

AM AURI ARIAS WENCESLAU

**POLIMORFISMOS DOS GENES DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (PGH)
E DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA - I (IGF- I) EM
SUÍNOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

AM AURI ARIAS WENCESLAU

**POLIMORFISMOS DOS GENES DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (PGH)
E DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA - I (IGF- I) EM
SUÍNOS**

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

APROVADA: 28 agosto de 2001.

Dr^a. Simone Eliza Facioni Guimarães
(Conselheira)

Prof. Ricardo Frederico Euclides
(Conselheiro)

Dr^a. Marta Fonseca Martins

Prof. Luiz Lehmann Coutinho

Prof. Paulo Sávio Lopes
(Orientador)

Aos meus pais, Maurício e Amália.

À minha irmã, Maria Elisa.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Paulo Sávio Lopes, pela orientação e amizade.

À Professora Simone Eliza Facioni Guimarães, pela co-orientação, amizade e pelos ensinamentos.

Aos Professores Ricardo Frederico Euclides, Luiz Lehmann Coutinho e Robledo de Almeida Torres, pelas críticas e sugestões.

Às Dras. Marta Fonseca Martins e Maria Amélia Menck Soares, pelas valiosas sugestões.

À Professora Carmen Pereira da Silva pelos ensinamentos.

Ao Dr. Max Rothschild (*US Pig Genome Coordinator*), pela contribuição dos *primers*.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP, aos amigos Lilian e Marcelo, pela ajuda e momentos de descontração.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento de Suínos da UFV.

Aos estagiários Fred, Carlos, Kleibe, Alex, Dany e Jane, pelo apoio e pela fundamental participação no desenvolvimento de todos os trabalhos.

Aos casais de amigos Aldrin e Ivy, Ricardinho e Lu, Paulo Bonomo e Renata, Cláudio e Simone e Carlão e Margarida, pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos William, Adriana, Kátia, Paulinho, Policarpo, Samuel, Fausto, Jaime, Zé Geraldo, Gisele e a todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e apoio.

Em memória de Caio, Pepeu, Juvenal e de todas as matrizes que participaram do experimento e dos churrascos!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

AMAURI ARIAS WENCESLAU, filho de Maurício Wenceslau e Amália Aria Wenceslau, nasceu em São Paulo, SP, em 02 de março de 1969.

Iniciou o Curso de Zootecnia em 1988, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, onde graduou-se em 1991.

Em 1992, trabalhou com assistência técnica em fazenda de gado de leite.

No período de março de 1993 a fevereiro de 1995, foi bolsista do CNPq (modalidade: Aperfeiçoamento), no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite - Embrapa, na área de Melhoramento Animal.

Iniciou, em março de 1995, o Curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, realizando estudos na área de Melhoramento Genético Animal.

Em 25 de julho de 1997, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em agosto de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, realizando estudos na área de Melhoramento Genético Animal.

Submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Genética e Melhoramento, em 28 de agosto de 2001.

CONTEÚDO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS GERAIS.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO 1	
Identificação de polimorfismos do gene PGH em suínos de raças divergentes.....	12
Resumo.....	12
Summary.....	13
Introdução.....	14
Materiais e Métodos.....	16
Resultados e Discussão.....	22
Conclusões.....	35

Referências Bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 2	
Seqüenciamento do gene fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) em suínos de raças divergentes	40
Resumo.....	40
Summary.....	41
Introdução.....	42
Materiais e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	49
Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas.....	62
RESUMO E CONCLUSÕES.....	66
APÊNDICE.....	67

RESUMO

WENCESLAU, Amauri Arias, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. Polimorfismos dos genes do hormônio de crescimento (PGH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) em suínos. Orientador: Paulo Sávio Lopes. Conselheiros: Simone Eliza Facioni Guimarães e Ricardo Frederico Euclides.

Objetivou-se com este trabalho investigar possíveis alterações nas seqüências de nucleotídeos nos genes do hormônio de crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) em suínos de raças divergentes. O GH é expresso pelos somatótrofos da hipófise anterior e o fígado é a maior fonte do IGF-I. Entre os hormônios diretamente envolvidos no crescimento e na composição corporal dos animais, o GH é o maior fator endócrino regulador do desenvolvimento muscular, e entre os fatores que mediam os efeitos do GH, está o IGF-I, cujas funções integram nutrição e o crescimento muscular dos animais. Devido à importância que desempenham na fisiologia dos animais, os genes que sintetizam esses dois hormônios são considerados candidatos para características de crescimento e composição de carcaça nos suínos. A estratégia usada neste estudo foi o sequenciamento automático das principais regiões desses genes em raças de suínos, com diferenças quanto à taxa

de crescimento e acúmulo de gordura. Foram analisados os seqüenciamentos de três varrões da raça nativa Piau (suíno tipo banha) e de dezoito matrizes comerciais, oriundas de cruzamentos entre as raças Landrace, Large White e Pietrain (suíno tipo carne). Este trabalho foi dividido em dois capítulos, que tratam dos polimorfismos observados nos genes PGH e IGF-I, respectivamente. Foi comparada a seqüência dos dois genes das raças divergentes e às depositadas no *GenBank*, sob os números M17704 e X64400. As seqüências do gene PGH, obtidas por seqüenciamento, apresentaram deleções, inserções e substituições quando comparadas com a do *GenBank*. Entre os animais, muitas dessas variações não alteraram o sítio para enzimas de restrição; entretanto, foram observadas algumas variações que mudaram o sítio, diferenciando as duas raças. Algumas variações na região do éxon mudaram os códons de síntese de aminoácidos. Verificou-se também um polimorfismo na região TATA-box do PGH. Os seqüenciamentos da região promotora e dos éxon I e II do gene IGF-I revelaram ser este muito conservado entre todos os animais da população, apresentando apenas duas variações na região 3' do gene, que podem ser detectáveis por meio de enzimas de restrição, diferenciando os varrões da raça nativa Piau das matrizes comerciais. Observa-se pela análise de fragmentos de DNA do microssatélite localizado na região 5' do gene IGF-I revelou que é polimórfico e que poderá, como os polimorfismos encontrados nos genes PGH e IGF-I, ser utilizado em investigações futuras, na geração filial F2, como possíveis marcadores para características de produção dos suínos.

ABSTRACT

WENCESLAU, Amauri Arias, D.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001.
Polymorphisms of growth hormone (PGH) and insuline-like growth factor-I (IGF-I) genes in pigs. Adviser: Paulo Sávio Lopes. Committee Members: Simone Eliza Facioni Guimarães and Ricardo Frederico Euclides.

The present work aimed to investigate possible alterations in the nucleotide sequences of Growth Hormone (GH) and Insuline-Like Growth Factor-I (IGF-I) genes in pigs from divergent breeds. GH is expressed by anterior pituitary somatotrophs and liver is the major IGF-I source. Among the hormones directly involved in animal growth and body composition, GH is the major muscle mass endocrine regulating factor and between the factors regulating GH effect there is IGF-I, whose functions integrate animal nutrition and muscle growth. Since they play an important role in animal physiology, the genes which synthesize both two hormones are considered candidate genes for growth traits and carcass composition in swines. The strategy used in this study was automatic sequencing of major regions of these genes in porcine breeds

displaying differences such as the growth rate and fat deposition. The sequencing of three boars of the Piau swine, a local breed in Brazil (high fat) and eighteen commercial line dams from Landrace, Large White and Pietrain (low fat) breeds were analyzed. This work was divided into two chapters which deal with the polymorphisms observed in PGH and IGF-I genes, respectively. Sequence of both genes from these divergent breeds were compared to those in GenBank, referred as numbers M17704 and X64400. The sequences of PGH gene, achieved by means of sequencing, presented deletions, insertions and substitutions when compared to GenBank sequence. Among sampled animals, many of these variations do not affect restriction enzymes sites; however, it was possible to observe some variations which changed restriction site differentiating the two breeds. Some variations in the exon regions changed amino acid sequence. A polymorphism in TATA-box region of the PGH was also observed. The sequencing of promoter site and exon I and II of IGF-I gene showed that this gene is highly conserved among all the animals of the studied population, displaying only two variations in the 3' site of this gene that can be detectable by means of restriction enzymes, differentiating the Piau breed boars from the commercial dams. The analysis of DNA fragments of the microsatellite located in the 5' of IGF-I gene showed that it is polymorphic and that it will be able, as the polymorphisms found in PGH and IGF-I genes, of being used in future studies, in F2 generation, as possible markers for desirable production traits in pigs.

INTRODUÇÃO

A avaliação adequada dos animais para seleção é fundamental e necessária na competitividade das empresas de melhoramento genético de suínos. Por isso, os programas de melhoramento já estão aliando aos métodos quantitativos as técnicas de biologia molecular empregadas na análise genética.

O genoma dos suínos, um dos mais estudados, foi eleito o modelo ideal no estudo comparativo dos genomas de humanos e ratos e, em razão disso, muitas descobertas foram realizadas sobre a localização e a função fisiológica de vários genes.

O aumento no número de marcadores de DNA, aliado ao desenvolvimento dos métodos de genotipagem, dos delineamentos experimentais, das metodologias estatísticas e da bioinformática, possibilitou a execução de programas com o objetivo de identificar e localizar genes e QTLs (*quantitative trait locus or loci*) ou *loci* de características quantitativas, responsáveis pela variação genética, e verificar as associações dos marcadores genéticos com as características de importância

econômica na suinocultura, tais como idade dos animais para atingir o peso ideal de abate, porcentagem de músculo na carcaça, fertilidade, habilidade materna, resistência a doenças e características de qualidade de carne e, assim, utilizá-los em programas de melhoramento animal.

O estudo sobre mapeamento genético de QTLs, para características de importância econômica em suínos, iniciou-se em 1988, com ANDERSSON e colaboradores. Esta equipe de pesquisadores utilizou a estratégia de cruzamentos de animais com alto grau de heterozigosidade, ou seja, linhagens que demonstraram segregação na maioria das características fenotípicas, facilitando a construção do mapa genético. Eles produziram uma linhagem pelo cruzamento do porco selvagem europeu e suínos da raça Large White e usaram o cruzamento entre duas populações divergentes, nas quais esperam-se que diferentes alelos de QTLs estivessem fixados, devido à pressão de seleção diferenciada nas duas populações.

Segundo ANDERSSON (1997), a estratégia do intercruzamento de linhagens divergentes de animais domésticos, adaptados a diferentes condições ambientais ou sistemas de produção, proporciona oportunidade única para mapeamento de *loci* de características fenotípicas. Essa estratégia também foi adotada por KONING et al. (1999) na detecção de QTL para espessura de toucinho e gordura intramuscular em suínos.

A identificação de *loci* controladores de características de produção permitirá o uso da seleção assistida por marcadores (MAS), que é mais efetivo em características expressas mais tarde na vida do animal ou naquelas controladas por poucos pares de genes. O primeiro exemplo corresponde à longevidade e às características de carcaça nos animais de corte; o segundo, à resistência a certas doenças ou a defeitos com interações simples. Segundo WEBB (1998), as doenças representam a maior fonte de perdas econômicas na indústria suinícola, talvez o maior risco nos atuais programas de seleção seja a redução da imunidade dos suínos, por isso, a resposta imunológica geral é a característica que sofrerá maior mudança genética no futuro. Devido ao alto custo, justifica-se o uso da MAS somente nos

animais dos núcleos, uma vez que há diluição dos custos pelo extensivo uso dos germoplasmas nas populações comerciais (MONTALDO e MEZA-HERRERA, 1998).

Segundo ROTHSCILD e PLASTOW (1999), a indústria suinícola já começa a utilizar as informações de análises genéticas moleculares na seleção assistida por marcadores (MAS) e que, combinada com novas tecnologias reprodutivas e outras, incluindo organismos geneticamente modificados, poderão acelerar os processos já descobertos e revolucionar a produção animal.

No trabalho aqui apresentado, foi usado o delineamento sugerido por ANDERSSON (1997), sendo construídas duas famílias de suínos originárias de raças divergentes e com aptidões diferentes. Esse modelo de construção de famílias é o mais indicado para buscar desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTLs ou para caracterizar efeitos de gene candidato, por fazer com que novas interações intra e inter *loci* sejam constituídas a cada nova geração, possibilitando que efeitos não observados ou subestimados nas gerações parentais possam ser reavaliados especialmente na geração F2, que é altamente segregante, devido a grande divergência genética entre as raças escolhidas para originar a geração parental.

As famílias de suínos foram produzidas acasalando-se varrões da raça Piau com matrizes comerciais oriundas de linhagens de cruzamentos entre as raças Landrace, Large White e Pietrain, selecionadas na Granja de Melhoramento de Suínos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde também foi fundado um núcleo de criação da raça nativa Piau.

Foram seqüenciados e analisados fragmentos dos genes do hormônio de crescimento (PGH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) na geração parental da população desenvolvida na UFV, ou seja, nos animais da raça nativa Piau e comerciais, na busca de polimorfismos genômicos que possam estar afetando a função dos genes ou alterando as sínteses dos produtos.

