classes envolvidas na produção de caprinos de corte, desde o pesquisador até o produtor.

O uso de dados moleculares, como os marcadores bioquímicos e de DNA em programas de melhoramento genético, ajuda o melhorista a alcançar o objetivo desejado. E essas vantagens vão desde a seleção precoce de animais, por meio da análise de genes antes que ocorra sua expressão, até a seleção de características que são mensuradas após a morte do animal (SCHIERHOLT, 2005) como, por exemplo, os parâmetros de qualidade da carne (força de cisalhamento e atividade da calpastatina), que requerem serem realizadas no final do ciclo produtivo.

Coutinho et al. (2007), em uma revisão sobre genômica animal, destacam que, dentre as espécies domésticas de interesse econômico, a caprina é a que tem sido menos estudada e seu genoma ainda não foi completamente estudado, com apenas 637 dbEST, bem inferiores aos de outras espécies tais como bovina, ovina, suína, equina, canina e peixes.

O uso eficiente de marcadores moleculares deve considerar como base a genética dos polimorfismos, bem como os aspectos técnicos dos métodos que os definem, inclusive as vantagens e limitações de cada classe (FALEIRO, 2007). Os marcadores moleculares destacam-se por serem altamente polimórficos, detectáveis em qualquer fase da vida do indivíduo e apresentarem características dominantes ou co-dominantes, além de não serem influenciados pelo ambiente. Uma das principais metas na pesquisa genômica tem sido a identificação de locos que controlam características quantitativas, sendo a análise de genes candidatos uma das abordagens mais utilizadas para esse fim.

A busca de genes candidatos para características ligadas à produtividade vem aumentando consideravelmente, sendo estes uma ferramenta valiosa para o melhoramento animal.

O gene candidato deve apresentar um ou mais polimorfismo nos animais parentais que forem usados; deve-se verificar se a mutação é conservativa e, em seguida, faz-se uma associação estatística com o objetivo de verificar se esse polimorfismo teria ou não efeito significativo sobre a característica de interesse no programa de melhoramento (SCHIERHOLT, 2005).

É necessário estudos mais minuciosos para identificação de genes candidatos com implicação em características de interesse econômico. Faz parte desta categoria de marcadores, o gene do hormônio do crescimento e o gene da leptina. Ambos exercem atividades biológicas no organismo, podendo estar associados a uma ou mais características de produção.

O presente estudo teve como objetivo estudar um segmento do gene da *leptina* na região do éxon2 e do gene do receptor do hormônio do crescimento *ghr* em duas raças de caprinos Anglo-Nubiana e Boer, investigando a ocorrência de polimorfismos e sua associação com características de crescimento, com a finalidade de gerar informações que possam auxiliar na seleção destes animais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### ***2.1. Importância da caprinocultura de corte para a pecuária brasileira***

A caprinovinocultura de corte está se firmando como uma importante atividade geradora de divisas, através da produção de carne, de alto valor biológico, pele de excelente qualidade e com o aproveitamento dos componentes comestíveis não constituintes da carcaça, na confecção de embutidos e pratos preparados (CARVALHO, 2003). No mercado nacional e internacional observa-se ampla possibilidade para a comercialização do produto, desde que atenda às exigências de qualidade, quantidade ofertada, padronização dos produtos derivados da carne e continuidade na oferta (CARVALHO, 2003).

Além dos aspectos discutidos acima, um forte mercado importador deste produto é o Oriente Médio, que, segundo Carvalho (2003), é considerado um dos mais atrativos do mundo, devido a fatores religiosos, hábito de consumo domiciliar, elevado poder aquisitivo, limitação de área para exploração de atividades agropecuárias, entre outros fatores.

Segundo Zanella (2007), a produção mundial de carne ovina e caprina contabilizou, em 2006, cerca de 13 milhões de toneladas, sendo 8,4 milhões de carne ovina e 4,6 milhões de carne caprina que, quando comparado com a produção mundial de carne bovina, é quase cinco vezes menor. Em 2007 a produção mundial de carne caprina chegou a 5,146 milhões milhões de toneladas e a ovina a cerca de 8,9 milhões. Já em 2008, com dados preliminares, foi feito uma estimativa de 14,143 milhões de toneladas de carnes caprinas e ovinas e a projeção para 2009 foi

de 14,209 milhões de toneladas, sendo esta realizada em agosto de 2008 (FAO, 2008 ).

A carne caprina apresenta o 2º maior índice de dinamismo entre 1975 e 2007, superada somente pela carne de aves, com um crescimento da produção de 364,5%, e encurtando a distância que a separava da carne ovina, esta com 247,5% (informação verbal).<sup>1</sup>

No Brasil, onde se consome 87 kg/hab/ano, só 0,7 kg é de carnes caprina e ovina (ZANELLA, 2007). Isso ocorre porque o consumo dessas carnes é extremamente localizado e o país não é auto-suficiente nem para seu mercado interno.

A cadeia produtiva da caprinocultura de corte no Brasil ainda é bastante incipiente e frágil, necessitando de mudanças culturais importantes, especialmente no setor produtivo e nas lideranças, para torná-la competitiva e consolidada no cenário nacional (SOUSA, 2007).

No Nordeste brasileiro a caprinocultura não é vista como uma atividade empresarial, sendo considerada uma atividade marginal. Isso porque é sempre associada às áreas pobres e marginais, onde os caprinos se destacam como a única fonte de renda segura de pequenos criadores (em áreas marginais) e, nessas circunstâncias, são o único meio de sobrevivência de muitas famílias, assumindo, assim, uma grande importância social. No entanto, dados da Organização Mundial para Agricultura e Alimentação –FAO- (2010) indicam que nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a maioria da produção animal é feita em sistemas

---

<sup>1</sup> Informação Verbal. Desortzart, O. Panorama do Mercado Mundial de Carnes com ênfase em Caprinos e Ovinos. Palestra na 6ª Feira Internacional FEINCO, em Mar. 2009.

de produção locais com baixos investimentos e baseada em técnicas locais de produção, sendo a base da alimentação das famílias nessas regiões.

Entretanto, a necessidade crescente de alimentos de origem animal e a pressão do mercado conduziram à criação intensiva e direcionada, ao melhoramento genético, embora algumas raças sejam mais utilizadas em detrimento de outras, podendo levá-las ao desaparecimento, o que, por sua vez, pode ser traduzida numa ameaça real à amplitude da variabilidade biológica (RANGEL, 2004).

## **2.2 Taxonomia caprina**

Os caprinos pertencem ao Gênero *Capra*, Família *Bovidae*, Sub-família *Ovinae* e ordem *Artiodactyla*. Há aproximadamente 450 milhões de caprinos em todo mundo, a maioria, sendo encontrada na Ásia e Oriente Médio (MCKENZIE-JAKES, 2007) e representam importante fonte de proteínas, como a carne e o leite e, desde antes de sua domesticação, teve sua pele empregada como vestuário.

Existe uma enorme variedade de raças e, segundo a maioria dos autores, agrupadas pela sua área de dispersão, constituindo três grandes grupos ou troncos: o europeu, o asiático e o africano. Segundo Luikart et al. (2001), existem origens maternas múltiplas, sendo três linhagens distintas da *Capra hircus* com possível centro de origem na Ásia.

## ***2.3 Raças caprinas utilizadas***

### ***2.3.1. Anglo-Nubiana***



Pertencente às raças do tronco das cabras Asiáticas - Africanas, sendo originária da Inglaterra, do cruzamento com cabras comuns Inglesas com bodes Nubianos, importados da Núbia, Índia e Arábia. O resultado foi uma raça muito rústica de dupla aptidão, a Anglo-Nubiana de dupla função (carne e leite). Essa raça é explorada em vários países e foi introduzida no Brasil por volta de 1932 (BERRO, 2010).

Hoje a Anglo-Nubiana, apesar de ser considerada de dupla aptidão, é a principal raça utilizada no Brasil para a produção de carne (MARTINS JUNIOR et al., 2007). Os animais desta raça são, em geral, rústicos e prolíficos, de grande porte, com pelos curtos e pele variada, sendo aceito qualquer cor para efeito de registro genealógico. Suas orelhas são longas, de implantação alta, sua pele é solta, predominando a cor escura, da mesma forma que as mucosas (RIBEIRO, 1997).

### 2.3.2. Boer



Originária da África do Sul, pertencente ao tronco Asiático – Africano, a raça Boer é o resultado do cruzamento de várias raças caprinas, especialmente de cabras Indianas com a Angorá. Essa raça vem sendo selecionada desde o final do século passado, quando os criadores de cabras procuraram animais rústicos, robustos e harmoniosos.

Nas últimas duas décadas houve uma incrível expansão territorial da raça Boer e hoje está presente em todas as regiões do mundo, tendo sucesso nos mais variados climas, desde o frio do Canadá até o clima tropical do Nordeste brasileiro.

A raça Boer foi introduzida no Brasil na década de 90, e é a única raça caprina especializada exclusivamente para a produção de carne, disponível em considerável escala no Brasil (MADRUGA, 1999).

O padrão da raça definido pela Boer Goat Breeder's Association estipula a cor branca com cabeça vermelha ou escura, pele pigmentada e boa conformação funcional. O corpo é profundo, com ampla massa muscular, bem distribuída e com cascos fortes e escuros (RIBEIRO, 1997).



#### ***2.4. Uso de marcadores moleculares no melhoramento animal***

A genética quantitativa, ciência na qual grande parte da teoria do melhoramento animal está apoiada, teve seu desenvolvimento e uso baseado quase que exclusivamente na suposição de que a variação genética em características quantitativas de interesse é controlada por poligenes, isto é, muitos genes de pequeno efeito (KINGHORN et al., 1999). As informações obtidas por meio de DNA, juntamente com os registros fenotípicos, podem ser extremamente úteis para o aumento da acurácia na predição dos valores genéticos e, conseqüentemente, da resposta obtida no processo de seleção (DE VRIES et al., 1998).

