

**FREDERICO DE CASTRO FIGUEIREDO**

**ESTUDO DO GENE DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS –  
CORAÇÃO (H-FABP) 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F475e  
2004

Figueiredo, Frederico de Castro, 1976-  
Estudo do gene da proteína de ligação de ácidos graxos-  
coração (H-FABP) em suínos / Frederico de Castro  
Figueiredo. – Viçosa : UFV, 2004.  
xi, 46f. : il. ; 29cm.

Orientador: Paulo Sávio Lopes  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Suíno - Genética molecular. 2. Suíno - Melhoramento  
genético. 3. Suíno - Desempenho. 4. Suíno - Carcaça.  
5. Carne de porco - Qualidade. 6. Seqüenciamento de  
nucleotídeo. 7. Proteínas de ligação de ácidos graxos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.40821

FREDERICO DE CASTRO FIGUEIREDO

**ESTUDO DO GENE DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS –  
CORAÇÃO (H-FABP) 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 *Magister Scientiae*.

Aprovada em 30 de julho de 2004.

---

Prof. Robledo de Almeida Torres  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Simone Eliza F. Guimarães  
(Conselheiro)

---

Prof. Aldrin Vieira Pires

---

Prof. Ricardo Frederico Euclides

---

Prof. Paulo Sávio Lopes  
(Orientador)

Aos meus pais, Marco Afonso e Solange.  
Aos meus irmãos, Marcus Vinicius e Marina.

“...a vista mais bonita é à beira do precipício...”

“A auto-satisfação é inimiga do estudo. Se queremos realmente aprender alguma coisa, devemos começar por libertar-nos disso. Em relação a nós próprios devemos ser 'insaciáveis na aprendizagem' e em relação aos outros, 'insaciáveis no ensino’”

Mao Tse–Tung

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela minha vida, minha família e meus amigos. Pela força e por me fazer seguir adiante.

À minha mãe, pelas preocupações, aconselhamentos e incentivos em todos os momentos.

Ao meu pai, pela certeza de poder contar sempre com a sua ajuda e pelos ensinamentos de força e trabalho.

Ao meu irmão, pela presença em minha vida e pela ajuda indispensável.

À minha irmã, pelo carinho e paciência e pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por tornar possível a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Sávio Lopes, pela confiança, paciência, incentivo, amizade, oportunidades, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos meus conselheiros, Prof. Robledo e Prof<sup>a</sup> Simone, pelas contribuições, auxílios e amizade.

Ao professor Ricardo Bajá e ao amigo Aldrin, pelos valiosos anos de convivência, incentivos e pelas contribuições.

Aos professores Ana Lúcia, Juquinha, Mário Paulino, Odilon e Tião pela amizade, consideração, exemplo profissional e pela agradável convivência.

Às estagiárias Bruna, Débora, Patrícia, Paulinha e Virgínia pela amizade e pela ajuda na realização da pesquisa.

Aos amigos e colegas melhoristas Alex Lesado, Amauri Réptil, Band Zangado, Dani Serra, Danielle, Elizangela, Fausto, Fernanda, Gustavo, Kleibe (KLB), Jane Peixe, Kécya, Leandro Moco, Lindemberg, Luciara, Marcelo, Maria Amélia, Peloso, Rachel, Ricardinho, Rodolphinho e Samuel pelo convívio agradável, apoio, conselhos e amizade.

À minha amiga Karla Pops Magalhães, pela paciência, ajuda, por se tornar meu ponto de apoio em Viçosa, pelo carinho e principalmente pela confiança e amizade verdadeira.

Aos amigos Antonio, Vinícius e Wil pelos momentos inesquecíveis.

Aos amigos Bê, Cris (Cumadi), Giulia e Kedson, Cris Bonafé, Denis, Eduardo, Isabela e Kamila, Fê Cipri (íngua) e Acyr, Fefê e Mario Chizzotti, Fellipe, Fernanda e Mario DZO, Helayne, Jana, Juliana, Leidoca, Marcos, Moskito, Nivinha, Patrícia Bhering, Renatinha, Rozane e todos os amigos da Zoo 98 pela amizade e por tornarem a vida em Viçosa mais agradável.

Aos meus familiares, tios, tias, avós, primos e primas, pelo apoio, mesmo que indiretamente.

Aos funcionários do DZO/UFV, em particular, Adilson, Celeste, Edson, Márcia, Rosana e Venâncio, pelos auxílios e amizade.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento Genético de Suínos/DZO que contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Frederico de Castro Figueiredo, filho de Marco Afonso Figueiredo Caldeira e Solange Barroca de Castro Figueiredo, natural de Resplendor, Estado de Minas Gerais, nasceu em 27 de março de 1976.

Em março de 1998, iniciou o curso de Zootecnia pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, onde foi bolsista de Iniciação Científica por alguns anos, acompanhando e conduzindo pesquisas junto ao Programa de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFV.

Em setembro de 2002, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa e iniciou o Curso de mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa.