A busca de marcadores genômicos e o estudo de genes candidatos, caracterizando seqüências gênicas em raças de suínos pouco estudadas, podem

fornecer informações de grande utilidade e conhecimentos necessários para melhor entendimento dos processos fisiológicos nos animais de raças comerciais.

De acordo com ROTSHSCHILD e PLASTOW (1999), a análise de gene candidato é uma valiosa e útil metodologia, biologicamente correta, economicamente viável e suficientemente poderosa para descobrir diferenças genéticas entre os animais para características de importância econômica.

Os genes que codificam o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina -I (IGF-I) são considerados genes candidatos para o crescimento e desenvolvimento animal, em razão da importância que desempenham na fisiologia animal (HORVAT e MENDRANO 1995; YU et al. 1995; CASAS-CARRILLO et al. 1997). Esses dois genes já foram sequenciados em suínos, e as seqüências nucleotídicas depositadas no *GenBank*.

O estudo dos genes de características bioeconômicas é importante para a suinocultura, já que a identificação de alelos polimórficos que influenciam favoravelmente essas características poderá contribuir para os programas de melhoramento animal, por meio da seleção assistida por marcadores (MAS), em que é possível aumentar a freqüência do alelo na população.

O hormônio de crescimento (GH) ou somatotropina é um polipeptídio com aproximadamente 190 aminoácidos e é produzido pelos somatotófos da hipófise anterior sob o controle de hormônios neuroendócrinos bem como por fatores tecido-específicos, nutricionais e ambientais.

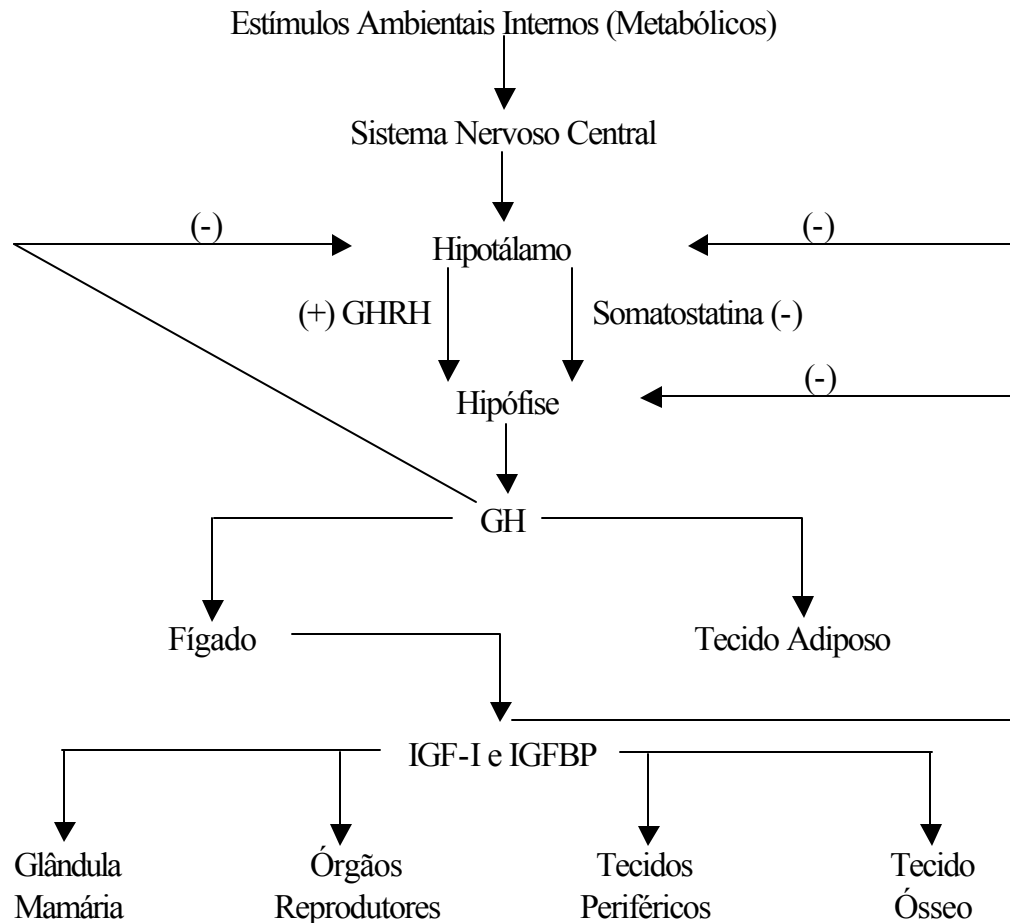
O controle neuroendócrino da liberação do GH é determinado por um contínuo equilíbrio de fatores hipotalâmicos regulatórios: o GHRH (*GH-releasing hormone*) ou hormônio liberador de GH (RIVIER et al., 1982 e SPIESS et al., 1983) e a somatostatina (SS), que inibe a secreção hipofisária do GH (BRAZEAU et al., 1973). BARINAGA et al. 1985 verificaram que o GHRH estimula a transcrição do gene GH, independentemente da liberação do hormônio e que outros fatores podem estimulá-la sem afetar a transcrição do gene.

Alguns estímulos fisiológicos influenciam a liberação e a regulação da ação do GH, tais como estresse e início do sono, as flutuações das concentrações de glucagon, insulina, somatomedinas e estrógeno no sangue (RAWLINGS e MASON, 1989), também a concentração e distribuição dos receptores de GH nos tecidos e os mecanismos de sinalização transmembrana (Norman e Litwack 1987, citados por BURTON et al., 1994).

Na Figura 1 é apresentado, de maneira resumida, o sistema de controle da produção e secreção do GH, suas moléculas ativadoras e os locais-alvo de ação.

O GH está envolvido na regulação do crescimento e metabolismo de diferentes tecidos, tanto anabolicamente como catabolicamente, sua ação nos tecidos-alvo pode ser direta ou indireta. Indiretamente, parte dos efeitos do GH é mediada via produção das somatomedinas, principalmente o IGF-I, ou fator de crescimento semelhante à insulina-I. O IGF-I é produzido no tecido hepático após a ativação do sistema de transdução de sinal dentro da célula. O GH tem efeito direto sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos (Vander et al., 1990) citados por RUTZ e XAVIER (1998).

Os efeitos do GH, mediados pelo IGF-I, sobre o crescimento dos tecidos musculares e esqueléticos são semelhantes ao da insulina, enquanto que o efeito direto do GH sobre o metabolismo de carboidratos e lipólise é antagônico ao da insulina, sendo sinérgico com o cortisol nas ações lipolítica e diabetogênica. O IGF-I é o agente mediador da maioria, se não de todos, os efeitos do hormônio de crescimento no desenvolvimento muscular (COUTINHO et al., 1999).



Fonte: Burton et al. (1994), citados por RODRIGUES (1998).

Figura 1 – Esquema da regulação neuroendócrina da secreção do GH e locais-alvo de ação. GHRH = hormônio liberador de GH; IGF-I = somatomedinas; IGFBP = proteínas ligantes das somatomedinas.

Na Tabela 1 estão apresentadas as principais ações do GH e IGF-I nos tecidos dos animais.

Tabela 1- Resumo das principais ações do GH

Ação	Tecido
Direta	
Produção de IGF-I	Fígado e cultura de fibroblastos
Síntese protéica	Fígado
Transporte de aminoácidos	Fígado, músculo e tecido adiposo
Lipólise	Tecido adiposo
Metabolismo de carboidratos	Fígado
Indireta (via IGFs)	
Condrogênese	Cartilagem
Crescimento esquelético	Osso
Síntese protéica	Tecido mole
Crescimento comum de células	
Diferenciação das células musculares	

HUGHES et al., 1985

OBJETIVOS GERAIS

Investigar diferenças nas seqüências de nucleotídeos dos genes candidatos PGH e IGF-I em raças de suínos com diferenças quanto à precocidade, taxa de crescimento e acúmulo de gordura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L.1997. The use of a Wild pig x Domestic pig intercross to map phenotypic trait loci. *Journal of Heredity*, 88:380-383.
- BARINAGA, M., BILEZIKJIAN, L.M., VALE, W.W., ROSENFELD, M.G., EVANS, R.M. 1985. Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and transcription. *Nature*, 314:279-281.
- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., et al. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179:77-79.
- BURTON et al. 1994. A review of bovine growth hormone. *Canadian Journal of Animal Science*, 74(2):167-201.
- CASAS-CARRILLO, E., PRILL-ADAMS, A., PRICE, S.G., CLUTTER, A.C., KIRKPATRICK, B.W. 1997. Relationship of growth hormone and insulin-like growth factor-1 genotypes with growth and carcass traits in swine. *Animal Genetics*, 28:88-93.

- COUTINHO, L.L., GABRIEL, J.E., ALVARES, L.E. 1999. Controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal. Anais. UFV, Viçosa, MG. p.355.
- HORVAT, S., MEDRANO, J.F. 1995. Interval mapping of high growth (hg), a major locus that increases weight gain in mice. *Genetics*, 139: 1737-48.
- HUGHES, J.P., ELSHOLTZ, H.P., FRIESEN, H.G. 1985. Growth hormone and prolactin receptors. In: Polypeptide Hormone Receptors (Posner, B.L., ed), Marcel Dekker, New York, 157-199.
- KONING, D.J., JANSSE, L.L.G., RATTINK, A. P. et al. 1999. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 152:1679-1690.
- MONTALDO, H.H., MEZA-HERRERA, C.A.1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Animal Biotechnology*, 1(2):675-702.
- NORMAN, A.W., LITWACK, G. 1987. Anterior pituitary hormones. In: Hormones. Academic Press. Toronto, ON, p.171.
- RAWLINGS, S.R., MASON, W.T. 1989. Modulation of growth hormone release: from CNS to the secretory event. *Biotechnology in growth regulation*. Butterworths, Toronto.
- RIVIER, J, SPIESS, J., et al. 1982. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*, 300:276-278.
- RODRIGUES, C. V. 1998. Detecção e análise de polimorfismos do gene do hormônio de crescimento bovino em animais de raças zebuínas e taurinas. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 106p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais.

- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G.S. 1999. Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*, 1:1-7.
- RUTZ, F.; XAVIER, E.G. 1998. Agentes repartidores de energia para aves e suínos. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. In: Anais. São Paulo, 201-218.
- SPIESS, J., RIVIER, J., VALE, W. 1983. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303:532-535.
- VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. 1990. Human Physiology. McGraw-Hill Publishing Company. New York, 5th ed.
- WEBB, A.J. 1998. Objectives and strategies in pig improvement: an applied perspective. *Journal Dairy Science*, 81(1):2.
- YU, T.P., TUGGLE, C.K., SCHMITZ C.B., ROTHSCCHILD, M.F. 1995. Association of PIT1 polymorphism with growth and carcass traits in pigs. *Journal of Animal Science* 73:1282.

CAPÍTULO 1

Identificação de polimorfismos do gene PGH em suínos de raças divergentes

Resumo – O conhecimento de polimorfismos em genes que regulam a produção hormonal e, conseqüentemente, o metabolismo e a performance animal é importante na caracterização genética de populações e, principalmente, na possibilidade de utilizá-los como marcadores genéticos em programas de melhoramento genético. O gene do hormônio de crescimento suíno (PGH) exerce efeito direto sobre o crescimento e a composição corporal animal por meio de mecanismos endócrino-fisiológicos. É considerado um gene candidato, sendo objeto de muitos estudos. Objetivando-se encontrar polimorfismos no gene PGH em suínos da raça nativa Piau e matrizes comerciais, foram seqüenciados e analisados fragmentos desse gene. Os resultados dos seqüenciamentos revelaram que esse gene é polimórfico na região TATA-box, íntrons e éxons. Algumas mudanças de bases nucleotídicas alteraram códons para aminoácidos do hormônio de crescimento de suínos. Ocorreram alterações em sítios da seqüência que podem ser detectados com enzimas de restrição na população estudada.

Palavras-chave: gene candidato, hormônio de crescimento, TATA-box, seqüenciamento, suínos.

Gene PGH polymorphism study in pigs from divergent breeds

Summary - The identification of polymorphisms in genes which regulate hormonal production and, consequently, metabolism and animal performance are important in genetic characterization of populations and it is possible to use them as genetic markers in genetic improvement programs. Porcine growth hormone (PGH) gene presents direct effect on growth and body composition by means of endocrine-physiological mechanisms. It is considered a candidate gene, being object of several studies. PGH gene fragments were sequenced and analyzed, aiming to find polymorphisms in Piau swine, a local breed in Brazil, and dams from commercial lines. The sequencing results showed that this gene is polymorphic in the TATA-box region, introns and exons. Some changes in nucleotide bases had modified codons regarding PGH amino acids. The observed alterations in sequence sites can be detected with restriction enzymes in the studied population.

Key Words: candidate gene, growth hormone, TATA-box, sequencing, swine.

Introdução

As técnicas de biologia molecular utilizadas na análise genética permitiram identificar o gene PGH que codifica o hormônio de crescimento nos suínos.