Curi (2004) classifica os marcadores moleculares de duas formas:

a) diretos (como no caso dos polimorfismos em genes que codificam proteínas que atuam influenciando nas características fenotípicas de interesse, quer seja pela função da própria proteína, quer seja por sua atuação como intermediário em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo, contribuindo, assim, para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de controle da função gênica).

b) indiretos (por exemplo, como na maioria dos casos em que marcadores microssatélites são relacionados a um QTL);

A utilização de marcadores moleculares no melhoramento animal vem se tornando cada vez mais rotineira, para o conhecimento da diversidade genética das espécies, confirmação de genealogias duvidosas, testes de paternidade, assessoramentos em acasalamentos dirigidos e seleção assistida por marcadores (MAS).

O hormônio do crescimento (GH) atua no organismo regulando, não apenas o crescimento propriamente dito, mas também funções como a galactopoiética, a gliconeogênese, a ativação da lipólise, a incorporação de aminoácidos nas proteínas dos músculos (GLUCKMAN et al., 1987) e, ainda, a ativação de processos imunes envolvidos na resistência à doenças (ARKINS et al., 1993).

A leptina, hormônio produzido e secretado pelos adipócitos, influencia diferentes vias metabólicas, alterando o consumo de alimento e o gasto de energia. O gene da leptina (gene *ob*) foi identificado e caracterizado em camundongos por Zhang et al. (1994). Segundo Peyon et al. (2003), existem fortes evidências de que este gene possa atuar indiretamente nos processos de crescimento pelo controle da secreção da somatolactina e também estar envolvido na adaptabilidade às condições de estresse. O estudo deste gene em animais domésticos tem crescido nos últimos anos e, em alguns desses animais, a busca por polimorfismos visa investigar e responder se as alterações encontradas podem ou não estar correlacionadas com características produtivas e reprodutivas (SOARES et al., 2006).

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos em busca da associação de genes com características de interesse econômico, como os de Kumar et al. (1998), que estudaram a expressão do mRNA *obeso* em ovino; Soares et al. (2006), ao estudarem o polimorfismo no gene da obesidade em suínos; Silva et al. (2002), que associaram o polimorfismo do gene da leptina com as concentrações da mesma no soro em vacas leiteiras; Bonnet et al (2004); Peixoto et al. (2004), que estudaram a influência do gene da leptina na reprodução em suínos; Chilliard et al. (2001), entre outros.

Williams (2002) relata que a leptina tem papel importante no metabolismo energético, no consumo de alimentos, além de importantes eventos, como puberdade, reprodução e regulação de FSH e LH. As concentrações da leptina circulante refletem, em parte, a quantidade fina de tecido adiposo no corpo de roedores, humanos (FRIEDMAN; HALAAS, 1998, apud LIEFERS et al., 2003) e ruminantes (CHILLIARD et al. 2001). Este hormônio age sobre o sistema nervoso regulando o peso corporal, influencia a deposição de gordura através do controle do apetite, gasto de energia e desempenho reprodutivo, apontado como hormônio envolvido no processo de puberdade de vários grupos de vertebrados (DOYON et al., 2001).

Em bovinos, o gene da leptina encontra-se no cromossomo 4 (BTA4) e vem sendo associado a deposição de gordura e características relacionadas ao rendimento de carcaça, estando associado ao microssatélite BM1500, que está relacionado ao teor de gordura em carcaças (FITZSIMMONS al., 1998).

Buchanan et al. (2002) em estudo realizado com raças britânicas (Hereford e Angus) e continentais (Charolês e Simental), observaram transição de citosina (C) por timina (T) no éxon 2 do gene da leptina bovina, responsável pela mudança de arginina por cisteína na sequência de aminoácidos, mostrando que a frequência do alelo T estava associada a carcaças mais gordas (raças britânicas). Já a frequência do alelo C foi associada a carcaças mais magras (raças continentais).

Segundo Coutinho e Reginato (2001), alguns genes que vêm sendo estudados codificam hormônios na regulação do crescimento (hormônio de crescimento – GH

e fator de crescimento semelhante à insulina – IGF-I), prolactina, k-caseína,  $\beta$ -lactoglobulina e outros potencialmente importantes.

O gene do hormônio do crescimento exerce importantes funções biológicas na regulação do crescimento animal (GLUCKMAN et al., 1987) e nos processos envolvidos na resistência à doenças. Estudos sobre a estrutura do bGH em bovinos têm sido associados aos polimorfismos encontrados para produção (HOJ et al., 1993), peso ao nascimento (ROCHA et al., 1992), e ainda à composição e qualidade de carcaça (TAYLOR et al., 1998). Também tem sido bastante investigado o polimorfismo leucine/valine (Leu/Val) de uma única base no quinto éxon do gene GH em bovinos. Este produz duas variantes do gene, que diferem pela presença de leucine (L) ou de uma valine (V) no segmento 127 do aminoácido (LUCY et al., 1991).

Zwierzchowski et al. (2001) verificaram que touros das raças Charolês, Limousin, Red Angus, Simental e Hereford com genótipo (VV) apresentaram maior ganho de peso diário e, conseqüentemente, eram mais pesados que os dos outros genótipos. Já Distasio et al. (2002) não verificaram associação entre polimorfismo *bGH* e características de produção de carne em bovinos da raça Piemontesa. Estes resultados contraditórios provam que não é fácil avaliar os efeitos de um determinado polimorfismo sobre as características de carcaça e de crescimento, fazendo-se necessário mais estudo para que o polimorfismo da V/L possa ser empregado em programas de melhoramento.

A melhoria na relação entre o desenvolvimento de tecido magro e a deposição de gordura significa melhor conversão alimentar, menor custo à pecuária

e menos pressão nos recursos mundiais (SILLENCE, 2004). Estudos vêm sendo desenvolvidos para a descoberta de genes envolvidos com a manifestação e o controle de etapas fisiológicas, como fortes candidatos a possuírem marcadores moleculares de utilidade para a seleção genética.

No entanto faz-se indispensável a validação do efeito desses marcadores nas distintas raças de caprinos existentes no Brasil, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na sua manifestação.

### ***2.5. Polimorfismos Genéticos***

Na área de genética, o termo polimorfismo significa a ocorrência de dois ou mais alelos em uma população, sendo o alelo mais raro encontrado numa frequência maior que 1% (BALASUBRAMANIAN et.al., 2004). Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas regiões dos cromossomos podem haver diferentes versões de uma certa sequência de bases.

Uma população pode possuir um polimorfismo extensivo a nível do genótipo. Muitas variantes de sequência diferentes podem existir em um determinado *locus*; algumas delas são evidentes, porque afetam o fenótipo, mas outras estão ocultas, por não ter efeito visível (LEWIN, 2001).

Os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos e associados a genes localizados na região cromossômica próxima a eles (linkage). Esses ainda são responsáveis pela diversidade nas espécies, pois

diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos (OLSSON et al., 2001).

## **2.6. PCR-RFLP**

Entre os diversos marcadores disponíveis estão os marcadores do tipo CAPS que, segundo Faleiro (2007), são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de *primers* específicos (20 a 30pb), seguidos da digestão com endonucleases de restrição (WILLIAMS et al., 1991). Esse tipo de marcador genético é também conhecido como PCR-RFLP (HELA et al., 2004). A obtenção desses marcadores consta de extração e amplificação de DNA via PCR, digestão com enzimas de restrição, eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida e a visualização dos polimorfismos pela coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta. As principais vantagens são a codominância e a alta reprodutibilidade desses marcadores. A principal desvantagem é a necessidade de conhecimento prévio da sequência de DNA para a construção dos *primers*. A vantagem do PCR-RFLP, em relação a RFLP é que o primeiro não requer o tempo e os reagentes necessários às etapas de hibridização e visualização por radiografia.

Esse marcador é comumente utilizado em estudos taxonômicos por ser simples e abranger diversas regiões do genoma, incluindo as não transcritas (FERREIRA & SOUZA-CHIES, 2005).

## 2.7. *Microssatélites*

Um importante avanço na obtenção de marcadores hipervariáveis unilocais veio da utilização de DNA repetitivo, as sequências microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*). Os microssatélites são caracterizados por repetições em *tandem* de um mono, di, tri, ou tetranucleotídeo, localizadas dentro de regiões de sequência única. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 10 pares de nucleotídeos (TAUTZ, 1989).

Os microssatélites podem ser amplificados de maneira específica pela técnica de PCR, utilizando *primers* que contêm parte da sequência flanqueadora. A amplificação resulta em produtos de diferentes tamanhos, em função do número de cópias da sequência repetitiva delimitada pelos *primers*. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos *locos* microssatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente. Há necessidade, portanto, de separar os produtos de PCR por eletroforese em gel de alta definição (FALEIRO, 2007).

Esse mesmo autor relata que a coloração pode ser com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração por brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites pode ser feito pela análise de sequências contidas em bancos de dados, localizando-se aquelas que contêm SSRs e delineando-se *primers* para região que flanqueia a repetição. Outra estratégia bastante empregada é a seleção de fragmentos contidos em uma biblioteca

genômica. Distorções da segregação podem surgir em decorrência da “expansão” ou “contração” do microssatélite durante a meiose. A frequência desses eventos é da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  por *loco*, por gameta (HOLMES, 1994).

## ***2.8. Identificação de locus de interesse econômico***

Os procedimentos utilizados para detectar associações entre marcadores e características de interesse econômico seguem dois caminhos: gene candidato e varredura genômica. A detecção através do gene candidato baseia-se no estudo da variação fenotípica de uma característica, pelo estudo no grau de polimorfismo na sequência de nucleotídeos de genes previamente conhecidos por estarem envolvidos na fisiologia (ROTHSCHILD; SOLLER, 1999). A varredura genômica faz uso de marcadores moleculares distribuídos por todo o genoma. Ambos procedimentos podem ser usados de forma alternativa na detecção de genes.