Em 30 julho de 2004, submeteu-se ao exame final de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento, na Universidade federal de Viçosa.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Genes Candidatos .....	3
2.2. FABP3 ou Gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H– FABP) .....	7
3. OBJETIVOS .....	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	10
CAPÍTULO 1 – Seqüenciamento do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H–FABP) em suínos de raças divergentes .....	13
CHAPTER 1 – Sequencing of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H–FABP) gene in swine of divergent breeds .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1. Local e animais .....	17
2.2. Extração, quantificação e diluição do DNA .....	17
2.3. Construção dos <i>primers</i> .....	17
2.4. Amplificação .....	18
2.5. Purificação e quantificação dos fragmentos amplificados .....	19

2.6. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados.....	19
2.7. Análises das seqüências .....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4. CONCLUSÕES .....	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
CAPÍTULO 2 – Associação de polimorfismos do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração com características quantitativas em suínos de raças divergentes .....	31
CHAPTER 2 – Association of polymorphisms of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H – FABP) gene with quantitative traits in swine of divergent breeds.....	32
1. INTRODUÇÃO .....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Local e animais .....	34
2.2. Características avaliadas .....	35
2.3. Genotipagem dos animais F2 .....	36
2.4. Análises estatísticas .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4. CONCLUSÕES .....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## RESUMO

FIGUEIREDO, Frederico de Castro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004. **Estudo do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H-FABP) em suínos.** Orientador: Paulo Sávio Lopes. Conselheiros: Robledo de Almeida Torres e Simone Eliza Facioni Guimarães.

Objetivou-se, neste trabalho, detectar variantes alélicas do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração para construção de mapas de restrição e estudar as associações entre as variantes detectadas e características quantitativas avaliadas em animais F2, para possíveis aplicações em programas de melhoramento genético de suínos. A Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H-FABP), produto do gene FABP3, é uma proteína da família das FABPs. O gene, que está localizado no cromossomo suíno seis, foi seqüenciado em animais parentais de um cruzamento F2 entre varrões da raça nativa brasileira Piau e fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain). Os animais tiveram seu DNA extraído de células brancas do sangue e amplificado por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Os *primers* usados na reação foram desenhados para amplificar os quatro *éxons* do gene. Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em seqüenciador automático ABI PRISM 310 (Applied biosystems). Os fragmentos gerados foram comparados com a seqüência do gene depositada no *GenBank*. Foram notadas divergências entre as seqüências geradas e as do *GenBank*, tanto em

alguns animais Piau quanto em algumas fêmeas comerciais. Essas alterações serviram como marcas para associações dos polimorfismos desse gene, com características quantitativas. Construiu-se um mapa de restrição, permitindo a identificação de enzimas que reconhecessem as alterações nas seqüências analisadas. Neste estudo, utilizou-se a enzima de restrição *Hinf* I, que reconheceu o sítio polimórfico presente no primeiro fragmento amplificado, na posição 108, caracterizado pela deleção de uma base Timina (T). Foram genotipados 246 animais F2 por meio da reação de restrição. Dois genótipos foram identificados, sendo 198 animais HH e 48 animais Hh. O polimorfismo estudado apresentou efeito significativo para as características: peso aos 63 dias de idade ( $p=0,1528$ ), idade ao abate ( $p=0,0110$ ), comprimento de carcaça pelo método americano ( $p=0,1789$ ), espessura de toucinho imediatamente após a última costela ( $p=0,0449$ ), espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar ( $p=0,1199$ ), espessura de toucinho medida na carcaça direita resfriada na região da última costela, a partir de corte transversal no carré, a 6,5cm da linha dorso-lombar ( $p=0,1377$ ), comprimento do intestino ( $p=0,0287$ ), peso total de copa ( $p=0,1623$ ), peso da copa sem pele e sem capa de gordura ( $p=0,1271$ ), peso total de carré ( $p=0,0442$ ), peso de papada ( $p=0,0195$ ), peso de filezinho ( $p=0,0867$ ), peso de rim ( $p=0,0028$ ) e pH 45 minutos após o abate ( $p=0,1256$ ). Os resultados obtidos indicam que o gene da H-FABP possui potencial para aplicação em programas de seleção assistida por marcadores moleculares para características de interesse econômico na cadeia produtiva de suínos.

## ABSTRACT

FIGUEIREDO, Frederico de Castro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, 2004, July. **Study of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H – FABP) gene in swine**. Adviser: Paulo Sávio Lopes. Committee Members: Robledo de Almeida Torres and Simone Eliza Facioni Guimarães.