O gene PGH está localizado no cromossomo 12 (YERLE et al., 1993) e foi isolado e caracterizado por VIZE e WELLS (1987). Constitui-se de cinco éxons, intercalados por quatro íntrons, totalizando 2.231 pares de bases (pb) e existe como cópia única no conjunto haplóide do genoma de suíno.

O hormônio de crescimento (GH) ou somatotropina é um polipeptídio, com aproximadamente 190 aminoácidos e 22 kDa, produzido e secretado pelos somatotófos da hipófise anterior, sob o controle de hormônios neuroendócrinos, bem como por fatores tecido-específicos, nutricionais e ambientais (GLUCKMAN e BREIER, 1987).

No plasma, o GH circula ligado a proteínas específicas, chamadas de proteínas carreadoras de GH (GHBP) e, finalmente, o GH liga-se a receptores da superfície da membrana das células do fígado ativando o sistema de tradução de sinal e a síntese do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) (MAHARAJAN e MAHARAJAN, 1993).

Vários efeitos metabólicos são mediados direta ou indiretamente pelo hormônio de crescimento, tais como, produção de IGF-I, mediador da maioria das ações, síntese protéica, transporte de aminoácidos, lipólise e metabolismo de carboidratos (HUGHES et al., 1985).

A produção do hormônio de crescimento sintético ou PST possibilitou, de maneira mais efetiva, realizar experimentos com suínos e verificar as respostas fisiológicas com a administração do PST exógeno. A diversidade de respostas nos estudos com PST deve-se, principalmente, às diferenças de doses administradas, ao regime alimentar e a capacidade genética dos suínos para crescimento de tecido magro (Boyd et al., 1985), citados por SQUIRES et al., (1993).

Os resultados de estudos fisiológicos *in vivo*, com a administração de PST, mostraram que em suínos o hormônio é capaz de exercer variados efeitos sobre diferentes tecidos, estimulando o ganho de peso e o aumento da massa muscular e retardando o desenvolvimento do tecido adiposo (ETHERTON, 1987; KLINDT et al. 1995; HARRELL et al. 1997; RUTZ e XAVIER, 1998).

A elevação do hormônio de crescimento na corrente sanguínea resulta em uma cascata de eventos biológicos que contribuem para melhor o desempenho produtivo de suínos.

Polimorfismos na região TATA-box do gene PGH foram descritos por KIRKPATRICK et al., (1993) e NIELSEN et al., (1995) e sugerem diferenças na atividade transcricional entre os alelos TATA-box, que poderiam elevar a concentração do hormônio de crescimento no plasma e, conseqüentemente, aumentar a taxa de crescimento dos suínos.

A síntese, secreção e ação do GH envolvem muitos hormônios e diferentes efeitos, o que significa que mutações em outros genes podem também interferir na expressão do PGH.

Devido à importância do hormônio de crescimento no metabolismo animal, várias pesquisas têm sido direcionadas para detecção de polimorfismos na seqüência do gene que codifica esta proteína, visando associações entre estes e os efeitos sobre características quantitativas (BALATSKII e POCHERNIAEV, 1995; KNORR et al. 1997; LARSEN e NIELSEN, 1997; CHENG et al. 2000).

Objetivando-se estudar variantes alélicas do gene PGH, foram seqüenciados e analisados fragmentos desse gene em suínos da raça nativa Piau e matrizes comerciais, com diferenças quanto à precocidade, taxa de crescimento e ao acúmulo de gordura.

Material e Métodos

Material

Neste trabalho, foram analisadas oito amostras de DNA de animais da espécie suína (*Sus scrofa*), pertencentes a um sistema de acasalamento entre dezoito matrizes comerciais (tipo carne) e três varrões da raça nativa Piau (tipo banha).

A identificação e a composição racial dos animais são apresentadas na Tabela 1.

As matrizes pertenciam à Granja de Melhoramento Genético de Suínos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo os varrões adquiridos em diferentes localidades dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

As matrizes comerciais 1 são compostas das raças Landrace e Large White, enquanto as matrizes comerciais 2 são das raças Landrace, Large White e Pietrain.

Tabela 1- Composição racial e identificação das matrizes e varrões

Composição racial	Categoria	Identificação
Comercial 1	Matriz	22, 91 e 122
Comercial 2	Matriz	160 e 175
Nativa	Varrão	C, P e J

Análises do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos animais estudados e as amplificações dos fragmentos do gene foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os demais procedimentos, incluindo as reações e o seqüenciamento automático, foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de

Zootecnia da ESALQ - Universidade de São Paulo. As edições das seqüências foram realizadas no Laboratório de Análise e Seqüenciamento do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV.

Isolamento de DNA

Foram coletados 10 mL de sangue de cada animal por punção venosa do *sinus orbitalis* em tubos contendo 0,5 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 0,5 M, pH 8,0. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm, durante 20 minutos, para separar os leucócitos das hemáceas e plasma. Os glóbulos brancos foram removidos com o auxílio de pipeta, para tubos estéreis; a extração do DNA genômico foi realizada por purificação com fenol:clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por SAMBROOK et al. (1989). As amostras para uso em reações de PCR foram diluídas para a concentração de 25 ng/μL em solução contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1,0 mM de EDTA pH 8,0, sendo mantidas a 4°C.

Desenho dos primers para o gene PGH

Um fator importante que influencia a qualidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) é a escolha adequada dos *primers*. Por isso utilizou-se o sistema desenvolvido por FERREIRA et al. (2000), que auxilia nesta escolha. Foram desenhados e sintetizados quatro pares de *primers* que flanqueiam as regiões estudadas no gene (Tabela 2).

Toda a numeração citada e atribuída às bases do gene PGH foi baseada na seqüência publicada por VIZE e WELLS (1987), número de acesso no *GenBank* M17704.

Tabela 2 - Caracterização dos *primers* desenhados para o gene do hormônio de crescimento (PGH) em suínos

Seqüência do <i>primer</i>	Posição no gene	ΔG ¹ (kcal/mol)	TA ² °C	Tamanho da região amplificada (pb)	Região no gene
F1 - TTATCCATTA GCACATGCCTGCC	61 - 83	-8,1	62	604	1
R1 - CTGGGGAGCTTACAAACTCCTT	644 - 665	-6,6	62	604	
F2 - TTTTAAATGTC CCTGGGGGAGGG	390 - 412	-7,8	62	425	2
R2 - CTTGCTGCTTTTCTTGGGAATCCC	792 - 815	-7,8	62	425	
F3 - AGTATTGAGGCCAACCGAAGATG	745 - 767	-5,0	62	567	3
R3 - CCAGGTCCTTCAGCTTCTCGT	1292 - 1312	-6,5	62	567	
F4 - GCTGCTGCTCATCCAGTCGT	1200 - 1219	-6,5	68	666	4
R4 - TCCAGGGTCAGGGGAGGTAC	1847 - 1866	-3,6	68	666	

¹ΔG: Energia livre de formação de duplex

²TA: Temperatura de anelamento

A seqüência analisada compreendeu a região promotora, os éxons e os íntrons do gene PGH dos suínos, conforme esquema apresentado na Figura 1.

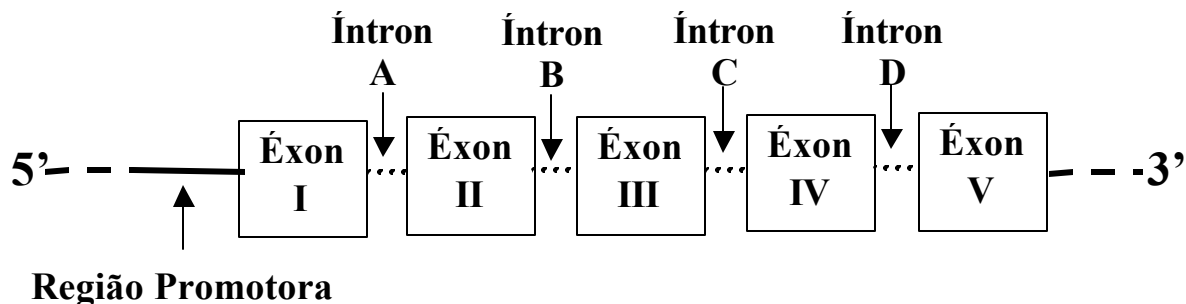


Figura 1– Diagrama do gene PGH (2.231pb). Os retângulos representam as regiões traduzidas (éxons I, II, III, IV e V), as linhas pontilhadas representam as regiões não transcritas (íntrons A, B, C e D). A região promotora é representada pela linha contínua.

Amplificação dos fragmentos por ensaios de PCR

A amplificação dos fragmentos sob estudo foi conduzida em termociclador *MJ Reseach, Inc. modelo PTC-100-Watertown, USA*, utilizando um volume final de 100 μ L, contendo 4,0 pmoles de cada *primer*, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato livre (dNTP); 2,0 mM de $MgCl_2$; 50 mM de Tris-KCl; 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase e 25 ng de DNA genômico.

O programa para a PCR consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C, por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturação das fitas a 94°C, por 1 minuto, anelamento dos *primers*, conforme a temperatura de anelamento específica de cada par (Tabela 2), por 1 minuto e extensão do fragmento a 72°C, por 1 minuto. Ao final, seguiu-se mais um passo de extensão por 5 minutos, a 72°C.

O sucesso das amplificações dos fragmentos do gene PGH foi observado em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 μ L de cada reação. Após a corrida em cuba de eletroforese, foi realizada a coloração com nitrato de prata.

Purificação e seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Para a purificação dos fragmentos do gene PGH, foram utilizados 100 µL da reação de amplificação e seguiu-se o protocolo recomendado no *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)*, obtendo-se um volume final de 12 µL de DNA purificado, na concentração de 100 ng/µL.

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al., (1977). O DNA foi seqüenciado utilizando-se o *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, (Applied Biosystems)*. Para isso, foram necessários de 200 a 500 ng de DNA purificado, 5,0 pmoles do *primer F*, além de 2,0 µL do *mix Big Dye* e 2,0 µL de tampão fornecidos pelo *kit* de seqüenciamento. O volume final da reação foi de 10 µL. A mesma reação foi realizada com o *primer R*.

As amplificações foram realizadas em termociclador programado de um passo inicial de desnaturação a 96°C, por 3 minutos, 50°C, por 5 segundos (anelamento) e 60°C, por 4 minutos (extensão), em um total de 25 ciclos. A temperatura de anelamento foi a mesma para todos os *primers*.

Após a amplificação, o DNA foi precipitado pela adição de 20 µL de água Milli-Q, 2,0 µL de glicogênio (1,0 g/L) e 4,0 µL de acetato de sódio 1,5 M / EDTA 0,5 M, em seguida foi centrifugado por alguns segundos e adicionado 100 µL de etanol absoluto, homogeneizado e incubado por 20 minutos no escuro. Logo após, foi centrifugado por 60 minutos, a 4.000 rpm, ao término foi removido o sobrenadante invertendo-se a placa por alguns segundos. O *pellet* de DNA foi lavado com 150 µL de etanol 70%, a 4°C e centrifugado por 30 minutos, a 4.000 rpm em temperatura ambiente, ao término, novamente, foi removido o sobrenadante e o *pellet* seco à temperatura ambiente no escuro. O DNA foi ressuspensionado em 15,0µL de *Template Suppression Reagent (Applied Biosystems)*, desnaturado a 95°C, por 5 minutos, e mantido no gelo até a aplicação no gel. Os produtos da

extensão foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, e a fluorescência emitida foi coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo *ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)*. Os dados foram automaticamente convertidos em seqüências de deoxinucleotídeos.

As seqüências geradas foram editadas e montadas em contíguos pelo programa *SEQ MAN II (DNASTAR Inc.)* e, posteriormente, comparadas entre si e com as seqüências já depositadas no *GenBank*, utilizando-se o programa *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1997). Para as análises de restrição destas seqüências, foi utilizado o programa *Webcutter (<http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/>)*.

Resultados e Discussão

Caracterização dos fragmentos amplificados por ensaios de PCR

As seqüências de nucleotídeos dos quatro pares de *primers* e suas respectivas características estão apresentadas na Tabela 2. Todos os fragmentos do gene PGH amplificaram com especificidade e com bom rendimento nas condições de PCR utilizadas neste estudo. Os tamanhos dos fragmentos amplificados corresponderam aos esperados quando foram comparados os pesos das bandas em gel de poliacrilamida a 5% (Figura 2).