### ***2.8.1 Gene Candidato***

Entende-se por genes candidatos, genes já clonados, sequenciados, de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma característica de interesse econômico (BRYNE; MCMULLEN, 1996). Essas sequências gênicas podem ser estruturais ou regulatórias em uma via bioquímica que afeta a característica. O procedimento de genes candidatos utiliza informações prévias sobre a função e a fisiologia de genes previamente identificados. Essa técnica é uma forma abrangente de se pesquisar o genoma uma vez que o gene é



escolhido, baseado em evidências de que o peptídeo que ele codifica tem efeito biológico ou fisiológico (Ninov, 2006).

O estudo de genes candidatos envolve uma série de etapas: escolha dos genes, desenho de *primers* para amplificação, identificação de polimorfismos, estabelecimento da técnica de genotipagem dos sítios polimórficos, formação de uma população referência para a genotipagem e finalmente realização dos testes de associação com características fenotípicas desta população (SOUZA, 2004).

Silva (2005) relata que para detectar associação entre o gene candidato e a característica de interesse é preciso localizar formas alternativas do gene, resultado de mutações de ponto em sua sequência de nucleotídeos. Para isto, é preciso sequenciar um grupo de indivíduos de uma população segregante para localizar os polimorfismos na sequência do gene. Se a mutação identificada no gene causa variação fenotípica de interesse, é possível fazer a seleção direta, não havendo necessidade de dados da família.

Guimarães (2001) e Rothschild e Soller (1999) relatam as seguintes vantagens da análise de genes candidatos: ausência de recombinação, alto poder estatístico, baixo custo, simplicidade operacional e ampla aplicabilidade. A principal limitação da técnica consiste no fato de que somente uma pequena proporção dos genes que controlam características quantitativas é conhecida. O efeito pleiotrópico e de epistasia de outros genes sobre o gene candidato, podem desencadear em alto custo da etapa inicial de detecção de polimorfismo e a dificuldade no estabelecimento definitivo do efeito do gene candidato, pois a identificação da variante causal para um gene de efeito menor pode não ser facilmente determinada.

### **2.8.2. Varredura Genômica**

A varredura genômica ou *wide genome scanning* é um método que tem demonstrado ser bastante efetivo na localização de regiões envolvidas na expressão de característica de interesse. Esta metodologia utiliza marcadores espalhados pelo genoma para identificar regiões que afetam características quantitativas, sem a necessidade do conhecimento prévio dos genes envolvidos na expressão do fenótipo de interesse (SILVA, 2005).

Uma das desvantagens desse procedimento é ser um processo demorado e de custo bastante elevado. Isso por necessitar a genotipagem de centenas de indivíduos com marcadores por todo o genoma.

### **2.9. Leptina**

A leptina é o sinal aferente que informa ao hipotálamo sobre o estado dos depósitos de gordura corporal (SOARES et al., 2006). É considerada uma proteína de 16 kDa, produto do gene *obeso* (*ob*), secretado como um hormônio dos adipócitos, tendo sido proposto como “fator indefinível”, ligando *status* metabólicos e reprodução (COSTA, 2002). Age no hipotálamo para controlar a termogênese e a ação da insulina, regulando a expressão e secreção de múltiplos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios hipotalâmicos, dentre eles o neuropeptídeo-Y (NPY), hormônio de liberação do hormônio do crescimento (GHRH) e somatostatina (SS) (PEIXOTO et al., 2004).

A leptina é sintetizada principalmente no tecido adiposo branco (maior sítio de produção) (NEGRÃO et al., 2000), bem como no epitélio gástrico e na placenta.

Os estudos com a leptina iniciaram-se nos anos 50, em roedores geneticamente obesos (ob/ob), em que estes animais apresentavam a síndrome de obesidade massiva, hiperfagia, resistência à insulina, hiperinsulinemia, diabetes não dependente da insulina, intolerância ao frio e infertilidade (Costa, 2002). Zhang et al. (1994) identificaram e caracterizaram o gene da leptina (gene ob ou gene da obesidade) em camundongos. Uma mutação de CGA para TGA (C→T) resulta na substituição de uma arginina na posição 105 para um códon de finalização na leptina, formando uma proteína inacabada, que não é liberada na corrente sanguínea.

O gene do receptor da leptina (OB-R) foi isolado em camundongos db/db que apresentaram fenótipo similar ao dos camundongos ob/ob, além de apresentarem insensibilidade à leptina. OB-R é membro da superfamília de receptores de citocina de classe I (Huisin et al., 2006). Em mamíferos, foram descritas duas isoformas de OB-R: a forma curta (OB-RS), amplamente expressa no organismo, e a forma longa (OB-RL), com padrão de expressão mais restrito, que inclui o núcleo hipotalâmico, importante para a regulação do peso corporal. Existe evidência de que a isoforma curta, OB-RS, possa estar envolvida com o transporte e eliminação da leptina, entretanto, sua função precisa permanece desconhecida. A isoforma OB-RL é um receptor de sinalização que transduz o sinal e induz a transcrição dos genes controlados pela leptina. A mutação db no gene OB-R impede a transcrição da isoforma longa, OB-RL e, portanto, sua ação como receptor hipotalâmico (White, 2000).

A expressão da leptina é influenciada por vários fatores e esta, por sua vez, tem muitos efeitos estimulantes e inibidores no eixo neuroendócrino, além do controle do peso corporal e do apetite (AHIMI; FLIER, 2000). Em caprinos, os

fatores fisiológicos que envolvem a regulação da leptina, ainda não são bem descritos (Bonnet et al., 2005).

A secreção da leptina gástrica é causada por um incremento da secreção de CCK (colecistoquinina) estimulada pela alimentação. Acredita-se que exista um mecanismo sinérgico e funcional entre a leptina e CCK, resultando em um controle do consumo a curto prazo. Sansinane et al. (2001) relataram que o nível de leptina no soro aumenta no período pós-prandial em novilhas Hereford com deficientes taxas de ganho de peso em função de diferentes níveis nutricionais. Os mesmos autores indicaram, ainda, que o nível de leptina no soro durante 60 dias de alimentação não variou entre os animais que ganhavam 0,27; 0,31 e 0,0 kg/cab/dia.

Em ruminantes e não-ruminantes, alguns estudos sobre CCK mostram que ela induz à supressão do consumo. Já os receptores do mRNA da leptina não foram detectados em nenhum dos quatro compartimentos gástricos, mas foram detectados no duodeno dos ruminantes, possivelmente regulando o consumo a curto prazo. A ausência da leptina no rúmen, retículo, omaso e abomaso pode estar relacionada à flora ruminal (SANSINANE et al., 2001).

Em pré-ruminantes lactantes, o mRNA da leptina e seus receptores estão presentes nos sistemas gástricos e, então, a leptina pode exercer o controle do consumo, assim como nos não ruminantes. A expressão da leptina cessa quando começa a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) após o desmame com a mudança da dieta e em função da idade.

Peixoto et al. (2004) observaram em suínos que os genótipos da leptina para o polimorfismo da enzima FokI apresentaram associação positiva com características produtivas numa população experimental.

Segundo Kumar et al. (1998), a sequência de aminoácidos do gene obeso é altamente conservada entre as espécies em que a sequência do ovino é cerca de 95,6; 92,8; 88,2; 83,6; 82 % idêntico ao bovino, suíno, humano, rato e camundongo.

### **2.10. Hormônio do crescimento GH**

O GH (*Growth Hormone*), como o nome sugere, é o hormônio do crescimento e desenvolvimento. É conhecido também sob a denominação de somatotrofina ou hormônio somatotrófico - SHT (*Somatotrophic Hormone*). Faz parte de uma família de hormônios somatolactogênicos (crescimento, morfogênese e reprodução) e é excretado pelas células somatotróficas da hipófise anterior ou adeno-hipófise, sendo liberada através de vários estímulos.

O *gh* tem ação no crescimento, atuando no metabolismo intermediário de lipídeos, carboidratos e proteínas e desempenha uma função fundamental que se integra à diversidade fisiológica endócrina, em conjunto com a insulina e o glucagon. Segundo Douglas (1999), o *gh* age sob diferentes tecidos como osso, cartilagem, músculo, fígado, coração e vísceras em geral.

Estudos mostram que o polimorfismo encontrado nos genes do eixo somatotrófico afeta a expressão gênica a nível transcricional e traducional (LO et al., 2003; WYSZYNSKA-KOKO et al., 2006). A síntese de GH é aumentada pelo seu hormônio de liberação hipotalâmico específico (GHRH), que causa a rápida estimulação da transcrição do gene. O hormônio tireóideo e o cortisol induzem sinergicamente a síntese de GH por mecanismos transcricionais, sendo sua liberação estimulada pelo GHRH (BERNE; LEVY, 1996). A síntese dos receptores de GH

necessita da presença do próprio GH, mas um excesso de GH regula para baixo seus receptores. O receptor do GH também é induzido pela insulina e pelos estrogênios e é reprimido pelo jejum.

Receptores moleculares específicos de GH (GHR) têm sido encontrados em muitos tecidos, inclusive no músculo; contudo, são mais abundantes no fígado (DOUGLAS, 1999).

A estrutura genômica do GH tem sido estudada em diferentes animais e tem se mostrado bastante similar entre as espécies. O GH caprino foi isolado e caracterizado por Kioka et. al., (1989). Este gene está localizado no cromossomo 19 da cabra, contém 5 éxons, intercalado por 4 íntrons, totalizando 2544 pares de bases.

Spagnolia (1996) relata que os níveis de GH no corpo são regulados por mensageiros químicos, incluindo macronutrientes, neurotransmissores, hormônios como a somatostatina (SS) e o hormônio liberador do GH (GHRH).