The objectives of this study were to identify genetic polymorphisms in the Heart Fatty Acid Binding Protein gene for construction of restriction maps and to study associations between the polymorphisms detected and quantitative traits evaluated in F2 animals, to use in genetic improvement in animal production. The Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP), the product of the gene FABP3, is a protein of the family of the FABPs. This gene, that is located in the swine chromosome number six, was sequenced in parental animals of a F2 crossing between boars of the Brazilian native breed Piau and commercial sows (Landrace x Large White x Pietrain). The DNA of animals was extracted of white cells of blood and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Primers used in the reaction were drawn to amplify four exons of the gene. The PCR products were sequenced in ABI PRISM 310 (Applied biosystems). The sequences were compared with the sequence of the gene deposited in the GenBank. Divergences between the generated sequences and the GenBank sequences were noticed in both genetics groups. A restriction map was constructed allowing the identification of enzymes that recognize the alterations in the analyzed sequences. In this study, was used enzyme of restriction Hinf I,

that recognize the polymorphism in the position 108 in sequence I, characterized by the absence of a Thymine (T). Using the restriction reaction, 246 F2 animals were genotyped. Two genotypes were identified, 198 HH animals and 48 Hh animals. The polymorphism was significantly associated with: weight at 63 days of age ( $p=0.1528$ ), slaughter age ( $p=0.0110$ ), carcass length by the american carcass classification method ( $p=0.1789$ ), backfat thickness after last rib ( $p=0.0449$ ), backfat thickness between last 1st–2nd lumbar vertebrae ( $p=0.1199$ ), backfat thickness after last rib, at 6.5 cm from the midline ( $p=0.1377$ ), intestine length ( $p=0.0287$ ), total boston shoulder weight ( $p=0.1623$ ), skinless and fatless boston shoulder weight ( $p=0.1271$ ), loin (bone-in) weight ( $p=0.0442$ ), jowl weight ( $p=0.0195$ ), sirloin weight ( $p=0.0867$ ), kidney weight ( $p=0.0028$ ) and pH evaluated at 45 minutes after slaughter ( $p=0.1256$ ). These results show that H–FABP gene has potential for application in programs of marker assisted selection for quantitative traits in swine.

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura tem se tornado cada vez mais empresarial, diminuindo o número de pequenos criatórios pouco tecnificados e aumentando o número de grandes empresas produtoras da carne suína, que tem sido a carne mais consumida no mundo, principalmente em países como Alemanha, Canadá, Dinamarca, Espanha, França, Holanda, Itália e Portugal. No Brasil, ela tem ocupado a terceira posição, visto que 11,61% da carne consumida é suína, 46,71%, bovina e 41,68%, de aves. Isto é um indicativo do potencial de mercado que a carne suína tem, tanto para o mercado interno, que tem muito a crescer para acompanhar a tendência mundial, quanto para o externo (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2003).

O mercado consumidor de carne suína exige qualidade, notadamente nos países economicamente mais desenvolvidos. Ênfase tem sido dada no sentido de se obter animais de carne magra, com pouca espessura de toucinho e maior rendimento de carcaça.

Devido à grande importância da carne suína, houve necessidade de intensificar a seleção de animais para melhor eficiência produtiva por meio do melhoramento genético. Desta forma, obtiveram-se ganhos genéticos na produtividade, no ganho em peso, na eficiência alimentar e na qualidade de carcaça, principalmente no que se refere à percentagem de carne magra.

A genética molecular é uma ferramenta que tem contribuído para a melhoria da eficiência dos programas de seleção, uma vez que possibilita a

detecção de genes ou locos com grande influência sobre características de prolificidade, de desempenho, de carcaça e de qualidade da carne, entre outras.

O gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração apresenta efeitos significativos sobre algumas das características utilizadas em programas de melhoramento de suínos. Variantes alélicas desse gene podem estar associadas a diferentes padrões de deposição de gordura em suínos, bem como a outras características de qualidade da carne, de desempenho e de carcaça.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Genes Candidatos**

A eficiência dos programas de melhoramento genético depende da precisão com que os indivíduos submetidos à seleção são avaliados e, para isso, primeiramente devem ser definidas as características a serem incluídas no programa de melhoramento, assim como estabelecido um eficiente método de seleção.

Um aspecto importante no melhoramento genético está relacionado ao uso de marcadores moleculares associados às características quantitativas. Até recentemente, a informação usada para avaliação genética era limitada às relações de parentesco e características fenotípicas.

Marcadores moleculares são polimorfismos de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos. Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

Os programas de melhoramento genético deverão aliar aos métodos quantitativos a seleção assistida por marcadores. A aplicação da genética molecular irá possibilitar mudanças mais rápidas nas características economicamente importantes (FREITAS, 2000). O grande desafio consiste em

aproveitar a informação molecular de maneira eficiente a ponto de ser economicamente justificável.

A espécie suína é uma das que mais tem se beneficiado do grande progresso no conhecimento da genética molecular, tanto pelos investimentos diretos em pesquisa do seu próprio genoma quanto pela rápida conversão dos conhecimentos adquiridos em ferramentas aplicadas à seleção.