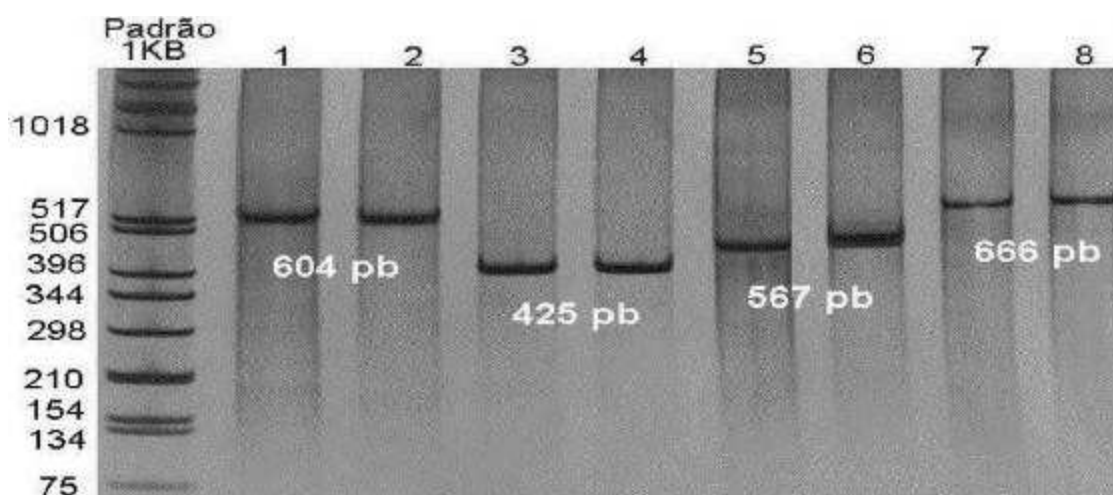


FIGURA 2 – Resolução em gel de poliacrilamida a 5% dos produtos de PCR referentes aos quatro fragmentos do gene PGH em suínos: marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder, Life Technologies*; canaletas 1 e 2: região 1; canaletas 3 e 4: região 2; canaletas 5 e 6: região 3; canaletas 7 e 8: região 4.

Caracterização do seqüenciamento do gene PGH dos suínos

O seqüenciamento automático dos fragmentos de DNA gerou uma série de seqüências, que foram editadas individualmente e montadas em contíguos.

As seqüências dos quatro fragmentos do gene PGH analisados, tanto dos varrões da raça Piau quanto das matrizes comerciais, foram alinhadas com a

seqüência publicada por VIZE e WELLS (1987), número de acesso no *GenBank* M17704, a qual foi tomada como referência para identificação de cada base no gene.

Na Figura 3 são apresentados os alinhamentos de todas as seqüências produzidas. A seqüência de referência PGH aparece completa no topo de cada conjunto. As três seqüências logo abaixo referem-se aos fragmentos do gene analisados nos três varrões e as demais aos das matrizes comerciais.

Nas seqüências de bases geradas por esse estudo foram observadas, tanto na região promotora quanto nos éxons e íntrons, divergências de bases em relação à seqüência padrão e também ocorreram mudanças de bases entre os animais de raças diferentes, concordando com os estudos sobre polimorfismos no gene PGH. Aproximadamente 20 variantes no gene PGH já foram descritas (SEEBURRG et al., 1983; VIZE e WELLS 1987; CASAS-CARRILO et al., 1997; LARSEN e NIELSEN 1997; CHENG et al., 2000).

A organização dos genes que codificam o hormônio de crescimento nas espécies humana, bovina e suína é altamente conservada em termos de seqüências de nucleotídeos, posição de íntron e comprimento (WOYCHIK et al., 1982).

VIZE e WELLS (1987) seqüenciaram todo o gene PGH nos suínos e verificaram algumas variações de bases quando as seqüências foram comparadas com as de cDNA clonadas por SEEBURG et al. (1983).

As seqüências de nucleotídeos produzidas pelo seqüenciamento automático dos produtos de PCR, referentes aos fragmentos do gene PGH, são polimórficas, com variações inclusive na região de éxon, mudando o códon de alguns aminoácidos já descritos por VIZE e WELLS (1987).

1 60
 PGH CCCGGGGGACATGACCCCAGAGGAGGAGCGGGAACAGGATGAGTGGGAGGAGGTTCTAAA
 P *****
 C *****
 J *****
 p22 *****
 p91 *****
 p122 *****
 p160 *****
 p175 *****

61 120
 PGH TTATCCATTAGCACATGCCTGCCAGTGGGCCATGCATAAATGTATAGAGAAAATAGGTGG
 P *****
 C *****
 J ***** **R**
 p22 **R**
 p91 ***** -
 p122 *****
 p160 *****
 p175 ***** - -

121 180
 PGH GGGCAGAGGGAGAGAGAAGAGGCCAGGG**TATAAAAA**GGGCCCCAAAAGGGACCAATTCAG
 P **T**
 C **T**
 J **T**
 p22 **T**
 p91 .. - - **T**
 p122 **T**
 p160 **T**
 p175 **T**

181 240
 PGH AATCCCAGGACCCAGCTCCCCAGACCACTCAGGGACCTGTGGACAGCTCACCGGCTGTGA
 P **T**
 C **T**
 J **T**
 p22 **T**
 p91 **T**
 p122 **T**
 p160 **T**
 p175 **T**

241 300
 PGH **TGGCTGCAG**GCAAGTGCCCTAAAATCCCAGTGG-CTTGGTGTGTTCTGAAGGGTGACGT
 P
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

301 360
 PGH GGGGGCCATGCAGATGGATGGGGCACCAACCTTGGGGCTTTGGGGTTTCCGAATGTGAGCA
 PR.....
 C
 JR.....Y.....
 p22R.....
 p91Y.....Y.....
 p122Y.....Y.....
 p160
 p175

361 420
 PGH TGGATATCTACTCCTAGATATGAGGCCAAGTTTAAATGTCCCTGGGGGAGGGGAGGAG
 PC.....A.....
 CC.....A.....
 JM.....A.....
 p22A.....
 p91
 p122M.....
 p160R.....
 p175C.....A.....

421 480
 PGH AAGGGACAGGGCTGGTGGAGCC_AGGCCTCTTGTCTCTGGGATCCCTCTCTCACGGGCC
 PA.....
 CA.....
 JA.....
 p22A.....
 p91
 p122
 p160
 p175A.....

481 540
 PGH TCCTGGTCTCTAGGCCCTCGGACCTCCGCGCTCCTGGCTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCC
 P
 C
 JR.....
 p22
 p91
 p122Y.....
 p160Y.....
 p175

541 600
 PGH TGGACTCGGGAGGTGGGCGCCTTCCCAGCCATGCCCTTGTCCAGCCTATTTGCCAACGCC
 PR.....T.....
 CA.....T.....
 J
 p22A.....
 p91A.....
 p122A.....
 p160AM.....Y.....
 p175R.....Y.....

601 660
 PGH GTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCTGCTGACACCTACAAGGAGTTTGTAAAGC
 P C
 C C
 J Y
 p22 C
 p91 T
 p122 Y
 p160 C
 p175 Y C

661 720
 PGH TCCCCAGGGAGGGTGTGGAGGGGGTGGTGGAGAGGGGTGAATTCGTCCCTCTCTGCCT
 P
 C
 J
 p22
 p91 *****
 p122
 p160
 p175

721 780
 PGH AGTGGGAGGAAAATGAGGGGTTCTGGAGTATTGAGGCCAA-CCGAAGATGCTATCAGGTG
 P C -
 C C -
 J Y - R
 p22 C ***
 p91 *****
 p122 Y -
 p160 C -
 p175 C -

781 840
 PGH AGTGTAAGGAGGATTCCCAAGAAAAGCAGCAAGGAGAACC GCGCCCAGTGTAGA
 P ... R T
 C
 J T
 p22 *****
 p91 *****
 p122 *****
 p160 *****
 p175 *****

841 900
 PGH CCTGGATGGCTGTCCCCTCTCCCAGGAGCGCGCTACATCCCGGAGGGACAGAGGTACTC
 P
 C
 J
 p22 *****
 p91 *****
 p122 *****
 p160 *****
 p175 *****

901 960
PGH CATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGCTTCTCGGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAA
P
C
J
p22 *****
p91 *****
p122 *****
p160 *****
p175 *****

961 1020
PGH GGACGAGGCCAGCAGAGATCGGTGAGTGGCCACCTGCCACCTGCCAGCCGGGAGCAGG
P-----.....
C-----.....
J ..W.....-----.....
p22 *****
p91 *****
p122 *****
p160 *****
p175 *****

1021 1080
PGH GGCCTCCCTCTTCCTAAGAAGGCTGCCCCATCTCTCATCATCAGGGCCTTGGGCGGCCTT
P
C
J-.....-.....
p22 *****
p91 *****
p122 *****
p160 *****
p175 *****

1081 1140
PGH CTCCCCGAGCTGGTGGGGG-TGATGGTGGCAGAGGGCGGGGTGGTGAAGGGGACGCCAC
P-.....*****
C-.....
J*****
p22 *****
p91 *****
p122 *****
p160 *****
p175 *****

1141 1200
PGH CGGCGGAGGCAGCGCCCCCATCCACGCATCTGCCCGCAGGACGTGGAGCTGCTGCGCTT
P *****
C*****
J *****
p22 *****
p91 *****
p122 *****
p160 *****
p175 *****

1201 1260
 PGH **CTCGCTGCTGCT-CATCCAGTCGTGGCTCGGGCCCGTGCAGTTCCTCAGCAGGGTCTTCA**
 P *****
 C ***** - **K**
 J *** -
 p22 ***** - -
 p91 ***** -
 p122 ***** -
 p160 ***** -
 p175 ***** -

1261 1320
 PGH **CCAACAGCCTGGT-GTTTGGCACCTCAGACCGCTCTACGAGAAGCTGAAGGACCTGGAG**
 P -
 C -
 J -
 p22 **T**
 p91 -
 p122 -
 p160 -
 p175 -

1321 1380
 PGH **GAGGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGTGGGGAGGCGCGCT-CGGGTCCCGCACACTGGGGC**
 P - **G**
 C - **G**
 J - **G**
 p22 - **G**
 p91 - **G**
 p122 - **G**
 p160 - **G**
 p175 - **G**

1381 1440
 PGH **CCATGCCGGCTCTCTCCCGGCTGAGCGGAGCGGTGGGGGGACGCACGTGGGCTGGGGGAG**
 P
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

1441 1500
 PGH **AGGGTCCCGATGCTCTCTGTAGCAGTTCCTCTCGACCCGAGAAATCTTTTCCTCAT**
 P -
 C -
 J -
 p22 -
 p91 -
 p122 -
 p160 -
 p175 -

1501 1560
 PGH TTTCCCTGCGGAGTCTTCCCTCTTTGTCTCTTCCAAGCATGGAGGGGAGGGTGAAGA
 P **Y**
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

1561 1620
 PGH CGGAGGGGACAGGAGAGCGCCGCTGCCAAGGACTCGGCCCTGTCTCTCTCCCTTTTG
 P **Y**
 C **T**
 J **T**
 p22 **T**
 p91 **Y**
 p122 **C**
 p160 **T**
 p175 **T**

1621 1680
 PGH CAGGAGCTGGAGGATGGCAGCCCCCGGGCAGGACAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAA
 P
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

1681 1740
 PGH TTTGACACAACTTGCAGTGATGACGCGCTGCTTAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGC
 P
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

1741 1800
 PGH TTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACATACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCGCCGCTTC
 P
 C
 J
 p22
 p91
 p122
 p160
 p175

```

1801                                     1860
PGH GTGGAGAGCAGCTGTGCCTTCTAGTTGCTGGGCATCTCTGTTGCCCTCCCCAGTACCTC
P .....
C .....-.....
J .....
p22 .....
p91 .....
p122 .....-.....
p160 .....*****
p175 .....

1861                                     1920
PGH CCCTGACCCTGGAAAGTGCCACCCCAATGCCTGCTGTCCCTTTCCTAATAAAACCAGGTTG
P .....*****
C .....*****
J .....*****
p22 .....*****
p91 .....*****
p122 .....*****
p160 *****
p175 .....*****

```

Figura 3 – Comparação das seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR, a partir de DNA genômico de suínos. A primeira linha corresponde à seqüência depositada no *GenBank* (M17704). As letras P, C e J referem-se aos três varrões da raça nativa Piau. As demais seqüências referem-se às seqüências das matrizes comerciais. A região TATA-box e os Éxons I, II, III, IV e V estão em negrito. As variações encontradas nas seqüências apresentam-se em negrito. O ponto (.) corresponde a trechos homólogos e o asterisco (*) a trechos não seqüenciados do gene.

No éxon II do gene PGH foram observadas mutações de bases, três delas já descritas por VIZE e WELLS (1987). As mudanças de bases, G para A na posição 557 e T para C na posição 636, não alteraram os códons Gly e Ala, respectivamente. A mudança da base C para T na posição 508 alterou o códon de Ala para Val, sendo que duas matrizes comerciais apresentaram ambas as formas, ou seja, parecem ser heterozigotas.

Foi observado polimorfismo nas bases 556 e 557 e as mudanças das bases alteraram o códon de Gly para Asp e Glu em alguns animais.

Na posição 597 do gene PGH de dois varrões da raça nativa Piau verificou-se mudança de base C para T, e duas matrizes apresentaram as duas formas, porém essa

mudança não alterou o códon Asn. Também na posição 628 uma matriz apresentou-se heterozigota, mas não houve alteração do códon Leu.