Na espécie caprina foram encontrados polimorfismos do gene gh nos éxons de 1-5 e esses foram associados positivamente à produção de leite (MALVEIRO et al., 2001). A associação dos polimorfismos do GH bovino com parâmetros da curva de crescimento foi descrita por Paz et al., (2004), com o peso ao nascimento (ROCHA et al., 1992) e também com a composição e qualidade da carne (TAYLOR et al., 1998), em peixes foi associado com o peso do filé e rendimento de carcaça (BLANCK, 2009), em suínos os polimorfismo foram associados a performance e características de carcaça (FRANCO, 2005). Estudos com frangos de corte mostraram ser altamente polimórficos nas regiões íntrons e os alelos identificados estão possivelmente associados à gordura abdominal (FOTOUHI et al., 1993), produção de ovos (IP et al., 2001) e ganho de peso (NIE et al., 2002).

Os animais que proporcionam terminação de carcaça precoce apresentam perfil metabólico hormonal diferenciado dos animais de maior crescimento de massa muscular (ELSASSER et al., 1989). Segundo o autor, tal fato foi demonstrado pelas diferenças encontradas no crescimento e na deposição dos tecidos na carcaça em animais de mesma idade. Em meio a essas diferenças destaca-se o papel dos hormônios do eixo-somatotrófico nas diversas fases do crescimento animal (OWENS et al., 1993).

As principais características avaliadas em reprodutores de corte são: o desenvolvimento ponderal, a eficiência alimentar, a maciez da carne, a gordura marmorizada e de cobertura, embora isso venha sendo feito com pouco conhecimento de suas bases genéticas e bioquímicas. Os avanços da Genética Molecular servirão para suprir essas lacunas do conhecimento, pois permitirão estudar, com maior profundidade, os genes envolvidos nas principais vias metabólicas relacionadas ao crescimento animal (SCHWERIN et al., 1995).

### ***2.11. A Bio-informática na Genética Molecular***

A Bio-Informática é uma atividade estratégica que utiliza recursos computacionais para atender às necessidades da pesquisa e desenvolvimento dos projetos com genoma. Essa nova ciência envolve a união de diversas linhas de conhecimento, ou seja, Engenharia de *Softwares*, Matemática, Estatística, Ciência da Computação e Biologia Molecular (SANTOS et al., 2010).

Esta nova ferramenta permitiu muitos avanços nos estudos, tais como o projeto genoma humano, genoma da cana-de-açúcar, genoma bovino, entre outros.

Esses projetos têm como objetivo o sequenciamento completo do genoma dos organismos vivos. Segundo Galves (2004), outros projetos menores têm sido muito úteis para o aperfeiçoamento das técnicas e tecnologias utilizadas em sequenciamento, além de apresentarem resultados práticos em várias áreas como medicina e agronomia.

O número de programas utilizados em bio-informática tem crescido significativamente nos últimos anos e inclui ferramentas diversas, como algoritmos para agrupamento de sequências, alinhamento de sequências de nucleotídeos e proteínas, predição de genes inteiros (ORF1s) em sequências, anotação automática de genes, construção de árvores filogenéticas e outros.

Além disso, o progresso de muitos estudos foi possível graças ao estabelecimento de banco de dados públicos, que permitiu aos cientistas o acesso à informação proveniente de outros laboratórios para troca e compartilhamento de sequências genéticas (WHELLER *et al.*, 2002). Assim, todos os dias novas sequências são depositadas no banco de dados públicos do NCBI (*National Center for Biotechnology information*), o chamado GenBank, e disponibilizados para a comunidade científica.

Através da bio-informática, hoje é possível o estudo de SNPs-Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de base única). Este método consiste em estudar SNPs utilizando as sequências de DNA aliado a ferramentas computacionais, em que se escolhe uma região genômica de interesse e sequencia-se esta região de vários indivíduos (GALVES, 2004).

Atualmente, estão disponíveis pacotes computacionais para a detecção de SNPs, como, por exemplo, o pacote o PolyPhred



(<http://drog.mbt.washington.edu/PolyPhred.html>). Alguns estudos com SNP's já foram realizados, destacando-se o de Silva (2008), trabalhando com bovinos, na avaliação de carcaças; Michalczechen-Lacerda et al. (2007), estudando a prospecção e caracterização de polimorfismo no gene que codifica o hormônio folículo estimulante em bovinos Nelore, Simental e Jersey; Ferreira et al. (2005), analisando as mutações no gene da miostatina (GDF8) em duas raças de bovinos Blanc Bleu Bege e Preta; Santos (2005), estudando o gene da lignificação em eucalyptos, entre outros.

### **3. OBJETIVO**

Face à escassez de informações de estudos do gene da leptina e do receptor do hormônio do crescimento em raças caprinas exóticas, especializadas na produção de carne mais utilizados atualmente no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo do polimorfismo do gene da *leptina* (LEP) na região do éxon 2 e do gene do receptor do hormônio do crescimento (SSR-*GHR*), investigando a ocorrência de polimorfismos e sua associação com as características de peso ao nascer e desmame em caprinos da raça Boer e Anglonubiana.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

1. Genotipar os animais para o marcador de microssatélite do *ghr* (SSR-GHR) e o gene da LEP no éxon2;
2. Determinar as frequências alélicas e genotípicas para os marcadores SSR-GHR e LEP no éxon 2 nos grupos genéticos estudados;
3. Avaliar as diferenças nas frequências alélicas e genotípicas obtidas entre os grupos genéticos estudados, correlacionando os achados com as características produtivas das raças analisadas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMI, A.S. E FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinology. Metabolism*, v. 11, p. 327-332, 2000.

ARKINS, S., DANTZER, R., KELLEY, K.W. Somatolactogens, somatomedins, and immunity. *Journal Dairy Science*, 76:p.2437-2442. 1993.

BALASUBRAMANIAN NJ SP, COX A, BROWN, REED MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *European Journal Surg Oncology*; 30(6): p. 593-601, 2004.

BERRO, 2010. Disponível em <[www.revistaberro.com.br](http://www.revistaberro.com.br)[http://www.caprinovinocultura.com.br/site/anglo\\_nubiana.php](http://www.caprinovinocultura.com.br/site/anglo_nubiana.php)> Acesso no dia 20/03/2010.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. 3<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 48, p. 842-889, 1996.

BLANCK, D.V. et al. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia-do-nilo *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.44, n.6, p.599-604, jun. 2009

BONNET, E. et al. Evidence that micro RNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*. 2004 Nov 22;20(17):2911-7. *Epub* 2004 Jun 24, 2004.

BONNET, M. et al. Pregnancy increases plasma leptin in nulliparous but not primiparous goats while lactation depresses it. *Domestic Animal Endocrinology*. v. 28 , p. 216-223, 2005.

BROWN, T.A. *Genética: um enfoque molecular*. 3º Edição. 1999.

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

BUCHANAN, F.C. et al. Association of a missence mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, Paris, V.34, n.1, p. 105-116, 2002.

CARVALHO, R. B. de. Potencialidades dos Mercados para os Produtos Derivados de Caprinos e Ovinos. 2003. <http://www.capritec.com.br/pdf/CAPRITEC.doc>. Acesso dia 25/02/2010. as 19:30, 2003.

CHILLIARD, Y. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Animal Endocrinology*. 21, p.271–295, 2001.

CORREIA, F. W. S. 2007. Perfil setorial da caprinovinocultura no Mundo, Brasil, Nordeste e Sergipe. Sebrae [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/49A7E70DA9FFD4FA832573840040EE7C/\\$File/PERFIL%20SETORIAL%20DA%20CAPRINOVINOCULTURA.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/49A7E70DA9FFD4FA832573840040EE7C/$File/PERFIL%20SETORIAL%20DA%20CAPRINOVINOCULTURA.pdf). Acesso dia 10/06/2008. as 10:00.

COSTA, E. C. Leptina: mais um hormônio na regulação do metabolismo. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do tecido animal – Programa de Pós graduação em Ciências Veterinária - UFRG. 2002.

COUTINHO, L. L. et al. Genômica Animal. [http://www.cnpsa.embrapa.br/genomafrango/publica/20062007/Zootec\\_Luiz%20Coutinho\\_final2007.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/genomafrango/publica/20062007/Zootec_Luiz%20Coutinho_final2007.pdf). (acesso: 02/06/2008).

COUTINHO, L. L.; REGINATO, L. C. A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGINATO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.) *Biologia molecular aplicada à produção animal*. 1º edição. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*. p. 11-24, 2001.

CURI, R.A. *Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2004.

DE VRIES, A.A. et al. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. *Meat Science*, 49(Supplement 1):s245, 1998.

DEKKERS JCM, HOSPITAL F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews* 3, p.22-32, 2002.

DESOUZART, O. Panorama do Mercado Mundial de Carnes com ênfase em Caprinos e Ovinos. *Palestra na 6º feira Internacional FEINCO*, em Marc, 2009.

DISTASIO, L.; SARTORE, S.; ALBERA, A., 2002: Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Animal Genetic*. 33: p.61–64, 2002.

DOUGLAS, C. R. *Tratado de fisiologia aplicada à ciência da saúde*. 4º edição. São Paulo: Robe Editora, cap. 71, p. 1022- 1035, 1999.

DOYON, C. et al. Molecular Evolution of Leptin. *General and Comparative Endocrinology*, v. 124, p. 188–198, 2001.

ELSASSER, T. H.; RUMSEY, T. S.; HOMMOND, A. C. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *Journal of Animal Science, Champaign*, v. 67, p. 128-141, 1989.

FALEIRO, F. G. Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 102 p., 2007.

FAO. 2008 *Food Outlook*. Global Market Analysis. Novembro 2008. <http://foostat.fao.org>.

FAO. 2010 Breeding strategies for sustainable management of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. No. 3. Rome.

FERREIRA, M.F. et al. Detecção por análise de SNPs de 7 mutações no gene GDF8 (Miostatina) em duas raças bovinas. Nos resumos do II Encontro Nacional de Marcadores Moleculares, EZN, *Anais...* Vale de Santarém, 2005.

FITZSIMMONS, C.J. et al. Potencial association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome*, New York, v.9, p. 432-434, 1998.