Em 1988, Andersson e colaboradores (citados por ANDERSSON, 1997), iniciaram o estudo sobre mapeamento genético de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para características de importância econômica em suínos, utilizando a estratégia de cruzamentos de animais divergentes, ou seja, linhagens que demonstraram segregação na maioria das características fenotípicas, facilitando a construção do mapa genético. Esse delineamento possibilita buscar o desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTLs ou caracterizar efeitos de gene candidato, por fazer com que novas interações intra e inter locos sejam formadas a cada geração, permitindo, especialmente na geração F2, que é altamente segregante devido a grande divergência genética existente, reavaliar os efeitos não observados ou subestimados nas gerações parentais.

Vários locos que têm influência sobre características de importância econômica para a indústria suinícola, ou QTLs, têm sido identificados. Alguns desses já estão sendo utilizados nos programas de seleção e outros estão em fase de validação, conforme relata PLASTOW (2000).

Atualmente, o mapa do genoma do suíno possui quase 5000 locos, que incluem algumas centenas de genes (ROTHSCHILD, 2004). Assim, o uso de marcadores genéticos constitui um mecanismo direto para identificação do genótipo (constituição genética) dos suínos para características de interesse.

A análise de gene candidato é uma metodologia economicamente viável e suficientemente poderosa para descobrir diferenças genéticas entre os animais para características de importância econômica (ROTHSCHILD e PLASTOW, 1999).

O primeiro passo na metodologia de estudo de genes candidatos é a escolha do gene, que, a princípio, acredita-se estar envolvido com a fisiologia da característica. Ele pode ser escolhido pelo efeito de grandes mutações, em

que a nova forma do gene estudado foi reconhecida como responsável pela alteração, ou por comparação com outras espécies que possuam um mapa genômico rico, como o de seres humanos e camundongos. Assume-se que o gene responsável por uma característica dentro de uma espécie possua seqüência com grande similaridade em outra espécie (CIB, 2003).

Há três metodologias principais para o estudo de genes candidatos: comparativa, fisiológica e posicional. Na comparativa, locos polimórficos associados a efeitos fenotípicos conhecidos em uma espécie são explorados como candidatos para variação semelhante em outra espécie. A estratégia fisiológica baseia-se em polimorfismos de genes estreitamente relacionados ao desenvolvimento da característica de interesse. Uma associação entre estes genes e o fenótipo é tida como evidência de que o gene está envolvido no controle genético da característica. A terceira metodologia, pesquisa de gene candidato posicional, se dá por meio da varredura de uma região genômica, previamente determinada, estabelecendo-se a posição do gene e associando-se a região ao efeito fenotípico estudado (CLUTTER, 1998).

Após a escolha do gene, um passo imprescindível é a obtenção de *primers* para a amplificação do gene. Em seguida, deve-se identificar polimorfismos que possam ser associados ao gene candidato. Existem vários métodos para detectar o polimorfismo de genes candidatos. O método mais usado é a Reação da Polimerase em Cadeia – Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou PCR-RFLP. Esse método tem a vantagem de ser facilmente usado em larga escala. Existem ainda a técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) – polimorfismo conformacional de fita simples – e o seqüenciamento do DNA, entretanto, esse último método é caro, não se adaptando a estudos populacionais (ROTHSCHILD e SOLLER, 1997).

Para o estudo de genes candidatos é necessário, ainda, estabelecer qual população deve ser usada para estudos de associação e quais informações fenotípicas de interesse na população serão avaliadas. As metodologias de gene candidato podem ser aplicadas para populações comerciais, dispensando o conhecimento do pedigree dos animais avaliados. Podem também ser usadas em cruzamentos de linhagens divergentes. Nesse

caso, locos de cromossomos estão envolvidos com centenas de genes. Assim, o gene candidato serve como um marcador genético na F2 no desenho de análises de ligação (ROTHSCHILD e SOLLER, 1997).

Os efeitos de genes candidatos podem ser identificados por meio de testes de associação entre os genótipos existentes e os fenótipos encontrados, examinando o efeito dos diferentes alelos sobre as diferentes características. Isso pode ser feito usando modelos lineares mistos, em que os efeitos fixos são os alelos ou os genótipos. Quando múltiplos genes candidatos são usados para uma característica, regressões múltiplas podem ser utilizadas.

A Tabela 1 apresenta alguns genes candidatos que afetam a qualidade da carne suína.

Tabela 1 — Genes candidatos que apresentam efeitos significativos sobre a qualidade de carne suína

Gene	Cromos.	Referência	Efeitos na Qualidade da Carne
Receptor Ryanodina (RYR1); Halotano – HAL	6	Fujii et al. (1991)	pH, capacidade de retenção de água, cor
Rendimento Nápole – RN; PRKAG3	15	Milan et al. (2000) Ciobanu et al. (2001)	pH, potencial de glicogênio, capacidade de retenção de água
Proteína de ligação de ácidos graxos - tecido adiposo A-FABP (FABP4)	4	Gerbens et al. (1998)	Gordura intramuscular
Proteína de ligação de ácidos graxos - coração H-FABP (FABP3)	6	Gerbens et al. (1999)	Gordura intramuscular
Família MyoD (MyoD I, Miogenina, Myf-5, Myf-6)	2 e 15	Buckingham et al. (1992) Te Pas et al. (1999)	Formação de fibras musculares
Antígeno de leucócito suíno (SLA) ou genes ligados	7	Rothschild et al.(1995) Bidanel et al. (1997)	Cheiro de cachaço; Características de carcaça

Adaptado de DEKKERS *et al.* (2001) e SILVA *et al.* (2003).