No éxon IV do varrão C, na posição 1252, houve variação da base C para T, mudando o códon de Arg para Met, o animal parece ser heterozigoto para esse códon.

Outras variações ocorreram, mas foram aparentemente silenciosas, não alterando os aminoácidos codificados. Não foram também observadas alterações nos éxons I e V.

CASAS-CARRILLO et al. (1997) citam três polimorfismos no gene PGH, sendo dois associados com substituição de bases alterando a seqüência de aminoácidos codificados e um na região promotora em suínos das raças Large White, Yorkshire e Landrace.

Ocorreram inserções e deleções, principalmente na região de íntrons foram detectadas seis variações com mudanças no sítio de restrição, permitindo identificar as raças divergentes.

As substituições de bases verificadas nas seqüências de nucleotídeos do gene PGH nos varrões e nas matrizes, que alteraram sítios de restrição de enzimas, são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Substituições de bases verificadas nas seqüências de nucleotídeos do gene PGH dos varrões e das matrizes

Posição	Substituição	Animal	Enzimas	Sítio de restrição
383	C→A	J, 91 e 122	<i>CfrI</i> e <i>EaeI</i>	Exclusão
476	G→A	C, P, J e 175	<i>Bsp120I</i> , <i>DraII</i> , <i>EcoO109I</i> e <i>PspOMI</i>	Exclusão
486	G→A	J	<i>BsaI</i> e <i>Eco31I</i>	Exclusão
509	C→T	122 e 160	<i>Alw21I</i> , <i>AspHI</i> , <i>Bbv12I</i> e <i>BsiHKAI</i>	Inclusão
744	C→T	J e 122	<i>BpmI</i> e <i>GsuI</i>	Inclusão
1561	T→C	P e 91	<i>BbsI</i> , <i>Bbv16II</i> , <i>BpiI</i> e <i>BpuAI</i>	Inclusão

As variações verificadas nas seqüências dos varrões da raça nativa Piau mudam o sítio de restrição e permitem a distinção destes polimorfismos por meio das enzimas de restrição nas gerações filiais do sistema de acasalamentos adotado nesta pesquisa, possibilitando relacioná-los, em futuros estudos, com características de interesse econômico da suinocultura. Polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (RFLPs) do gene PGH associados a características quantitativas foram estudados por KNORR et al. (1997) em suínos das raças Pietran x Meishan e, por CHENG et al. (2000), nas raças Duroc, Landrace e Tao-Yuan.

Nas seqüências editadas dos varrões P e C da raça nativa Piau, foram encontradas deleções de sete pb (CCTGCCA), correspondendo às posições 998 - 1004 do gene PGH e, no varrão J, observou-se deleção de oito pb (TGCCAGCC). Apesar desse polimorfismo apresentar-se no íntron C, não afetando a seqüência de aminoácidos da molécula madura de PGH, este sítio pode representar um possível marcador. As enzimas de restrição *MluI* e *MspI* reconhecem o sítio nas seqüências dos varrões P e C, sendo que a deleção na seqüência do varrão J excluiu o sítio de clivagem para essas enzimas.

Inicialmente, realizou-se o seqüenciamento dos fragmentos do gene PGH adotando-se o agrupamento seletivo de DNA das matrizes comerciais (*mix* de DNA) para reduzir os custos de genotipagem.

Na Figura 4 são apresentados dois eletroferogramas de seqüenciamento automático referentes a dois *mix* de DNA. Observa-se que alguns animais da população estudada podem ser heterozigotos ou homozigotos para o alelo TATA2. Entretanto, quando realizou-se o sequenciamento individual de algumas matrizes, por amostragem aleatória, todos os animais apresentaram o alelo TATATAAA. Foi observada a substituição de uma base A por T na região TATA-box do gene nos animais seqüenciados, quando comparada com a seqüência depositada no *GenBank* (Figura 3).

Polimorfismos na região promotora do gene podem estar associados com diferenças na expressão do gene. KIRKPATRICK et al. (1993) descreveram duas formas da região TATA-box em suínos, TATAAAAA (TATA1) e TATATAAA (TATA2). A substituição de uma adenina (A) por uma timina (T) no fragmento interrompe uma região de adeninas consecutivas na região promotora TATA-box do gene.

O número de adeninas na região promotora tem sido associado com diferenças na atividade transcricional (PAULY et al., 1992) e com afinidade por proteínas ligadas ao DNA (Parvin et al., 1995), citados por CASAS-CARRILO et al. (1997).

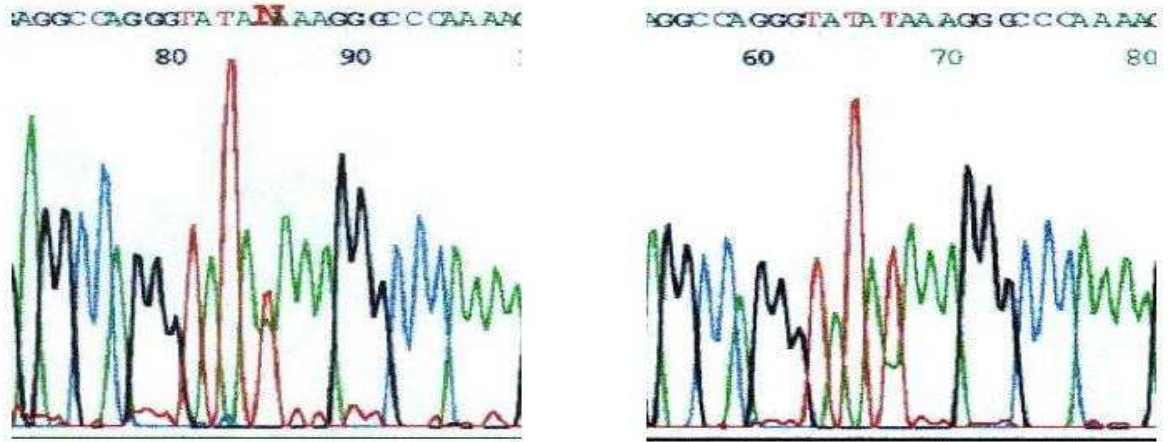


Figura 4 – Eletroferogramas do seqüenciamento automático da região TATA-box dos animais da população estudada. O da esquerda representa um animal heterozigoto (N: picos A e T), e o da direita mostra um animal homozigoto para o alelo TATA2

NIELSEN et al. (1995) verificaram associação entre variantes do TATA-box do PGH de suínos e medidas de concentração basal do hormônio de crescimento, indicando a possibilidade funcional significativa da seqüência variante.

Os resultados dos trabalhos de CASAS-CARRILO et al. (1997) sugerem que os polimorfismos do PGH tiveram pequena associação com o crescimento dos animais ou com a variação nas características de carcaças. Segundo os autores, a associação da substituição de base na região TATA-box do PGH com taxa de crescimento em suínos foi inconsistente.

CHENG et al. (2000) analisaram polimorfismos no gene PGH com as enzimas de restrição TaqI e DraI associando-os com características de crescimento de suínos nas raças Duroc, Landrace e Tao-Yuan. Os resultados sugerem que características como ganho de peso diário e eficiência alimentar são altamente correlacionadas com os genótipos do gene PGH.

ARBONA et al. (1988) verificaram que linhas de suínos da raça Landrace, selecionadas por três gerações para ganho de peso máximo aos 200 dias de idade,

tiveram maior concentração de hormônio de crescimento no plasma; entretanto, os mecanismos da seleção para crescimento e aumento da secreção do hormônio ainda precisam ser determinados.

Neste estudo, verificaram-se muitos polimorfismos pontuais de substituição, inserção e deleção em todos os fragmentos seqüenciados, que servirão de subsídios para estudos na geração filial F2 da população. Segundo KNORR et al. (1997), o uso dos alelos múltiplos do *locus* PGH em seleção assistida por marcadores ainda é discutível e necessita de maiores investigações para ser aplicado.

Conclusões

Com base em resultados, conclui-se que:

- 1) As seqüências de nucleotídeos do gene PGH dos animais da população estudada são polimórficas;
- 2) Polimorfismos em regiões importantes do gene PGH, como a região promotora e éxons, foram observados nos seqüenciamentos;
- 3) Três polimorfismos alteraram os códons para os amionoácidos do hormônio de crescimento suíno; e
- 4) Seis variações de bases nucleotídicas alteraram os sítios, sendo que esses polimorfismos poderão ser detectados por enzimas de restrição.

Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 5(17):3389-3402.
- ARBONA, J.R., MARPLE, D.N., RUSSEL, R.W. et al. 1988. Secretory patterns and metabolic clearance rate of porcine growth hormone in swine selected for growth. *J. Anim. Sci.*, 66:3068-3072.
- BALATSKII, V.N., POCHERNIAEV K.F. 1995. The polymorphic BsuRI restriction site of the swine growth hormone gene. *Tsitol. Genet.*, 29(1):45-48.
- BOYD, R.D.; HARKINS, M.; BAUMAN, D.E.; BUTLER, W.R. 1985. The effect and practical implications of recombinant porcine growth hormone on lactation performance of sows. Proc. Cornell Nutr. Conf., p.10-16.
- CASAS-CARRILLO, E., PRILL-ADAMS, A., PRICE, S.G., et al. 1997. Relationship of growth hormone and insulin-like growth factor-1 genotypes with growth and carcass traits in swine. *Animal Genetics*, 28:88-93.
- CHENG, W.T.K., LEE, C.H., HUNG, C.M. et al. 2000. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and tao-Yuan pigs. *Theriogenology*, 54:1226-1237.
- ETHERTON, T.D.; WIGGINS, J.P.; EVOCK, C.M., et al. 1987. Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone: determination of the dose-response relationship. *J. Anim. Sci.*, 64:433.
- FERREIRA, W.J., WENCESLAU, A.A., GUIMARÃES, S.E.F. et al. 2000. Procedimentos computacionais para auxiliar à seleção de *primers*. In:

- CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46, 2000, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: SBG, 2000, 23(3):247.
- GLUCKMAN, P.D., BREIER, B.H. 1987. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.*, 70(2):443-466.
- HARREL, R.J., THOMAS, M.J., BOYD, R.D. et al. 1977. Effect of porcine somatotropin administration in young pigs during the growth phase from 10 to 25 kilograms. *Journal Animal Science*, 75:3152-3160.
- HUGHES, J.P., ELSHOLTZ, H.P., FRIESEN, H.G. 1985. Growth hormone and prolactin receptors. In: Polypeptide Hormone Receptors . New York: Posner, B.L.157-199.
- KIRKPATRICK, B.W., HUFF, B.M., CASAS-CARRILO, E. 1993. Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly polymorphic genetic markers. *Anim. Genet.*, 24:155-161.
- KLINDT, J., BUONOMO, F.C., YEN, J.T. et al. 1995. Administration of the porcine somatotropin by daily injection: growth and endocrine responses in genetically lean and obese barrows and gilts. *J. Anim. Sci.*, 73:3294-3303.
- KNORR, C., MOSER, G., GELDERMANN, H. 1997. Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Anim. Genet.*, 28:124-128.
- LARSEN, N.J., NILESEN, V.H. 1997. DNA sequence variation in the porcine growth hormone promoter region from Danish and exotic pigs.. *Anim. Biotechnology*, 8(2):151-166.
- MAHARAJAN,P., MAHARAJAN, V. 1993. Growth hormone signal transduction (review). *Experientia*, 49:980-987.

- NIELSEN, V.H., LARSEN, N.J., AGERGAARD, N. 1995. Association of DNA-polymorphism in the growth-hormone gene with basal-plasma growth-hormone concentration and production traits in pigs. *J. Anim. Breed. and Genet.*, 112:205-212.
- PARVIN, J.D., McCORMICK, R.J., SHARP, P.A., FISHER, D.E. 1995. Prebending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor. *Nature*, 373:724-727.
- PAULY, M., TREGER, M., WESTHOF, E., CHAMBON, P. 1992. The initiation accuracy of the SV40 early transcription is determined by functional domains of two TATA elements. *Nucleic Acids Res.*, 20:975-982.
- RUTZ, F.; XAVIER, E.G. 1998. Agentes repartidores de energia para aves e suínos. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. In:Anais. São Paulo, p.201-218.
- SAMBOOK, J. FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York Cold Spring Jharbor Laboratory Press, p.914-919.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463-67.
- SEEBURG, P.H. STACEY, S., ADELMAN, J. et al. 1983. Efficient bacterial expression of the bovine and porcine growth hormones. *DNA*, 2:37-45.
- SQUIRES, E.J.; ADEOLA, O.; YOUNG, L.G.; HACKER, R.R. 1993. The role of growth hormones, á-adrenergic agents and intact males in pork production; A review. *Can. J. Anim. Sci.*, 73:1-23.

- VIZE, P.D., WELLS, J.R.E. 1987. Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene*, 55:339-344.
- WOYCHIK, R.P.; CAMPER, S.A; LYONS, R.H., et al. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.*, 10:7197-7210.
- YERLE, M., LAHBIB-MANSAIS, Y., THOMEN, P.D., GELLIN, J. 1993. Localization of the porcine hormone gene to chromosome 12p1.2->p1.5. *Anim. Genet.*, 24(2): 129-131.