FOTOUHI, N. et al. Identification of growth hormone DNA polymorphism which respond to divergent selection for abdominal fat continent in chickens. *Teoretical and Applied Genetics*, v.85, p.931-936, 1993.

FRANCO, M.M. et al. Association of P1T1, GH and GHRH polymorphisms wthi performace and carcass traits in Landrace pigs. *Journal of Apllied genetics*, Polônia, n. inpress, 2005.

GALVES, M. 2004. Uma abordagem computacional para a determinação de polimorfismo de base única. [www.ic.unicamp.br/~zanoni/orientandos/miguel/PropostaMiguel.pdf](http://www.ic.unicamp.br/~zanoni/orientandos/miguel/PropostaMiguel.pdf). Acesso: 15/05/2010. As 20:30.

GLUCKMAN, P.D., BREIER, B.H., DAVIS, S.R. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. *Journal Dairy Science*, 70:p.442-466, 1987.

GUIMARÃES, S.E.F. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: Pereira, J.C.C. Melhoramento genético

aplicado a produção animal. 3ª edição. Belo Horizonte: CEPMUZ. Editora, p.445-478. 2001.

HELA, S. et al. Genetic polymorphism of plastid DNA in Tunisian date-palm germplasm (*Phoenix dactylifera* L.) detected with PCR-RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, v.51, p.343-349, 2004.

HOJ, S. et al. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics*, 24:91-96, 1993.

HOLMES, N. G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. *British Veterinary Journal*, London, v. 150, p. 411-421, 1994.

HUISING, M. O., KRUISWIJK, C. P., and FLIK, G. *Journal of Endocrinology* 189, p. 1-25, 2006.

IBGE. Pesquisa Agropecuária Municipal. < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/> >. Acesso em: 12 març. 2007.

IP, S.C.Y, ZHANG X. AND LENG. F.C. (2001) Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. *Experimental Biology and Medicine* 226(5): p.458-462.

KINGHORN, B., J. VAN DER WERF, AND J. DEKKERS. Quantitative genetics for new technologies in animal breeding. *A course notes*. Perth, Australia. (Mimeog.), 1999.



KIOKA, N. et al. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 162:p.224–231. 1989.

KUMAR, B.; FRANCIS, S.M; STUTTIE, J.M, TOMPSON, M.P. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheeps. *Com. Bicochem Molecular Biology*, V.120, p.543-548, 1998.

LEWIN, BENJAMIN. *Genes VII*. Editora ARTMED. São Paulo, SP. 2001. P. 39-42.

LIEFERS, S.C. et al. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian genome* Volume 14, p.657–663, 2003.

Lo, H. S. et al. 2003. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res.* 13:1855–1862, 2003.

LUCY, M.C. et al. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. *Journal Dairy Science*, 74:284 (Suppl. 1), 1991.

LUIKART G. et al. Multiple maternal origins and work phylogeographic structure in domestic in domestic goats. *Pnas*, V. 98, n.10, p.5927-5932, 2001.

MADRUGA, M. S. et al. Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRD e mestiços de Boer. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, 25(4): p.713-719, out.-dez. 2005.

MADRUGA, M.S. Artigo Técnico- Carne Caprina: Verdades e Mitos à luz da Ciência. *Revista Nacional da Carne*. V. 23, n. 264, p. 34-40, fev., 1999.

MALVEIRO E. et al. Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the algarvia goat: possible association with milk traits. *Small Ruminants. Res.*, 41, 163-170, 2001.

MARTINS JÚNIOR, L.M. et al. Respostas fisiológicas de caprinos Boer e Anglo-Nubiana em condições climáticas de Meio-Norte do Brasil. *Revista Caatinga*, v.20, p.1-7, 2007.

McKENZIE-JAKES A., Facts About Goats. II Bulletin. V. 1 Florida A&M University, 2007. [http://www.famu.edu/goats/UserFiles/File/Facts\\_About\\_Goats.pdf](http://www.famu.edu/goats/UserFiles/File/Facts_About_Goats.pdf) dia 18/2/2010 as 18 hs.

MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A. et al. Prospecção e caracterização de polimorfismos SNPs no gene que codifica para o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR) em bovinos. *Anais... 53o Congresso Brasileiro de Genética- Águas de Lindóia – SP. 2007- CD-Rom*.

NASSU, R.T. et al. Comparação entre características químicas de carne de caprinos do Nordeste brasileiro, abatidos em diferentes idades. *Revista Agropecuária Brasileira*, v. 64, p. 1-4, 2002.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v.44, n.3, p.205-214, jun. 2000.

NIE Q., IP SCY;ZHAG X, LEUNG FC AND YANG G. New variations in intro 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. *Journal of heredity* 93: 277-279, 2002.

NINOV, K. *Identificação de polimorfismo no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça/2006*. 90p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

OLSSON M.L. et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* ;98(5):1585-93, 2001.

OWENS, F. N.; DUBESKI, P.; HANSON, C. F. Factor that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 71, p. 3138-3150, 1993.

PAZ, C.C.P. et al. Ajuste de modelos não-lineares em estudos de associação entre polimorfismos genéticos e crescimento em bovino de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1416-1425, 2004.

PEIXOTO, J. DE O. et al. Influência de genótipo do gene da leptina sobre características produtivas em suínos. *Anais... 41 Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Campo Grande – MS. 5p, 2004.

PEYON, P. et al. Invitro effect of leptin on somatolactin release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): dependence on the reproductive status and interaction with NPY and GnRH. *Genetical Comparative Endocrinology*, v.132, p. 284 – 292, 2003.

RANGEL, M. T. et al. *Biologia molecular e ciência animal: uma combinação prometedora*, 2004 Acesso: < <http://home.utad.pt/~cecav/jornadas/com/5Rangel.pdf>>. Acesso: 16/062008.

RIBEIRO, S. D. A. *Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos*. São Paulo. 1997. 318p.

ROCHA, J.L. et al. 1992. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *Journal Animal.Science*, 70:3360-3370, 1992.

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

SANSINANE, A.S. et al. Serum leptin levels in cattle with diferent nutricional conditions. *Nutrition Research* 21: 1045-1052, 2001.

SANTOS, C. M. R. et al. Projeto Genoma da Bananeira – uma iniciativa mundial para o beneficio dos pequenos produtores. EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Acesso: 16/04/2010 ;

10:30[http://genoma.embrapa.br/musa/divulgacao/Artigo\\_esperanto.pdf](http://genoma.embrapa.br/musa/divulgacao/Artigo_esperanto.pdf).

SANTOS, S.N. *Genes de lignificação em Eucalyptus: estrutura e diversidade genética dos genes 4cl e ccoaomt*. 229fls. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. 2005.

SCHIERHOLT, A.S. *O gene da miostatina: Sequenciamento em suínos e análise filogenética*. 75fl. Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Viçosa – Minas Gerais, 2005.

SCHWERIN, M. et al. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement- An overview. *Animal Research Dev.*, v.42, p.14-26, 1995.

SILLENCE, M.N. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. *The veterinary Australia*, v. 167, p. 242-257, 2004.

SILVA LF, VANDEHAAR MJ, WEBER NIELSEN MS & SMITHGW. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 85 p.3277–3286, 2002.

SILVA, KLEIBE DE M., 2005. *Sequenciamento do gene da A-FABP (Proteína de ligação de ácidos graxos-adipocitos) e mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 de suíno em um delineamento F2*. Dissertação de Mestrado. Viçosa: UFV, 2005.

SILVA, R.C.G. *Estudo da caracterização e associação de marcadores moleculares relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore*. Dissertação (Mestrado). 73 fls. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA- USP- Pirassununga –São Paulo, 2008.

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

SOUSA, W. H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, v..1, n.1, p.51-58, set. 2007.

SOUZA, C. A.; *Investigação de polimorfismo nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em Gallus gallus*. Dissertação (Mestrado). Piracicaba –SP, p.108, 2004.

SPAGNOLIA A., SPADON GL, BOSCHERINE B. Preliminary valiation of a prediction model for the short-term growth response to growth hormone therapy in children whith idio pathic short stature. *Acta Paediatr Suppl*. Oct; 417: 66-8, 1996.

TAYLOR, J.F. et al. 1998. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Animal Genetcs*, 29:194-201, 1998.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

WHEELER, D. L., CHURCH, D. M., LASH, A. E., LEIPE, D. D., MADDEN, T. L., PONTIUS, J. U., SCHULER, G. D., SCHRIML, L. M., TATUSOVA, T. A., WAGNER L. & RAPP, B. A. 2002. Database resources of the National center for Biotechnology Information: 2002 update. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 13-6.

WHITE, D.W. et al. Identification of leptin-induced transcripts in the mouse hypothalamus. *Diabetes*, v. 49, p. 1443-1450, 2000.

WILLIAMS, C.M.; LEE, C.G.; GARLICH, J.D. and SHIH, J.C.H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. *Poultry Science*, January 1991, vol. 70, no. 1, p. 85-94.

WILLIAMS, G.L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v.23, p.339-49, 2002.

WYSZYNSKA-KOKO, J., et al. 2006. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine MYF6 and MYOG genes and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs. *Journal Applied Genetics*. 47:131–138, 2006.

ZANELLA M. A.. Mercado Mundial de Carne Ovina e Caprina. 2007. [http://www.cna.org.br/cna/publicacao/down\\_anexo.wsp?tmp.arquivo=E15\\_17991Mercado%20mundial%20de%20carne%20ovina%20e%20caprina.pdf](http://www.cna.org.br/cna/publicacao/down_anexo.wsp?tmp.arquivo=E15_17991Mercado%20mundial%20de%20carne%20ovina%20e%20caprina.pdf). Acesso dia 10/06/2009. as 9:00.

ZHANG, F. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v.372, p.425- 432, 1994.

ZWIERZCHOWSKI, L. et al. An association of growth hormone, a-casein, b-lactoglobulin, leptin and pit I loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. *Animal Science. Paper and Reports* 2001; 19:p.65–77.



## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***5.1. Animais***

Foram utilizados 62 caprinos, dos quais 30 da raça Boer e 32 da raça Anglo-Nubiana. Os animais analisados foram oriundos de rebanhos criados nas condições de clima e criação das respectivas regiões do nordeste brasileiro.

Dentre as amostragens dos animais da raça Anglo-Nubiana, 16 foram provenientes da estação experimental do setor de caprino da UNEB no município de Juazeiro, Bahia, e 16 animais de uma propriedade particular, situada no município de Bezerros, Pernambuco. Já para os animais da raça Boer, 15 foram de uma fazenda particular, localizada no município de Chã Grande, Pernambuco, e 15 animais de um rebanho privado, localizado no município de Juazeiro, Bahia.

As informações concedidas pelas propriedades foram os dados de peso ao nascer e peso à desmame dos animais.

### ***5.2. Colheita de material biológico para extração de DNA***

Para as análises laboratoriais foram colhidos cerca de 5mL de sangue periférico de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos *vacutainer* contendo 7,5 mg de EDTA. Após a colheita, os tubos foram mantidos à -20 °C até o momento da extração de DNA.

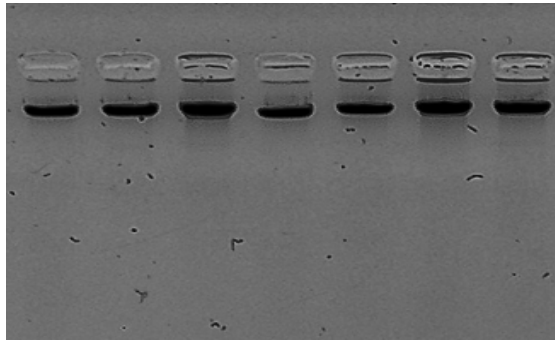
### ***5.3. Análises Laboratoriais***

As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA - do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

### ***5.4. Extração, quantificação e diluição de DNA***

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo utilizado no Laboratório Fisiologia Animal Molecular Aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco (FAMA-UFRPE), segundo o método de Maniatis et al. (1989).

Após as extrações dos DNAs, sua qualidade foi verificada, sob o aspecto qualitativo (visualização em gel de agarose). Para a avaliação qualitativa, procedeu-se à eletroforese de uma alíquota de 5µl de DNA de cada amostra, cujas condições eletroforéticas foram efetuadas á 100V por 40 min em gel de agarose a uma concentração de 0.8%, em tampão de TBE. Para a coloração das bandas foi utilizado 0,3µl do intercalante de DNA, Blue Green Loading Dye I e, posteriormente, foi visualizado em luz ultravioleta no transluminador. Em seguida, foi feita foto documentação com o sistema digital Kodak®. (figura1). O DNA extraído mostrou-se íntegro, sem quaisquer sinais de contaminação e em boa quantidade, como pode ser observado na Figura1.



**FIGURA 1.** Eletroforograma contendo amostras de DNA genômico extraído.

Para a análise quantitativa, foram realizadas duas leituras de uma alíquota (5 $\mu$ l) da amostra de DNA extraído em espectrofotômetro (BioMate Scientific), para a obtenção da quantidade de DNA genômico ( $\mu$ g/ml). Na sequência, obtiveram-se as médias das duas leituras necessárias para os cálculos de diluição em água ultra pura, com o intuito de que todas as amostras apresentassem concentração final de 100ng/ $\mu$ l para o volume final de 20 $\mu$ l.

### **5.5. Amplificação dos fragmentos por PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Os fragmentos foram amplificados por PCR, que é uma técnica descrita por Kary Mullis em 1985, que consiste na cópia de DNA “in vitro”, em três etapas:

1. Desnaturação: na qual ocorre separação da fita dupla de DNA;
2. Hibridação: na qual ocorre o pareamento dos *primers* à fita dupla de DNA (separados);
3. Extensão: etapa em que ocorre a síntese de novos fragmentos pela enzima DNA polimerase.

No presente estudo, para a reação de amplificação da região específica do DNA, foram utilizados água ultra-pura, tampão, dNTP, *primers* sintetizados para o gene da leptina na região do éxon 2 e para o gene do *ghr*. Foram realizados testes de otimização das condições de amplificação para se estabelecer as condições ótimas da reação da PCR.

Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e, para a coloração das bandas, foi utilizado 0,3µl do intercalante de DNA, Blue Green Loading Dye I; posteriormente, foi visualizado em luz ultravioleta no transluminador e, em seguida, sua foto documentada com o sistema digital Kodak®.

#### ***5.5.1. Otimização das condições de amplificação por PCR do gene do ghr***

No estudo do microssatélite do gene *ghr* (SSR-GHR) foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), descritos por Lucy et al., (1998).

*Primer Forward* - 5' GTG CTC TAA TCT TTT CTG GTA CCA GG 3' *Primer*

*Reverse* - 5' CCT CCC CAA ATC AAT TAC ATT TTG TC 3'.

A mistura para a reação de amplificação (PCR) foi constituída por: 10 ng de DNA genômico; 10 pmol de cada *primer*; 1,25 mM de dNTP *mix*; 2,5µl de tampão PCR 10x concentrado (200mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM KCl); 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2µIU de *Taq* DNA polimerase para um volume final de 25 µL. O termociclador (Biocycler) foi programado para 35 ciclos térmicos constituídos por: (1) desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos; (2) desnaturação a 94 °C por

1 minuto; (3) anelamento dos *primers* a 60 °C por 45 segundos; (4) extensão a 72 °C por 1 minuto e (5) extensão final a 72 °C por 4 minutos.

A eletroforese foi realizada em um sistema horizontal utilizando-se gel de agarose 2% (m/v), corado com Blue Green Loading Dye I (BGLD I) (0,5-1,0 µL/10 µL), durante 1 hora a 100 V em tampão TBE (0,09M Tris-borato, 0,002M EDTA). Posteriormente, os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de UV.

Um padrão de peso molecular de 50 e 10 pb foi utilizado para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados. A foto documentação dos géis foi realizada utilizando-se um sistema digital Kodak®.

#### **5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os *amplicons* foram separados em gel de poliacrilamida a 5%. Foram utilizados 5 µL de cada produto de PCR e 5µL do tampão de carregamento da amostra (NaOH, azul de bromophenol, xileno cianol em uma proporção de 1:1). Um marcador de peso molecular de 10pb (Invitrogen) foi utilizado nas eletroforeses a fim de se estimar o tamanho dos amplicons. A eletroforese foi conduzida em uma cuba vertical, a 1500 V, 60MA e 55W, com uma duração média de 1 hora e 30 min, a uma concentração de 0.5% em tampão de TBE.

Após a eletroforese, a revelação dos géis de poliacrilamida foi feita com nitrato de prata, conforme protocolo abaixo:

1. A placa que contem o gel foi submersa na solução fixadora por 20 minutos, ou seja, uma solução com , 200ml de acido acético e 2000ml de água deionizada, formando 10% na solução final.

2. Agitação em água deionizada por cerca de 5 minutos ou até a gordura seja eliminada do gel;
3. Transferência para a solução de coloração de nitrato de prata, por 30 minutos, composta de 2g de  $\text{AgNO}_3$ , formaldeído a 37% e 2000ml de água deionizada; em seguida é banhada a placa para que o excesso da prata seja retirada;
4. Agitação por 10 minutos ou até que as bandas apareçam em solução reveladora contendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , formaldeído a 37%, Tiosulfato sódico e 2000 ml de água deionizada.

Posteriormente, os géis foram digitalizados por scanner.

### ***5.7. Otimização das condições de amplificação por PCR do gene da leptina na região do éxon2.***

Para o estudo de um segmento da região do éxon 2 da leptina foi utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descritos em suínos por Neuenschwander et al. (1996):

*primer Forward* – 5'- TGC AGT CTG TCT CCT CCA AA - 3'

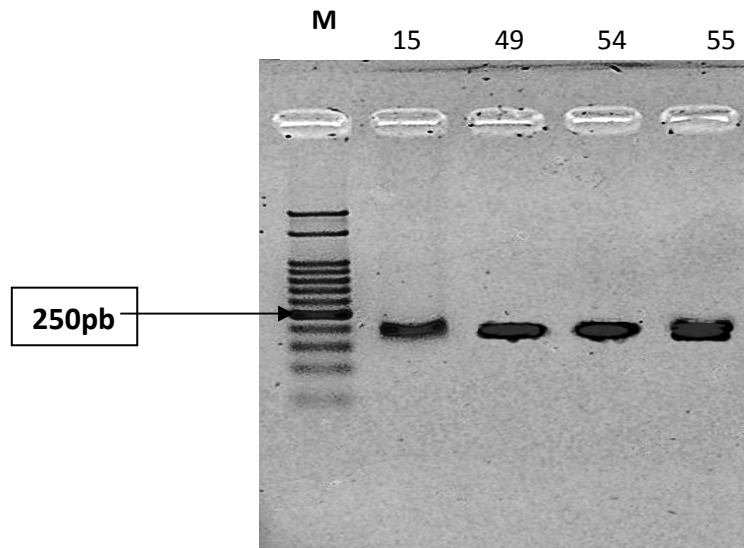
*primer Reverse*: 5'- CGA TAA TTG GAT CAC ATT TCT G -3'.

O primeiro teste foi realizado conforme o protocolo de Singh et al., (2009), com modificações. Foi utilizado o PCR *Optimizer Kit* (Invitrogen), constituído por tampão com 200mM de Tris-HCL e 50mM de sulfato de amônio. Para a reação foram utilizados 2 $\mu$ l de DNA genômico (20ng/ $\mu$ l) adicionados a 23 $\mu$ l do mix de reação compostos pelos seguintes reagentes: 2,5 de um tampão de buffer, 2,5 $\mu$ l de dNTP (2mM), 1,5 $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$ , 1 $\mu$ l(2mM) de cada primer

(10pmoles/ $\mu$ l), 0,1 $\mu$ l (1U) de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), para um volume final de 25 $\mu$ l.