Segundo revisão de DEKKERS et al. (2001), a segregação do gene Halotano ou da PSS (Síndrome do Estresse Suíno) é conhecida há várias décadas. Enquanto a pesquisa e a seleção iniciais dos reprodutores eram feitas com base no teste do Halotano, a seleção atual usa um teste de DNA para o gene. O mesmo acontece com o gene RN ou da carne ácida, que inicialmente era pesquisado usando o teste de potencial de glicogênio. Anteriormente, achava-se que mutação RN era limitada à raça Hampshire. Entretanto, recentemente, foi verificado que vários outros alelos com efeitos sobre a qualidade de carne são segregados em outras linhagens comerciais.

Os genes da H-FABP e A-FABP (FABP3 e FABP4, respectivamente) afetam a gordura intramuscular, com impacto limitado sobre a espessura de toucinho. Isto permite a seleção para aumento da gordura intramuscular, que melhora o gosto e a maciez, sem aumentar a espessura de toucinho.

## **2.2. FABP3 ou Gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H- FABP)**

Já foram identificados oito membros da família das FABPs (Proteínas de Ligação de Ácido Graxo). Os membros dessa família incluem proteínas de ligação a lipídios do coração, fígado, intestino, íleo, adipócito, retina e mielina periférica e, de maneira mais distante, proteínas de ligação ao retinol e retinol citosólico.

A H-FABP, produto do gene *FABP3*, possui peso molecular em torno de 15 kDa e é principalmente expressa em células do músculo cardíaco e esquelético, tecidos com alta demanda de ácidos graxos, e é um membro da família das FABPs. A H-FABP representa de 4 a 8% das proteínas citoplasmáticas solúveis nos corações dos mamíferos (QIAN *et al.*, 1999).

O gene *FABP3* está localizado no cromossomo suíno seis (GERBENS *et al.*, 1999). Na Figura 1 é apresentada a representação do gene H-FABP que constitui-se de 4 éxons, intercalados por 3 íntrons e existe como cópia única por cromossomo haplóide no genoma de suíno.

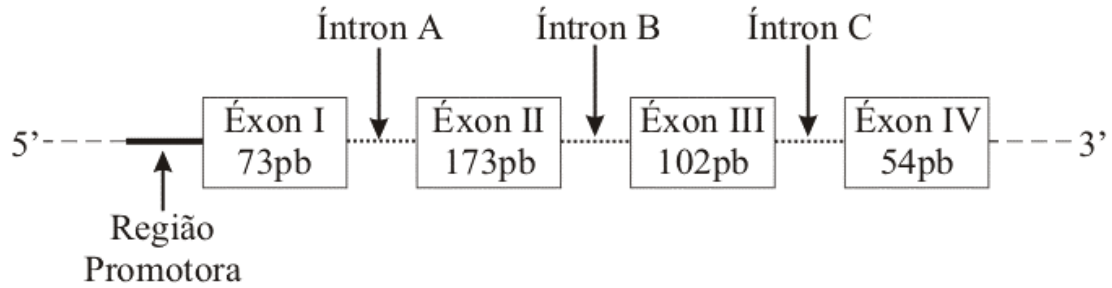


Figura 1 - Diagrama do gene FABP3. Os retângulos representam as regiões traduzidas (éxons I, II, III e IV), as linhas pontilhadas representam as regiões não transcritas (íntrons A, B e C). A região promotora é representada pela linha contínua.

Segundo VEERKAMP *et al.* (2000), ainda não estava completamente elucidado o conhecimento sobre a estrutura molecular, as propriedades de ligação, os genes e as funções dos diferentes tipos de FABPs. Acredita-se que eles estejam envolvidos no transporte de ácidos graxos no sentido de regular sua concentração, bem como de regular o metabolismo, a transdução de sinal e a transcrição gênica. Em sistemas modelos de lipossomos, monocamadas, mitocôndrias e microsossomos, foi demonstrada a transferência de ácidos graxos da FABP para membranas, de membranas para FABP e de membranas, via FABP, para membranas.

Variantes dos genes das proteínas de ligação de ácidos graxos (H-FABP e A-FABP) estão associadas à deposição de gordura intramuscular. A gordura, apesar de sua importância fisiológica, quando depositada em excesso, torna-se um problema. No entanto, a gordura intramuscular exerce grande influência na qualidade da carne, principalmente no sabor (GERBENS *et al.*, 2000), estando relacionada com características organolépticas da carne, como maciez, suculência e sabor, e sugere-se que o conteúdo ideal de gordura intramuscular para qualidade da carne seja de 2 a 3% (GERBENS *et al.*, 1998).