CAPÍTULO 2

Seqüenciamento do gene do fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) em suínos de raças divergentes

Resumo – O contínuo melhoramento genético dos suínos requer o conhecimento dos genes que controlam os vários aspectos do crescimento, desenvolvimento, reprodução e saúde dos animais. Alguns estudos permitem constatar que o gene IGF-I está associado ao crescimento e às características de carcaça de suínos. O estabelecimento de associações entre marcadores genéticos e características de interesse econômico pode causar grande impacto na suinocultura, promovendo maiores ganhos genéticos por geração. Com o objetivo de estudar variantes alélicas do gene IGF-I em suínos da raça nativa Piau e matrizes comerciais, regiões desse gene foram seqüenciadas e analisadas, assim como o microssatélite IGF-1, localizado na região 5'. Os resultados das análises do gene IGF-I sugerem que se trata de um gene altamente conservado, sendo observadas apenas duas variações de bases na região 3' nos animais da raça nativa Piau. O estudo do microssatélite IGF-1 revelou que este é polimórfico na população analisada e pode ser usado como marcador.

Palavras-chave: polimorfismo, éxon, região promotora, oligonucleotídeos, suínos.

Sequencing Insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene in pigs from divergent breeds

Summary - The continuous swine genetic improvement requires the identification of genes controlling some aspects of growth, development, reproduction and health. Some studies refer to the evidence that IGF-I gene is associated with growth and carcass traits in pigs. The establishment of associations between genetic markers and economic traits can cause great impact in pig breeding, enhancing genetic gain per generation. Aiming the study of allele variants of IGF-I gene in pigs from Piau swine, a local breed in Brazil, and commercial line dams, gene fragments were sequenced and analyzed, as well as IGF-I microsatellite which is located at the 5' region. The results obtained for IGF-I gene suggest that it is highly conserved, as only two variations of bases had been observed at the 3' region in animals from Piau breed. The IGF-I microsatellite study showed that it is polymorphic in the analyzed population and can be used as a molecular marker.

Key-Word: polymorphism, exon, promoter site, oligonucleotides, swine.

Introdução

A taxa de crescimento e a composição corporal são características importantes na produção animal. Os métodos tradicionais de seleção para melhorá-las têm tido sucesso; porém, a contribuição individual dos genes no processo ainda é desconhecida, porque são características controladas por muitos genes e influenciadas por vários fatores ambientais.

Um postulado no melhoramento animal é que a variação genética das características quantitativas deve-se à segregação simultânea de muitos genes, cada um contribuindo com pequenos efeitos (GELDERMANN, 1975). Entretanto, LANDE (1981) questionou e argumentou que é possível poucos genes serem responsáveis por uma parcela relativamente grande da variação genética da característica, ou seja, uma proporção significativa do *locus* da característica quantitativa (QTL), responsável pela variação da característica, em determinada população, deve-se ao gene candidato ou *major gene*. Segundo MONTALDO e MEZA-HERRERA (1998) são genes que atuam em características biológicas de interesse, seqüenciados e que possuem informações sobre a expressão de suas proteínas.

O gene do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), é considerado um gene candidato, devido à sua importância no crescimento e na composição corporal dos animais (HORVAT e MENDRANO 1995; YU et al. 1995). As funções do hormônio IGF-I integram a nutrição e o controle do crescimento muscular (CASAS-CARRILLO et al. 1997b). As concentrações de IGF-I circulantes são correlacionadas positivamente com a taxa de crescimento em suínos e também em outros animais (BLAIR et al. 1987; BUONOMO et al., 1987; DAMMACCO et al., 1993). OWENS et al. (1999) observaram que diferenças na taxa de crescimento e composição corporal de suínos são, pelo menos parcialmente, devido às alterações na produção endógena de IGF-I, sendo este um regulador do tecido muscular magro.

A região do DNA genômico, codificadora do gene do fator de crescimento-I semelhante à insulina (IGF-I) em suínos, foi clonada e seqüenciada por WELLER et al. (1993). O gene IGF-I está localizado no cromossomo 5 dos suínos e constitui-se de 2 éxons intercalados por 1 íntron, totalizando 4297 pares de bases (pb). O hormônio IGF-I, também referido como somatomedina C, possui 70 aminoácidos e pertence a um grupo de polipeptídeos que exercem influência direta nos processos de crescimento e desenvolvimento animal. O fígado é a maior fonte de IGF-I circulante, sendo agente mediador da maioria dos efeitos do hormônio de crescimento no desenvolvimento muscular.

As associações de marcadores microssatélites com *loci* de características quantitativas (QTLs) são importantes para o melhoramento genético animal. O gene IGF-I possui um microssatélite na região 5', sendo que CASAS-CARRILO et al. (1997) verificaram potencial associação desse microssatélite com um QTL para ganho de peso médio diário de suínos.

PURSEL et al. (2000) compararam suínos transgênicos para o gene IGF-I com animais controle e verificaram alterações favoráveis em várias características das carcaças dos animais que aumentaram a expressão do IGF-I.

A investigação e o aumento do entendimento do mecanismo de ação desse fator de crescimento auxiliará o desenvolvimento de novas estratégias para alterar a taxa de crescimento e a composição corporal dos suínos.

Objetivando estudar variantes alélicas na região promotora e nos éxons I e II do gene IGF-I em suínos de raças divergentes, foram realizados o seqüenciamento automático desses fragmentos e a análise do microssatélite IGF-1.

Material e Métodos

Material

Neste trabalho, foram analisadas amostras de DNA de vinte e um animais da espécie suína (*Sus scrofa*), pertencentes a um sistema de acasalamento entre dezoito matrizes comerciais (tipo carne) e três varrões da raça nativa Piau (tipo banha).

A identificação e a composição racial dos animais foram detalhadas no Capítulo 1.

Análises do DNA genômico

Foi empregado o agrupamento seletivo de DNA para reduzir os custos de genotipagem. Adotou-se o critério de unir, em cada *mix*, seis amostras de DNA genômico das matrizes comerciais na mesma concentração. Na Tabela 1 é apresentada a identificação dos animais com o respectivo *mix*. O DNA dos varrões da raça nativa Piau foi seqüenciado individualmente.

Os procedimentos de isolamento de DNA e amplificação dos fragmentos por ensaios de PCR foram semelhantes aos já descritos no Material e Métodos do Capítulo 1. O resultado das amplificações dos fragmentos do gene IGF-I foi observado em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 μ L de cada amostra. Após a corrida em cuba de eletroforese, foi realizada a coloração com nitrato de prata.

Tabela 1- Número do *mix* de DNA e identificação das matrizes comerciais

<i>mix</i>	Identificação dos animais
1	90, 91, 92, 147, 151 e 154
2	122, 127, 130, 133, 159 e 160
3	22, 25, 69, 80, 175 e 211

Desenho dos primers para o gene IGF- I

Um fator importante que influencia a qualidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) é a escolha adequada dos *primers*. No desenho destes, algumas considerações foram observadas para garantir o anelamento correto entre eles e a seqüência-alvo de DNA. Dentre elas, destacam-se a temperatura de anelamento (TA) do par de *primers* similar, a composição de bases e o comprimento dos *primers*. Os *primers* desenhados anelam em sítios espaçados entre 400 e 600 pb, e a estabilidade de duplex foi determinada de maneira precisa, por meio do cálculo da energia livre de formação de duplex (ÄG) .

Uma vez que a escolha indevida de *primers* acarreta prejuízos consideráveis, utilizou-se o *software* desenvolvido por FERREIRA et al. (2000), que auxilia nesta escolha, viabilizando os cálculos dos fatores considerados. Baseando-se nesses parâmetros foram desenhados e sintetizados três pares de *primers* (Tabela 2).

Toda a numeração citada, atribuída aos pares de bases do gene IGF-I, foi baseada na seqüência publicada por WELLER et al. (1993), número de acesso no *GenBank* X64400.

Tabela 2 - Caracterização dos *primers* desenhados para o gene do fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) em suínos

Seqüência do <i>primer</i>	Posição no gene IGF-I	ÄG ¹ Kcal/mol	TA ² °C	Tamanho da região amplificada ³ (pb)
F1 TGGAATATAAAATTGCTCGCCATC	1411 - 1434	-5.00	65	506
R1 TGCAAAGTCTGGAAATGAATTGGT	1923 - 1946	-6.30	65	506
F2 CAGATAGAGCCTGCGCAATGG	1808 - 1828	-6.50	68	454
R2 CCTGCAGAAGTGGAGGATTTAGC	2239 - 2261	-5.70	68	454
F3 CCGGGTGTCCCAATGTAAGTAG	3679 - 3700	-4.2	68	560
R3 TTCAGGGAACAGTCCAGTACACC	4216 - 4238	-6.30	68	560

¹ÄG: Energia livre de formação de duplex

²TA: Temperatura de anelamento

³*Primers* F1 e R1: região promotora; *Primers* F2 e R2: éxon I e *Primers* F3 e R3: éxon II

As seqüências analisadas compreenderam parte da região promotora e os éxons I e II do gene IGF- I dos suínos, conforme esquema apresentado na Figura 1.

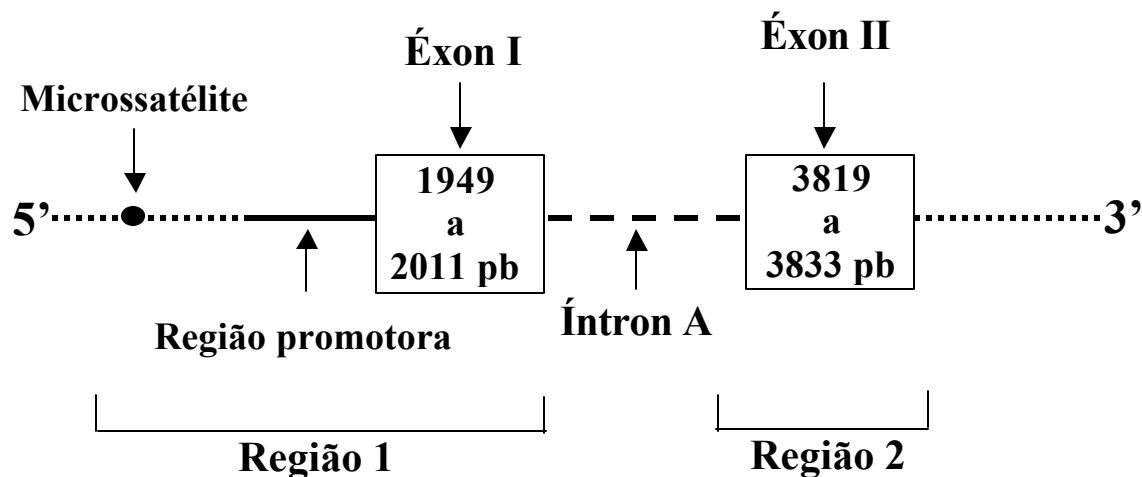


Figura 1 – Diagrama do gene IGF-I (4297pb). Os retângulos representam as regiões traduzidas (éxons I e II), a linha tracejada mostra a região não-transcrita (íntron A). A região promotora é representada pela linha contínua, enquanto as regiões 1 e 2, as seqüências do gene analisadas.

Purificação e seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Para a purificação dos fragmentos do gene IGF- I, foram utilizados 100 μ L da reação de amplificação e seguiu-se o protocolo recomendado no *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)*, obtendo-se um volume final de 12 μ L de DNA purificado.

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxinucléotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977). O DNA foi seqüenciado utilizando-se o *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. As seqüências geradas foram editadas e montadas em contíguos pelo programa *SEQ MAN II (DNASTAR Inc.)* e, posteriormente, comparadas entre si e com as seqüências já depositadas no *GenBank*, utilizando-se o programa *BLAST (ALTSCHUL et al., 1997)*. Os procedimentos estão detalhados no Material e Métodos do Capítulo 1.

Para as análises de restrição destas seqüências, foi utilizado o programa *Webcutter* (<http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/>).

Marcador Microssatélite: IGF-1

Foi investigado um microssatélite multialélico localizado na região 5' do gene IGF-I de suínos. Trata-se de uma repetição em tandem de dinucleotídeos (CA)_n. Para a detecção de polimorfismos, foi utilizado um par de *primers* cuja extremidade 5' estava marcado com fluorcromo (FAM), que flanqueia a região do microssatélite.

IGF-1 A - GCTTGGATGGACCATGTTG

IGF-1 B – CATATTTTCTGCTTACTTGAACCT

O fragmento de DNA específico foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em termociclador *MJ Research, Inc. modelo PTC-100-Watertown, USA*, utilizando um volume final de 20,0 µL, contendo 4,0 pmoles de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris-KCl, 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase e 25 ng de DNA genômico.