O termociclador (Biocycler) foi programado para 30 ciclos térmicos constituídos por: (1) desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos; (2) desnaturação a 95 °C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* a 55 °C por 1 minuto; (4) extensão a 72 °C por 1 minuto e (5) extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Realizou-se uma corrida em gel de agarose 2% com os produtos da PCR, para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados. O marcador de peso molecular utilizado foi de acordo com o tamanho do fragmento esperado, foi utilizado um marcador de 50pb *ladder* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em um sistema horizontal utilizando-se gel de agarose 2% (m/v), corado com Blue Green Loading Dye I (BGLD I) (0,5-1,0  $\mu$ L/10  $\mu$ L), durante 1 hora a 100 V em tampão TBE (0,09M Tris-borato, 0,002M EDTA). Em seguida, os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador de UV. A foto documentação dos géis foi realizada utilizando-se um sistema digital Kodak®, (Figura 2).



**FIGURA 2.** Eletroforograma contendo produtos amplificados do gene da *Leptina* do *éxon 2* em 4 animais das duas raças, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 2,0%. M: Marcador de DNA de 50pb.

**5.8. Técnica PCR-RFLP *Hinf*-I (Reação de polimerização em cadeia polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)**

Após a confirmação da amplificação, o produto da PCR foi submetido ao corte com a enzima *Hinf* I (Fermentas), segundo Singh *et al.* (2009), de acordo com o seguinte protocolo (cada reação): 1,5µl Tampão, 1µl enzima *Hinf* I, 5µl PCR e 2,5µl água ultra pura, tendo como produto final 10µl.

A digestão procedeu a 37 °C por 4 horas em termociclador. Esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição, 5'-G↓ANTC-3' e 3'-CTNA↑G-5'. Em seguida procedeu-se à eletroforese em gel de agarose 2% e poliacrilamida 5%. A partir dessa etapa foram verificados fragmentos gerados do gene da leptina caprina, identificando assim o genótipo presente na amostragem estudada.



### 5.9. Análises Estatísticas

As frequências alélicas e heterozigose foram obtidas segundo Nei (1987) com auxílio do programa toolkit (PARK, 2001). O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito com auxílio do GENEPOP versão 4.0.10, conforme Rousset (2008).

Para verificar a influência dos genótipos dos fragmentos polimórficos do *ghr* e da *leptina* sobre o desenvolvimento dos animais foram utilizadas as características peso ao nascer (PN) e peso ao desmame (PD). Foram feitas as análise de variância e teste de médias com o auxílio do procedimento GLM do programa SAS (1999), de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + L_j + L_k + e_{ijkl}$$

em que:

$y_{ijkl}$  = variável dependente, peso ao nascer (PN) e ao desmame (PD);

$\mu$  = Média geral;

$S_i$  = o efeito fixo do sexo  $i$ ,  $i = 1$  (macho) ou  $2$  (fêmea);

$L_j$  = o efeito fixo de raça  $j$ ,  $j =$  (Anglo-Nuniana) ou (Boer);

$L_k$  = efeito fixo de local  $k$ ,  $k =$  Fazenda;

$e_{ijl}$  = erro aleatório com média zero e variância  $\sigma^2$ ;

As médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a amplificação de ambos os marcadores estudados nas duas raças avaliadas. O tamanho de alelos no loco do *ghr* variou de 90 a 125 pb, enquanto a *leptina* apresentou-se com um padrão único de 150 e 152pb.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito com auxílio do GENOPOP, versão 4.0.10, conforme Rousset (2008), em que todos os marcadores se mostraram em desequilíbrio para as populações.

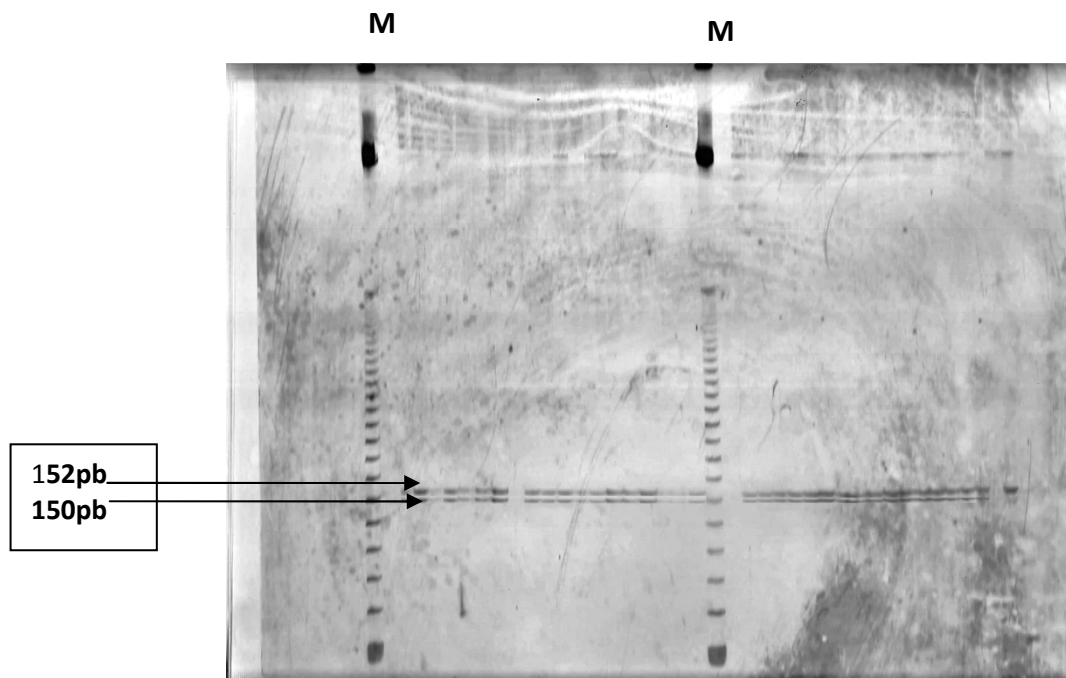
Na Tabela I, encontra-se a frequência alélica da leptina no éxon 2 nas raças Anglo-Nubiana e Boer estudadas.

**Tabela 1.** Frequências alélicas, heterozigoses observada (Ho) e esperada (He) para a leptina nas duas raças estudadas

Alelos	Anglo-Nubiana	Boer
150	50,00	50,00
152	50,00	50,00
Ho	1,0	1,0
He	0,508	0,508

Os valores de heterozigosidade observada foram bem maiores do que esperado, devido ao excesso de heterozigotos nessas populações. Todos os animais apresentaram o mesmo padrão eletroforético, com fragmentos de amplitude de 150 e 152 pb, gerando um genótipo heterozigoto (150/152) em todos os animais (Figura 3). Portanto, na amostra estudada, ocorre a presença desse único genótipo no qual não possui polimorfismo.

Na Figura 3, as amostras de PCR amplificadas foram submetidas à digestão com a enzima *Hinf*-I mostrando um fragmento de 150 e 152 pb, comprovando a eficácia da digestão pela *Hinf*-I no exon 2 do gene da leptina em ambas as raças.



**FIGURA 3. A.** Eletroforograma contendo os produtos de digestão pela enzima de restrição *Hinf I* para o gene *Leptina* na região do *éxon 2*, com visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida 5,0%. M: Marcador de DNA 10pb.

Singh *et al.* (2009), ao analisar o polimorfismo no *éxon 2* do gene da leptina em caprinos indianos da raça Jamunapari e Barbari, obteve na amplificação um produto de 152 pb em ambas as raças.

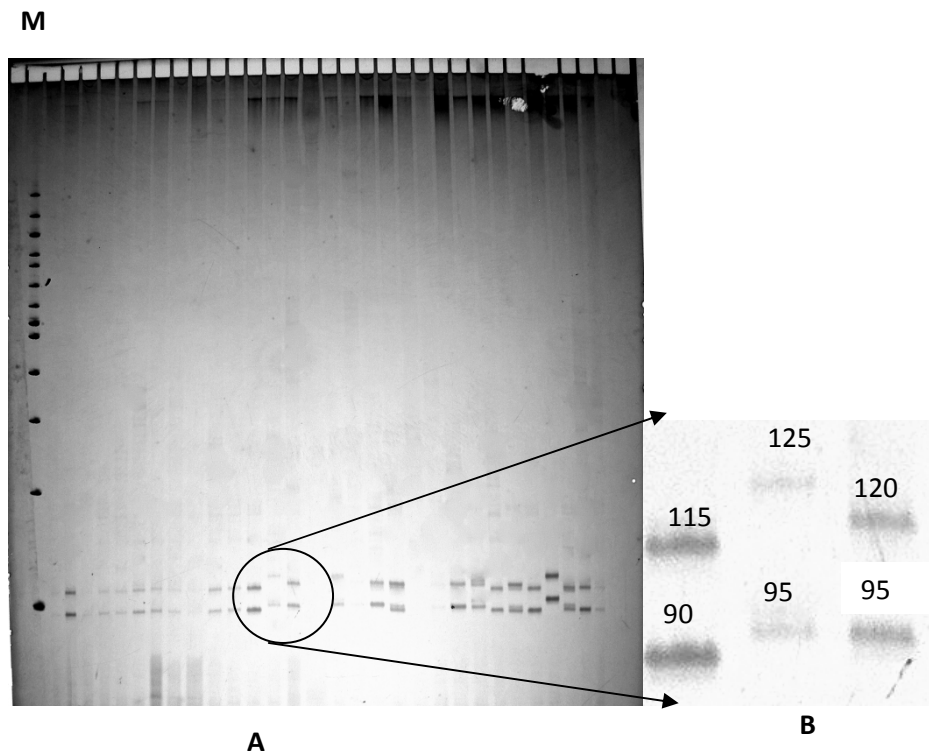
A caracterização do gene da leptina na região do éxon 2 tem sido analisada em diferentes espécies, como suína, bovina, búfalo, humano (LIEFERES et al., 2002; ZWIERCHOWSKI et al., 2001). Dois alelos ('T' e 'C') foram observados no gene da leptina com a enzima de restrição Hinf I, análise de restrição na espécie suína (STRATIL et al., 1998). Em estudos realizados em bovinos de corte, o padrão de polimorfismo foi associado com a deposição de gordura corporal e maior nível de RNAm da leptina no tecido adiposo (BUCHANAN et al., 2002).