### 3. OBJETIVOS

Objetivou-se, neste estudo:

- Seqüenciar os éxons do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos - Coração (FABP3) de 12 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain) e 2 machos da raça nativa Piau;
- Comparar essas seqüências obtidas com a seqüência, do mesmo gene, depositada no *GenBank*;
- Relatar possíveis variações entre as duas seqüências e
- Estudar o efeito dessas variações em características quantitativas avaliadas nos animais F2.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L. The use of a Wild pig x Domestic pig intercross to map phenotypic trait loci. J. Hered., 88: 380-383, 1997.
- CIB. “Conselho de Informações sobre Biotecnologia”, <http://www.cib.org.br> (18/09/2003).
- CLUTTER, A.C. Molecular markers and pig breeding programs. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2, Uberaba, 1998. *Anais ... Uberaba: SBMA, 1998.*
- DEKKERS, J. C.M.; ROTHSCCHILD, M. F.; MALEK, M. M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. USA, II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, Via Internet. 2001.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira - ANUALPEC. São Paulo: 2003. 400p.
- FREITAS, R.T.F. Perspectiva do melhoramento de suínos no Brasil. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Belo Horizonte, 2000. *Anais... Belo Horizonte: SBMA, p.105-109, 2000.*
- GERBENS, F.; DE KONING, D.J.; HARDERS, F.L.; MEUWISSEN, T.H.; JANS, L.L.; GROENEN, M.A.; VEERKAMP, J.H.; VAN ARENDONK, J.A.;

- TE PAS, M.F. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J. Anim. Sci.*, 78:552-559, 2000
- GERBENS, F.; JANSEN, A.; VAN ERP, A.J.; HARDERS, F.; MEUWISSEN, T.H.; RETTENBERGER, G.; VEERKAMP, J.H.; TE PAS, M.F. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm. Genome*, 9:1022-1026, 1998.
- GERBENS, F.; VAN ERP, A.J.; HARDERS, F.L.; VERBURG, F.J.; MEUWISSEN, T.H.; VEERKAMP, J.H.; TE PAS, M.F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *J. Anim. Sci.*, 77:846-852, 1999.
- PLASTOW, G.S. Molecular genetics in the swine industry. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Belo horizonte, 2000. *Anais...* Belo Horizonte: SBMA, p.21-30, 2000.
- QIAN, Q.; KUO, L.; YU, Y.T.; ROTTMAN, J. N. A Concise Promoter Region of the Heart Fatty Acid-Binding Protein Gene Dictates Tissue-Appropriate Expression. *Circ. Res.*, 84:276-289, 1999.
- ROTHSCHILD MF. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genet. Res.*, 83:1-6, 2004.
- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G.S. Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*, 1:1-7, 1999.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe*, 8:13-20, 1997.
- SILVA, M.V., LOPES, P.S., GUIMARÃES, S.E., TORRES, R.A. Utilização de marcadores genéticos em suínos. II. Características de desempenho e de qualidade da carne. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 11:11-20, 2003.

VEERKAMP, J.H.; VAN MOERKERK, H.T.B.; ZIMMERMAN, A.W.. Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport. Studies on different types and mutant proteins. *Eur. J. Biochem.*, 267:5959-5966, 2000.

## **CAPÍTULO 1 – Seqüenciamento do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H-FABP) em suínos de raças divergentes**

**Resumo** – O gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração foi seqüenciado em animais parentais de um cruzamento F2 entre varrões da raça Piau e fêmeas comerciais (Large White x Landrace x Pietrain) para se detectar variantes alélicas do gene. Os animais tiveram seu DNA extraído de células brancas do sangue e amplificado por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Os *primers* usados na reação foram desenhados para amplificar os quatro éxons do gene. Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em sequenciador automático ABI PRISM 310 (Applied biosystems). Os fragmentos gerados foram comparados com a seqüência do gene depositada no *GenBank*. Foram verificadas divergências entre as seqüências geradas e as do *GenBank*, tanto em alguns animais Piau quanto em algumas fêmeas comerciais. Essas alterações podem ser utilizadas como marcas para associações dos polimorfismos desse gene, com características de interesse econômico. Construiu-se um mapa de restrição, permitindo a identificação de enzimas que reconhecessem as alterações nas seqüências analisadas.

Palavras-chave: cruzamento divergente, FABP3, gene candidato, genética, melhoramento animal, polimorfismo

## **CHAPTER 1 – Sequencing of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP) gene in swine of divergent breeds**

**Abstract** – The Heart Fatty Acid Binding Protein gene was sequenced in parental animals of a F2 crossing between boars of Brazilian native breed Piau and commercial sows (Landrace x Large White x Pietrain). The DNA of the animals was extracted from white cells of blood and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Primers used in the reaction were constructed to amplify the exons of the gene. The PCR products were sequenced in ABI PRISM 310 (Applied biosystems). The sequences were compared with the sequence of the gene deposited in the GenBank. Divergences between the generated sequences and the GenBank sequences were verified in both genetic groups. A restriction map was constructed allowing the identification of enzymes that recognize the alterations in the analyzed sequences.