O programa para a PCR consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C, por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturação das fitas a 94°C, por 1 minuto, anelamento dos *primers* 58°C, por 1 minuto, e extensão do fragmento a 72°C, por 1 minuto. Ao final, seguiu-se mais um passo de extensão por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 4%, no seqüenciador *ABI PRISM 377* e, para a análise dos fragmentos, utilizaram-se os programas *GeneScan* e *Genotyper* (*Applied Biosystems*).

Resultados e Discussão

Caracterização dos fragmentos amplificados por ensaios de PCR

As seqüências de nucleotídeos dos três pares de *primers* e suas respectivas características estão apresentadas na Tabela 2.

Como pode ser observado, cada par de *primer* possui temperatura de anelamento similar, conforme sugerido por RYCHLIK (1993). Além disso, a energia livre de formação de duplex dos *primers* estão entre -8,0 e 0,0 kcal/mol, o que, segundo BRESLAUER et al. (1986), é uma condição importante para uma boa produtividade na PCR.

Verifica-se que a distância *intra-primer* variou entre 454 e 560 pb (Tabela 2). Alguns estudos recomendam ampliações de fragmentos com aproximadamente 600 pb para obtenção de resultados satisfatórios. Destaca-se ainda que os *primers* não apresentaram homologia com seu par antiparalelo. Por meio dos resultados, constata-se, também, que o *software* SYSPCR (FERREIRA et al., 2000) foi eficiente para atender aos objetivos propostos.

O sucesso das ampliações dos fragmentos do gene IGF-I foi observado em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 µL de cada amostra (Figura 2).

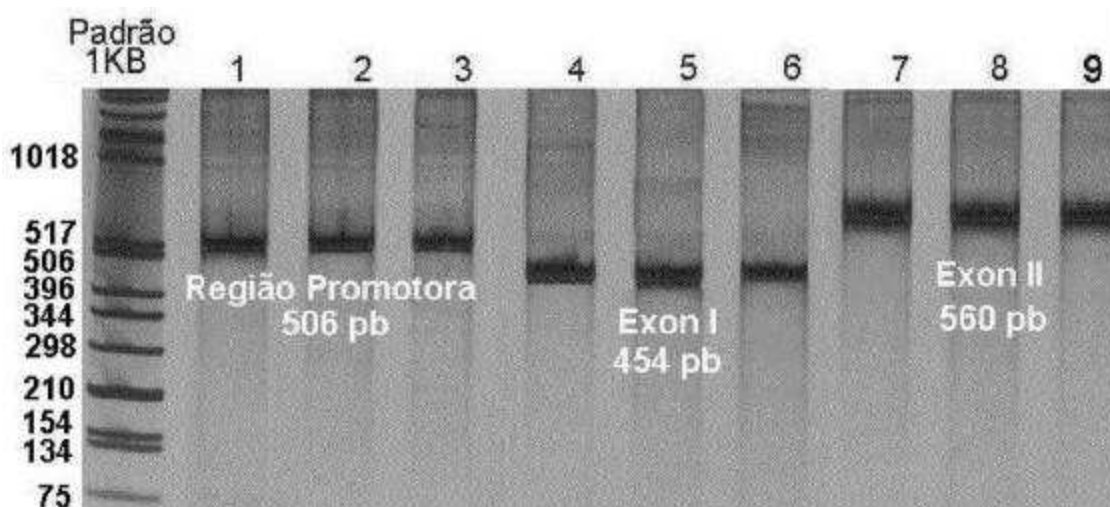


Figura 2 – Resolução em gel de poliacrilamida a 5% dos produtos de PCR referentes aos três fragmentos do gene IGF-I em suínos: marcador de peso molecular “1Kb DNA Ladder” (*Life Technologies*); região promotora (canaletas 1 a 3); região do éxon I (canaletas 4 a 6); região do éxon II (canaletas 7 a 9).

Verificou-se que os três pares de *primers* amplificaram os fragmentos em estudo, com bom rendimento e não aconteceram ampliações inespecíficas nas condições de PCR citadas, indicando que os *primers* escolhidos têm uma seqüência única dentro das regiões amplificadas.

Os produtos de PCR, a partir do DNA dos animais do experimento, apresentaram bandas com padrão semelhante, não sendo observado nenhum polimorfismo no tamanho destes, com relação a cada fragmento individualizado.

Caracterização do seqüenciamento do gene IGF-I dos suínos

O seqüenciamento automático dos fragmentos de DNA gerou uma série de seqüências que foi editada individualmente e montada em contíguos.

As seqüências dos três fragmentos do gene IGF-I analisados, tanto dos varrões da raça Piau quanto das matrizes comerciais, foram alinhadas com a seqüência publicada por WELLER et al. (1993), número de acesso no *GenBank* X64400, a qual foi tomada como referência para identificação de cada base no gene.

Na Figura 3 são apresentados os alinhamentos de todas as seqüências produzidas. A seqüência de referência IGF-I aparece completa no topo de cada conjunto. As três seqüências logo abaixo referem-se aos fragmentos do gene analisados nos três varrões, e as demais seqüências, aos *mix* de DNA das matrizes comerciais.

A seqüência codificadora do gene IGF-I é considerada uma região conservada entre as espécies. TAVAKKOL et al. (1988) verificaram que as seqüências de aminoácidos do IGF-I são idênticas nas espécies suína e bovina. FOTSIS et al. (1990) determinaram que a seqüência de nucleotídeos precursora do IGF-I bovino (154 aminoácidos) é similar à precursora do IGF-I humano (153 aminoácidos, ROTWEIN et al., 1986), com 93% de homologia entre as seqüências.

Nas seqüências de bases geradas por esse estudo não foi observada, tanto na região promotora quanto nos éxon I e II, nenhuma divergência de bases em relação à seqüência padrão, também não ocorreu nenhuma mudança de base entre os animais de raças diferentes, concordando com os estudos sobre a conservação do gene IGF-I.

```

1411                                     1470
IGF-I  TGGAATATAAAATTGCTCGCCATCCTCCACGTATATTCTTTTCATACGGGTAAGGTGTAT
P      *****
C      *****
J      *****
mix1   *****
mix2   *****
mix3   *****

1471                                     1530
IGF-I  TAGCAGATGTGTGTGTCTTCCTGCCCAATAGAAAAGTTAATCAGAGGACAGCATCAGTATT
P      .....
C      .....
J      *****
mix1   .....
mix2   .....
mix3   *****

```

```

1531                                     1590
IGF-I  TTAATGTCTGCTCACCCCTGTCACCTAACACACATTCCTTTTAAGGGAAAAAATGCTTCTGT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1591                                     1650
IGF-I  GCTCTAGTTTTTAAAAATGCAAAGGTATGATGTTATTTGTCACCATGCCCAAAAAAGTCCTT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1651                                     1710
IGF-I  ACTCGATAACTTTGCCAGAAGAGGGAGAGAGAGAGAAGGCAAGCGTTCCTCCAGCTGTTT
P      .....
C      .....
J      ..... M .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1711                                     1770
IGF-I  CCTGTCTACAGTGTCTGTGTTTTGTAGATAAATGTGAGGATTTTCTCTAAATCCCTCTTC
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1771                                     1830
IGF-I  TGTTTGCTAAATCTCACTGTCACCTGCTAAATTCAGAGCAGATAGAGCCTGCGCAATGGAA
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1831                                     1890
IGF-I  TAAAGTCCTCAAAATTGAAATGTGACATTGCTCTCAACATCTCCCATCTCCCTGGATTTC
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

```

```

1891                                     1950
IGF-I  TTTTTCGCTCATTATTCCCTGCTAACCAATTCATTTCCAGACTTTGCACTTCAGAAGCAAT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

1951                                     2010
IGF-I  GGGAAAAATCAGCAGTCTTCCAACCCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGATTTCTTGAA
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

2011                                     2070
IGF-I  GGTAAATATTTCTTACTCTTTGAAGTCATTGGGGAATTTTCTTTAAATTTGTGTACTGTTT
P      .....
.      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

2071                                     2130
IGF-I  GCTTCTGCCTAGAAATGTTCTTCACTTTAGAATTTTCATTGTTTCGGCACTGGGAGTTAT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

2131                                     2190
IGF-I  TTATAAATTGCTGAATATGCAATTCGTGGGATCTGAAAAAATAGCTCCGGGAGATAAAT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

2191                                     2250
IGF-I  GCCTTTGCACAGATATCTGTGTGAGTAGAACTATTGCAAGGTACTTATGCTAAATCCTC
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   ..... *****
mix2   .....
mix3   .....

```

2251 2310
 IGF-I CACTTCTGCAGGGCTTGAGTGCTGTCATTATAGAAGATTCCCTTTAAATCCTGTCTATGGT
 P *****
 C *****
 J *****
 mix1 *****
 mix2 *****
 mix3 *****

3691 3750
 IGF-I ATGTAAGTAGATGCTTTCACAAACCCACCCACAAAGCAGCACATGTTTTTAAATCCTCA
 P *****
 C *****
 J *****
 mix1 *****
 mix2 *****
 mix3 *****

3751 3810
 IGF-I GTATTCTATTACATCAGTCTCTTAATACCCACCCCTGACCTGCTGTAAAAGATCTGGAAC
 P
 C
 J
 mix1
 mix2
 mix3

3811 3870
 IGF-I AAACAAAAATGGTTACACCTACAGTGAGTATTTTCTTATGACTATTGCCCTCGAATTTTG
 P
 C
 J
 mix1
 mix2
 mix3

3871 3930
 IGF-I CTGGGCATTTTTATTGTAGCCAGACATTTGGAATCAATTGATATTCAGTTATTTAAGA
 P
 C
 J
 mix1
 mix2
 mix3

3931 3990
 IGF-I TAAAAAGAAAGGTCTTTTAAATTTTGAATTTGTGAATGATTTTTGAGGAAAAAGTGCTCT
 P R
 C R
 J
 mix1
 mix2
 mix3

```

3991                                     4050
IGF-I  GCATTTTTTTTTTCCTTTTTTCTCTTTTCTTTCTGGTCCTTCTTTTCCTTTCTCTCTCTCAG
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

4051                                     4110
IGF-I  ATTTTTTCCTTTCTCTATCTTCATTTCTTTTGTGTTTGGCAAAATAAAAGGCCAAGTAAAG
P      .....K.....
C      .....K.....
J      .....
mix1   .....
mix2   .....
mix3   .....

4111                                     4170
IGF-I  GATGAACATATGGGGCCACTTGTTTTGAACTTTTAACTCCCAAGCAAATTCCTTATTGTT
P      .....
C      .....
J      .....
mix1   .....*****
mix2   .....
mix3   .....

4171                                     4230
IGF-I  TTCTTTTGGGGGAACATAATGTGATAAATTCTCTGGTTCTCTGTGGGTGTACTGGACTGT
P      .....***
C      .....****
J      .....*
mix1   *****
mix2   .....*
mix3   .....*****

```

Figura 3 – Comparação das seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR, a partir de DNA genômico de suínos. A primeira linha corresponde à seqüência depositada no *GenBank* X64400. As letras P, C e J referem-se aos três varrões da raça nativa Piau. As demais seqüências, mix1, mix2 e mix3, referem-se às seqüências das matrizes comerciais. A região TATA-box e os Éxons I e II estão em negrito. As variações encontradas nas seqüências apresentam-se em negrito. O ponto (.) corresponde a trechos homólogos e o asterisco (*) a trechos não-seqüenciados do gene.

Ocorreram apenas duas variações de nucleotídeos na região 3' do gene IGF-I em dois animais da raça nativa Piau, descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Substituições de bases verificadas nas seqüências de nucleotídeos do gene IGF-I nos varrões, em relação as seqüências das matrizes

Posição	Substituição	Varrão	Enzimas	Sítio de restrição
3957	A→G	C e P	<i>AcsI</i> e <i>ApoI</i>	Exclusão
4106	T→G	C e P	<i>BssT1I</i> , <i>Eco130I</i> , <i>EcoT14I</i> , <i>ErhI</i> e <i>StyI</i>	Inclusão

Percebe-se que na posição 3.957 da seqüência do gene IGF-I houve mutação pontual do tipo transição, ou seja, ocorreu substituição de uma purina por outra (A→G) e, na posição 4.106, aconteceu uma transversão, ou seja, uma pirimidina foi substituída por uma purina (T→G). Essas variações foram observadas apenas em dois varrões da raça nativa Piau que, aparentemente, são heterozigotos.

As duas variações verificadas nas seqüências dos varrões da raça nativa Piau mudam o sítio de restrição e permitem a distinção destes polimorfismos por meio das enzimas de restrição nas gerações filiais do sistema de acasalamentos adotado nesta pesquisa, possibilitando relacioná-los, em futuros estudos, com características de interesse econômico da suinocultura. A associação do gene candidato com uma característica fenotípica pode ser feita com base em apenas um sítio polimórfico dentro do próprio gene ou em haplótipos do gene candidato (LAGZIEL et al., 1996).

O varrão J parece ser heterozigoto (A e C) na posição 1.658, região promotora do gene; entretanto, essa variação não alterou nenhum sítio para enzimas de restrição.