Pomp et al. (1997), em estudos com bovinos encontraram padrão de polimorfismo semelhante ao observado no presente trabalho e relações significativas com peso corporal, deposição de gordura na carcaça e qualidade dos cortes cárneos.

Salman (2003), ao estudar uma população cruzada (Angus x Nelore) encontrou polimorfismo no éxon 2 do gene da Leptina, utilizando a técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples), associando à área-de-olho-de-lombo. Em estudo de polimorfismos do gene da Leptina em novilhas da raça Nelore, utilizando a técnica de PCR-RFLP, Ferreira et al. (2008) detectou três padrões de bandas diferentes (o primeiro, contendo o fragmento não digerido de 280pb, correspondente ao homozigoto T/T; o segundo, apresentando um fragmento não digerido e um fragmento de aproximadamente 250pb, correspondente ao heterozigoto T/C, e um terceiro fragmento de 250pb correspondente ao homozigoto C/C).

Esses autores sugerem a necessidade da continuidade do estudo, a fim de determinar possíveis associações do polimorfismo com características de posição de gordura em *Bos indicus*.

Na figura 4 está apresentada os produtos de PCR que foram amplificados do *ghr* em gel de poliacrilamida a 5%.



**FIGURA 4. A.** Eletroforograma contendo os produtos da PCR para o gene GHR, com visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida 5%. M: Marcador de DNA 100pb (A). Detalhe dos padrões de migração dos três genótipos encontrados na população(B).

Os alelos do loco SSR-GHR apresentaram alelos de 90, 95, 115, 120 e 125 pb nos rebanhos analisados, mostraram-se bastante polimórficos, sendo o alelo de 125 pb exclusivo do rebanho Anglo-Nubiana, enquanto no grupo Boer os alelos 95 e 120 ocorreram em frequência muito baixa, como pode ser visto na tabela 2.

**Tabela 2.** Frequência alélica, heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para o GHR nas duas raças estudadas

Alelos	Anglo-Nubiana	Boer
90	14,06	48,33
95	35,94	1,67
115	15,63	48,33
120	29,69	1,67
125	4,69	
Ho	1,0	1,0
He	0,748	0,541

O locus SSR-GHR foi um marcador de microsatélite desenvolvido para a espécie bovina. Neste estudo foram identificados cinco alelos com fragmentos de 94, 104, 106, 108 e 112 pb, descritos por Lucy et al., (1998). Leal et al., (2009), utilizando este mesmo oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) na espécie ovina com as raças Morada Nova e Santa Inês encontraram polimorfismo entre animais de raças diferentes, independente do número de crias por parto. Contudo, quando se comparou animais de mesma raça com número de crias diferentes esse mostrou monomórfico.

Os genótipos identificados como 90/115, 95/120 e 95/125 apresentaram frequência iguais 62,9%, 32,26% e 4,84%, respectivamente para as raças estudadas. Para o Boer não foi observado a presença do genótipo 95/125.

Os animais da raça Anglo-Nubiana com genótipo 95/120, 90/115 não apresentaram diferenças nas médias de pesos ao nascer. No entanto, observaram-se diferenças significativas nos pesos ao desmame entre esses genótipos, sendo

que os animais de genótipos 95120 apresentaram peso superior aos demais (tabela 3).

Na Raça Boer predominou o genótipo 90/115 (96,67%) e esses também foram significativamente superiores àqueles de genótipo 95/120.

**Tabela 3.** Número de observações (N), média de peso ao nascer (PN) e média de peso à desmame (PD), de acordo com genótipos para o gene *ghr* nas populações Anglo-Nubiana e Boer.

Genótipos	Anglo- Nubiana			Boer		
	N	PN	PD	N	PN*	PD
90/115	10	3,18a	14,85b	29	3,90	23,96
95/120	19	3,40a	16,76a	1	3,50	19,0
95/125	3	2,67b	13,50b	-	-	-

\*Não foi feito teste de média para essa variável nessa raça por conter apenas um animal no genótipo 95120.

Letras diferentes em colunas diferem estatisticamente pelo teste t ( $P < 0,05$ )

O genótipo 95/125, exclusivo da raça Anglo-Nubiana, apresentou a menor média para PN e PD com uma frequência de 9,375% na população avaliada. A menor proporção desse genótipo sugere a possibilidade de que esteja associado ao menor peso nas características avaliadas, sendo, pois, motivo de seleção contra este genótipo.

Em geral, observou-se predominância do genótipo 90/115 na raça Boer e 95/120 na raça Anglo-Nubiana, genótipos esses com maior desempenho em ambas as raças, o que sugere que a seleção está sendo direcionada possivelmente

para esses genótipos pela maior capacidade produtiva que apresentam, já que o criador seleciona os animais pelo peso.

De uma maneira geral, a literatura é escassa em estudos com marcadores genéticos para características de produção em caprinos. Entretanto, em sistemas de produção de carne, a eficiência da seleção deve ser constantemente avaliada por estar diretamente relacionada à rentabilidade econômica da produção.

Os estudos com o *ghr* tem sido alvo em trabalhos de associação de alelos com as características quantitativas, razão por este fazer parte do eixo somatotrópico, e estão envolvidos numa grande variedade de parâmetros fisiológicos de interesse econômico (IP et al., 2001).

Hale et al. (2000), estudando a presença do alelo S (11-TG) do receptor do hormônio de crescimento em novilhos castrados Angus, criados sob condições comerciais, observaram uma diminuição, na média, de aproximadamente 17 kg na desmame e 23 kg no abate. Os resultados obtidos por Curi (2004) foram similares, mostrando o efeito negativo do alelo S sobre o peso a desmame e o peso de carcaça, sem, entretanto, afetar a área do músculo *Longissimus dorsi* e a deposição de gordura da carcaça.



## **7. CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados obtidos e nas condições disponíveis para esse estudo, é possível concluir que houve polimorfismo para o gene da leptina nas amostras nas raças Anglo-Nubiana e Boer estudadas. Estudos adicionais são necessários para verificar a real superioridade dos genótipos 95/120 para a raça Anglo-Nubiana e 90/115 para a raça Boer, observada no presente estudo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics, selection, evolution*, Paris, v. 34, n. 1, p. 105-116, 2002.

CURI, R.A. *Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – *campus* de Botucatu, 2004.

FERREIRA et al. Efeitos do Polimorfismo do Exon 2 do Gene da Leptina em Bovinos Nelore. 2008. [http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_34865326855.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_34865326855.pdf) Acesso no dia 01/07/2010 as 15h.

HALE, C. S.; HERRING, W. O.; SHIBUYA, H.; LUCY, M. C.; LUBAHN, D. B.; KEISLER, D. H.; JOHNSON, G. S. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 78, p. 2099–2104, 2000.

IP, S.C.Y, ZHANG X. AND LENG. F.C. (2001) Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. *Experimental Biology and Medicine* 226(5): p.458-462.

LIEFERS SC, TEPAS MF, VEERKAMP RF, VANDER LENDE T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance,

feed intake, and fertility in Holstein Heifers. *Journal Dairy Science*. 2002; 85:p.1633–1638.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F; SAMBROOK, J. (Ed.) *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3, n.1, P.1-3

MULLIS, R. L. & MULLIS, A. K. (1985). Comparison of mothers' and fathers' speech with that of their school-age children. *Perceptual and Motor Skills*, 60, 567-574.

NEUENSCHWANDER S, RETTENBERGER G, MEIJERINK E, JORG H, STRANZINGER G. Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to Chromosome 18 by somatic cell hybrids. *Animal Genetics*. 1996; 27:275–278.

NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.

LEAL, S. A. C. Caracterização genotípica de ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova para o marcador microssatélite SSR-GHR. Relatório PIBIC-CNPq-UFRPE. Fev. 2009.

LUCY, M.C., JOHNSON, G.S., SHIBUYA, H., BOYD C.K., HERRING W.O. Polymorphic (GT)<sub>n</sub> microsatellite in the bovine somatotropin receptor gene promoter. *Journal Animal Science*, v.76, p.2209-10, 1998.

PARK, S.D.E. 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetics effects of selection*. Ph.D Thesis. Trinity College, University of Dublin, Ireland.

POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C.; BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine 44 chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. *Journal Animal Science*, 45 v. 75, p. 427, 1997.

ROUSSET, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecol. Resources* 8: 103-106.

SALMAN, A.K.D. *Polimorfismo e expressão gênica da Leptina em bovinos superprecoces*. Botucatu, 49p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.

SAS® 1999. Institute Inc., SAS® User's Guide : Statistics. Version 8. Cary, NC, USA.

SINGH,S. K. P. K. ROUT, R. AGARWAL, A. MANDAL, S. K. SINGH, S. N. SHUKLA, AND R. ROY Characterization of Exon 2 and Intron 2 of Leptin Gene in Indian Goats. *Animal Biotechnology*, 20: 80–85, 2009.

STRATIL A, KOPECNY M, MOSER G, SCHROFFEL JR J, CEPIOCA S. Hpa II and Rsa I PCR-RFLPs within an intron of porcine leptin receptor gene (LEPR) and its linkage mapping. *Animal Genetics*. 1998; 29:405.

ZWIERZCHOWSKI L, OPRZADEK J, DYMNIICKI E, OZIERZBICKI P. An association of growthhormone, a-casein, b-lactoglobulin, leptin and pit I loci

polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. *Animal Science Paper and Reports* 2001; 19: p.65–77.