Key Words: outbred cross, FABP3, gene candidate, genetic, animal breeding, polymorphism

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com SANCEVERO e ANTUNES (1998), a seleção de animais a partir de dados fenotípicos mensurados antes e após o abate tem proporcionado um aumento no rendimento de carne na carcaça dos suínos.

A informação obtida por estudos moleculares, associada aos métodos tradicionais de seleção, pode aumentar a acurácia da seleção e, conseqüentemente, resultar em uma maior resposta à seleção. Em geral, a seleção assistida por marcadores (MAS) é mais vantajosa em características com baixa herdabilidade, limitadas pelo sexo ou, ainda, características difíceis de serem mensuradas fenotipicamente.

Como principais passos no estudo de genes candidatos, ROTHSCHILD e SOLLER (1997) enumeram: 1) escolha dos genes, com base no conhecimento prévio do sistema biológico que se pretende pesquisar; 2) obtenção dos primers para amplificar o gene; 3) busca dos polimorfismos. Segundo os autores, haplótipos intragênicos compostos por várias mutações neutras tendem a estar em forte desequilíbrio de ligação com variantes alélicas funcionais nos sítios determinando variação funcional no gene. Conseqüentemente, polimorfismos encontrados dentro do gene e em suas seqüências regulatórias são úteis para análise de genes candidatos, independente se são os sítios funcionais ou não.

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados é considerado como uma das principais e melhores técnicas para detecção de polimorfismos.

A Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração (H-FABP) é da família das FABPs e possui peso molecular em torno de 15 kDa, sendo principalmente expressa em células do músculo cardíaco e esquelético, tecidos com alta demanda de ácidos graxos. O gene da H-FABP está localizado no cromossomo suíno seis e constitui-se de 4 éxons, intercalados por 3 íntrons. Acredita-se que variantes dos genes da H-FABP estejam associadas à deposição de gordura intramuscular (QIAN *et al.*, 1999), assim como às características de desempenho e de carcaça. Assim, o gene da H-FABP pode ser considerado como gene candidato para aplicação direta em programas de melhoramento de suínos.

Foram seqüenciados os éxons do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração em suínos da raça Piau e matrizes comerciais para se detectar polimorfismos nesse gene.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local e animais

Neste trabalho, foram analisadas amostras de DNA de 14 animais (12 fêmeas comerciais e dois varrões da raça nativa brasileira Piau) da espécie suína.

As fêmeas, originadas de linhagem desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo acasalamento de animais das raças comerciais Landrace x Large White x Pietrain e selecionadas para características de desempenho, pertenciam a Granja de Melhoramento Genético de Suínos da UFV.

O processamento das amostras de DNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da UFV, em Viçosa, MG, Brasil, no período de janeiro a dezembro de 2003. A cidade de Viçosa está localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e tem como coordenadas geográficas de posição 20°45'20" de latitude sul e 45°52'40" de longitude oeste de Greenwich e altitude de 657m.

### 2.2. Extração, quantificação e diluição do DNA

O protocolo de extração das amostras de DNA, que estavam prontas para uso, será descrito a seguir.

O sangue de cada animal foi coletado por meio de punção venosa do *sinus orbitalis*, por gotejamento em tubos estéreis contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração de 0,5 M e pH 8,0. As amostras foram centrifugadas a 958,69 G durante 15 minutos. A camada de células brancas foi isolada e, a partir desta, procedeu-se à extração do DNA genômico, realizada por purificação com fenol - clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por SAMBROOK et al. (1989). O DNA foi armazenado em tris-EDTA, em freezer a -20 C.

### 2.3. Construção dos *primers*

Os *primers* foram construídos usando o programa encontrado no site <http://alces.med.umn.edu/websub.html>, utilizando-se as seqüências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>), sob os códigos

de acesso X98558 (para o éxon I), Y16180 (éxons II e III) e Y16181 (éxon IV), como base.

Os conjuntos de *primers* foram construídos para gerarem fragmentos menores que 600 pb. Foram necessários quatro conjuntos de *primers* para amplificar todo o fragmento desejado. Na Tabela 1 está a descrição dos *primers* que foram usados.