Trabalhos de polimorfismos no gene IGF-I, em outras espécies, foram realizados por ROTWEIN et al. (1986) e TRICOLI et al. (1984), que identificaram polimorfismos no gene IGF-I humano com as enzimas de restrição *HindIII* e *PvuII*.

BISHOP et al. (1991) também identificaram polimorfismos no gene IGF-I mas, em bovinos, utilizando as enzimas de restrição *Pst*I e *Pvu*II na digestão do DNA genômico, entretanto, os autores relatam a necessidade de outros estudos para relacioná-los com características econômicas.

A análise dos fragmentos de DNA para o microssatélite IGF-1 na população estudada é apresentada na Tabela 4. A estratégia para o mapeamento de QTLs, adotada nessa pesquisa, é o uso de cruzamentos entre duas populações divergentes, ou seja, raças de suínos que podem estar fixadas ou próximas da fixação para diferentes alelos de QTL, devido à pressão de seleção diferencial. Assim, o conhecimento dos alelos presentes nos animais parentais permitirá que se acompanhe a herança desta região cromossômica nos animais da geração F1 e F2.

Tabela 4- Genótipos dos animais parentais para o marcador microssatélite IGF-1

Animal	Sexo	Raça	Fragmento 1 (pb)	Fragmento 2 (pb)
C	M	Nativa	198	204
P	M	Nativa	198	204
J	M	Nativa	200	202
22	F	Comercial 1	204	206
25	F	Comercial 1	202	202
69	F	Comercial 1	202	208
80	F	Comercial 1	202	202
90	F	Comercial 1	202	206
91	F	Comercial 1	202	206
92	F	Comercial 1	202	206
122	F	Comercial 1	202	206
127	F	Comercial 1	202	206
130	F	Comercial 1	202	206
133	F	Comercial 1	202	202
147	F	Comercial 2	200	204
151	F	Comercial 2	202	202
154	F	Comercial 2	200	204
159	F	Comercial 2	202	202
160	F	Comercial 2	202	202
175	F	Comercial 2	198	202
211	F	Comercial 2	194	198

Na geração parental de suínos estudados foram encontrados sete alelos ainda não descritos. Verifica-se que o microssatélite IGF-1 é polimórfico, adequado para utilizá-lo como possível marcador de QTLs.

Na Tabela 6 são apresentadas as heterozigosidades observadas para o microssatélite IGF-I na geração parental e também nas raças que a compõem. Para o cálculo da heterozigosidade utilizou-se o *software* TFPGA: *Tool for population genetic analyses*, (MILLER, 1997). Verifica-se que os alelos 1, 6 e 7 não foram observados nos varrões da raça nativa Piau, enquanto que as matrizes comerciais 1 não apresentaram os alelos 1, 2 e 3 e as comerciais 2 não possuem os alelos 5 e 6.

Tabela 6- Heterozigosidade observada no microssatélite IGF-1 na geração parental

Fragmento (pb)	Alelo	Número de alelos observados			
		Raça nativa Piau	Comercial 1	Comercial 2	População
194	1	0	0	1	1
198	2	2	0	2	2
200	3	1	0	2	2
202	4	1	13	7	7
204	5	2	1	2	2
206	6	0	7	0	0
208	7	0	1	0	0
Heterozigosidade observada	-	1,0000	0,7273	0,5714	0,7143

CASAS-CARRILO et al. (1997a), estudando linhas divergentes de suínos, selecionadas por 10 gerações para alta e baixa taxa de crescimento, identificaram um potencial QTL localizado no cromossomo 5, na região genômica flanqueada pelos marcadores IGF-1 e Sw1071, que influencia o ganho de peso médio diário dos suínos. Associações similares foram observadas em ratos por COLLINS et al. (1993); HORVAT e MENDRANO (1995).

Comparação de mapas genéticos entre as espécies indica que há uma ligação entre os genes IGF-I e interferon gamma (IFG), ambos os *loci* estão localizados no

cromossomo 5 em suínos, no cromossomo 10 em ratos e no cromossomo 12 em humanos (O'BRIEN et al. 1993). Essa conservação entre as espécies sugere que é uma região importante para o crescimento animal, entretanto, não é possível ainda determinar qual ou quais genes estão envolvidos com a expressão do crescimento (CASAS-CARRILO et al., 1997a).

Os resultados obtidos neste trabalho, sejam as variações no gene IGF-I observadas nos três varrões da raça nativa Piau ou o multialelismo do marcador microssatélite desse gene, servirão de subsídios para futuros estudos nas gerações da população gerada pelo acasalamento de animais da raça nativa e comerciais.

Conclusões

A partir dos resultados, conclui-se que:

- 1) Os *primers* desenhados por meio do *software* SYSPCR e sintetizados para amplificar a região promotora e os dois éxons do gene IGF-I de suínos foram adequados para as condições de PCR;
- 2) As seqüências de nucleotídeos da região promotora e dos dois éxons no gene IGF-I em suínos de raças divergentes foram conservadas;
- 3) Apenas dois polimorfismos encontrados na região 3' do gene puderam ser caracterizados como de ocorrência específica na raça nativa, podendo ser detectados por enzimas de restrição; e
- 4) O marcador microssatélite IGF-I é polimórfico na população estudada.

Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids Research*, 5(17):3389- 3402.
- BISHOP, M.D., TAVAKKOL, A., THREADGILL, D.W. et al. 1991. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor I. *J. Anim.Sci.*, 69:4306-4311.
- BLAIR, H. T., McCUTCHEON, S. N., MACKENZIE, D. D. S. et al. 1987. Variation in plasma concentration of insulin – like growth factor – I and its covariation with liveweight in mice. *Aust. J. Biol. Sci.*, 40:287-293.
- BRESLAUER, K. J., FRANK, R., BLOCKER, H. et al. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:3746-3750.
- BUONOMO, F. C., LAUTERIO, T. J., BAILE, C. A., CAMPION, D. R. 1987. Determination of insulin – like growth factor I (IGF-1) and IGF binding protein levels in swine. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 4:23-31.
- CASAS-CARRILLO, E., PRILL-ADAMS, A., PRICE, S.G., CLUTTER, A.C., KIRKPATRICK, B.W. 1997a. Relationship of growth hormone and insulin-like growth factor-1 genotypes with growth and carcass traits in swine. *Anim. Genetics*, 28:88-93.
- CASAS-CARRILLO, E., PRILL-ADAMS, A., PRICE, S.G.; CLUTTER, A.C., KIRKPATRICK, B.W. 1997b. Mapping genomic regions associated with growth rate in pigs. *J. Anim. Sci.*, 75:2047-2053.

- COLLINS, A.C., MARTIN, I.C.A., KIRKPATRICK, B.W. 1993. Growth quantitative trait loci (QTL) on mouse chromosome 10 in a Quackenbush-Swiss x C57BL/6J backcross. *Mamm. Genome*, 4:454-458.
- DAMMACCO, F., BOGHEN, M. F., CAMANNI, F. et al. 1993. Somatotropic function in short stature: Evaluation by integrated auxological and hormonal indices in 214 children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:68-72.
- FERREIRA, W.J., WENCESLAU, A.A., GUIMARÃES, S.E.F. et al. 2000. Procedimentos computacionais para auxiliar a seleção de *primers*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46, 2000, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: SBG, 2000, 23(3):247.
- FOTSIS, T., MURPHY, C., GANNON, F. 1990. Nucleotide sequences of the bovine insulin-like growth factors I (IGF-I) and its IGF-IA precursor. *Nucleic Acids Res.*, 18(3):676.
- GELDERMANN, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 46: 319-330.
- HORVAT, S., MEDRANO, J.F. 1995. Interval mapping of high growth (hg), a major locus that increases weight gain in mice. *Genetics* 139:1737-1748.
- LAGZIEL, A., LIPKIN, E., SOLLER, M. 1996. Associations between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics*, 142:945-951.
- LANDE, R. 1981. The minimum number of gene contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics*, 99: 541-553.

- MILLER, M.P. 1997. Tool for population genetic analyses (TFPGA): A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data on line: www.public.asu.edu/~mmille8/tfpga.html.
- MONTALDO, H.H., MEZA-HERRERA, C.A. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Animal Biotechnology*, 1(2):607-628.
- O'BRIEN, S.J., WOMACK, J.E., LYONS, L.A. et al. 1993. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genet.*, 3:103-112.
- OWENS, P.C., GATFORD, K.L., WALTON, P.E., MORLEY, W. CAMPBELL, R.G. 1999. Relationship between endogenous insulin-like growth factors and growth in pigs. *J. Anim. Sci.*, 77:2098-2103.
- PURSEL, G.V., MITCHELL, A.D., WELLS, K.D. et al. 2000. Alteration of carcass composition in swine with an IGF-I transgene. IN: PLANT & ANIMAL GENOME VIII CONFERENCE, 8, 2000, San Diego. Proceedings... San Diego, 1998.
- ROTWEIN, P., POLLOCK, K.M., DIDIER, D.K., KIWI, G.G. 1986. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. *J. Biol. Chem.*, 261:4828.
- RYCHLIK, W. 1993. Selection of *primers* for polymerase chain reaction. In: WHITE, B.A., (Ed.) *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Human Press, 1993. p. 31-40. (PCR Protocols: Current Methods and Applications, 15).
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463-67.

- TAVAKKOL, A., SIMMEN, F.A., SIMMENR.C.M. 1988. Porcine insulin-like growth factor-I (pigf-I): Complementary deoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid encoding evolutionarily conserved IGF-I peptides. *Mol. Endocrinol.*, 2:674.
- TRICOLI, J.V., RALL,L.B., SCOTT, J. et al. 1984. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature*, 310:784.
- WELLER, P.A., DICKSON, M.C., HUSKISSON, N.S. 1993. The porcine insulin-like growth factor-I gene: characterization and expression of alternate transcription sites. *Mol. Endocrinol.*, 11(2):201-211.
- YU, T.P., TUGGLE, C.K., SCHMITZ C.B. et al. 1995. Association of PIT1 polymorphism with growth and carcass traits in pigs. *J. Anim.Sci.*, 73:1282-1288.

Resumo e conclusões

Os genes do hormônio de crescimento e do fator de crescimento-I semelhante à insulina afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento muscular dos animais. Portanto, o conhecimento de polimorfismos destes genes e as associações destes às características de interesse econômico da suinocultura podem ser de grande importância nos programas de melhoramento genético.

Os genes em questão foram parcialmente seqüenciados em suínos de raças com diferenças quanto à precocidade, taxa de crescimento e acúmulo de gordura.

Com base em resultados, pode-se concluir que:

1) o gene PGH é bastante polimórfico entre os animais da raça nativa Piau e comerciais, apresentando variações de bases em regiões importantes do gene como TATAbox e éxons; e

2) o gene IGF-I é conservado entre os animais estudados.

Os polimorfismos encontrados nos genes IGF-I e PGH da geração parental, composta de raças de suínos divergentes, poderão ser analisados nas gerações segregantes F1 e F2 da população, utilizando-se enzimas de restrição e, assim, associá-los e testá-los como possíveis marcadores para características fenotípicas importantes na suinocultura.

APÊNDICE

Tabela 1A - O código genético. Abreviaturas dos aminoácidos especificados pelas trinças de nucleotídeos em mRNA

Símbolos	Aminoácidos	Códons
A	Ala Alanina	GCU GCC GCA GCG
C	Cys Cisteína	UGU UGC
D	Asp Ácido aspártico	GAU GAC
E	Glu Ácido glutâmico	GAA GAG
F	Phe Fenilalanina	UUU UUC
G	Gln Glicina	GGU GGC GGA GGG
H	His Histidina	CAU CAC
I	Ile Isoleucina	AUU AUC AUA
K	Lys Lisina	AAA AAG
L	Leu Leucina	CUU CUC CUA CUG UUA UUG
M	Met Metionina	AUG
N	Asn Asparagina	AAU AAC
P	Pro Prolina	CCU CCC CCA CCG
Q	Glu Glutamina	GAA GAG
R	Arg Arginina	CGU CGC CGA CGG AGA AGG
S	Ser Serina	UCU UCC UCA UCG AGU AGC
T	Thr Treonina	ACU ACC ACA ACG
V	Val Valina	GUU GUC GUA GUG
W	Trp Triptofano	UGG
Y	Tyr Tirosina	UAU UAC
UAA	UAG UGA } Fim da Cadeia	

Tabela 2A – Codificação do DNA e ambigüidades

Símbolo	Base
G	Guanina
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
R	G ou A (<i>puRine</i>)
Y	C ou T (<i>pYrimidine</i>)
W	A ou T (<i>Weak</i> - 2 pontes de H)
S	C ou G (<i>Strong</i> - 3 pontes de H)
K	G ou T (<i>Keto</i>)
M	A ou C (<i>aMino</i>)
B	C, G ou T (não A)
D	A, G ou T (não C)
H	A, C ou T (não G)
V	A, C ou G (não T)
N	A, C, G ou T (<i>aNy</i>)
X	A, C, G ou T