Tabela 1 – Conjunto de *primers* utilizados para cada região do gene FABP3

Região	Primer	Seqüência	Ta (°C)	Tamanho esperado (pb)
Éxon I	HFABP1-F	GGAGGGACCAGGAAACCGAAG	60	478
	HFABP1-R	CAGCCCAACATCCCGAGTCGT	60	
Éxon II	HFABP2-F	CGGGTCTGTTCCAGCTTGTAC	60	345
	HFABP2-R	CACTGCACAGGCTTTAGGGAC	60	
Éxon III	HFABP3-F	TGGGCATCCCCTGGAGTATAG	60	534
	HFABP3-R	TTGCCTCCACCCTCCACTATC	60	
Éxon IV	HFABP4-F	TGGCATGTAGTAGGTAGTAAATGA	58	345
	HFABP4-R	CATACACAACAAGAACCGGAACT	58	

Ta=Temperatura de anelamento  
pb=pares de base

## 2.4. Amplificação

As amplificações foram realizadas no LABTEC, a partir do DNA extraído do sangue dos animais parentais, em termocicladores MJ Research PTC 100-96<sup>®</sup>, sendo os sistemas constituídos de 1U de Taq polimerase; 0,2mM de dNTPs; 0,2µM de cada *primers* (*forward e reverse*); 20mM de TRIS-HCl pH8,3; 50mM de KCl; 2 a 4mM de MgCl<sub>2</sub> e 25ng de DNA genômico por reação, num volume final de 20 µL. Para o seqüenciamento um volume final de 100 µL era necessário para cada amostra.

Os programas de amplificação basicamente possuíam os seguintes passos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos primers a 60 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C durante 1 minuto. Repetição por 30 a 35 vezes, de acordo com cada par de *primer* e extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final das amplificações, os produtos permaneciam estocados a 4°C até o momento da eletroforese, em géis de poliacrilamida a 8%.

## 2.5. Purificação e quantificação dos fragmentos amplificados

Para purificação e quantificação dos fragmentos amplificados, o seguinte protocolo fornecido pelo kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech) foi seguido:

1. Adicionou-se 500µL de *Capture Buffer* e 100µL do produto de PCR à coluna GFX sobre o tubo coletor;
2. Homogeneizou-se cuidadosamente com uma pipeta;
3. Centrifugou-se a coluna com o tubo coletor a 13.000 rpm durante 30 segundos;
4. Após a centrifugação, descartou-se o efluente do tubo coletor e este foi novamente encaixado na coluna;
5. Adicionou-se à coluna 500µL de *Wash Buffer* (10mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA);
6. Centrifugou-se a coluna com o tubo coletor a 13.000 rpm por 30 segundos;
7. Descartou-se o tubo coletor e transferiu-se a coluna para um tubo eppendorf identificado;
8. Adicionou-se no topo da matriz da coluna 15µL de água Mili-Q autoclavada;
9. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 5 minutos;
10. Centrifugou-se as amostras a 13.000rpm durante 3 minutos;
11. Quantificou-se em espectrofotômetro;
12. Diluiu-se de acordo com o volume da reação de seqüenciamento.

## 2.6. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Esta etapa permitiu que se detectassem polimorfismos nos fragmentos amplificados.

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídios (ddNTPs). O DNA foi seqüenciado utilizando-se o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems). Para isso, de 200 a 500ng do DNA amplificado foram empregados em uma reação contendo 4µL de *mix*, fornecido no kit de seqüenciamento, 5,0 pmoles do *primer forward* e 6 µL de tampão (200 mmoles Tris-HCl pH9,0; 5 mmoles MgCl<sub>2</sub>) em um volume total de reação de 20 µL. Preparou-se um *mix* semelhante para o *primer reverse*.

O seqüenciamento das amostras de DNA dos machos foram feitas isoladamente. Entretanto, para as fêmeas, amostras de DNA foram agrupadas

em *mix* de DNA, de acordo com o grupo genético, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Identificação das matrizes e varrões (Geração Parental)

Grupo Genético	Categoria	Identificação
Comercial 1	matriz	22, 25, 90 e 80
Comercial 2	matriz	69, 127, 130 e 133
Comercial 3	matriz	147, 159, 160 e 175
Piau	varrão	J e C

As leituras das seqüências foram feitas no Seqüenciador Automático ABI PRISM 310.

## 2.7. Análises das seqüências

As seqüências dos quatro fragmentos analisados do gene FABP3, foram alinhadas, por meio do programa para alinhamento de seqüências múltiplas CLUSTAL X (1.83), com a seqüência publicada no *GenBank*, números de acesso X98558 (para o éxon I), Y16180 (éxons II e III) e Y16181 (éxon IV), as quais foram tomadas como referência para identificação de cada base no gene.

Em seguida, as amostras foram submetidas à análise de fragmentos, para a detecção de polimorfismo entre elas e montagem do mapa de restrição, por meio do programa Webcutter 2.0, disponível em <http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html>, que forneceu uma série de enzimas que reconheceram alguns dos polimorfismos detectados e que poderiam ser utilizadas em estudos subseqüentes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os fragmentos do gene FABP3 amplificaram com especificidade e com bom rendimento nas condições de PCR utilizadas neste estudo. Os tamanhos dos fragmentos amplificados corresponderam aos esperados quando os pesos das bandas foram comparados em gel de poliacrilamida a 8%.

Na Figura 1, está apresentado o gel de poliacrilamida com as bandas referentes a amplificação do fragmento I do DNA de alguns animais analisados.

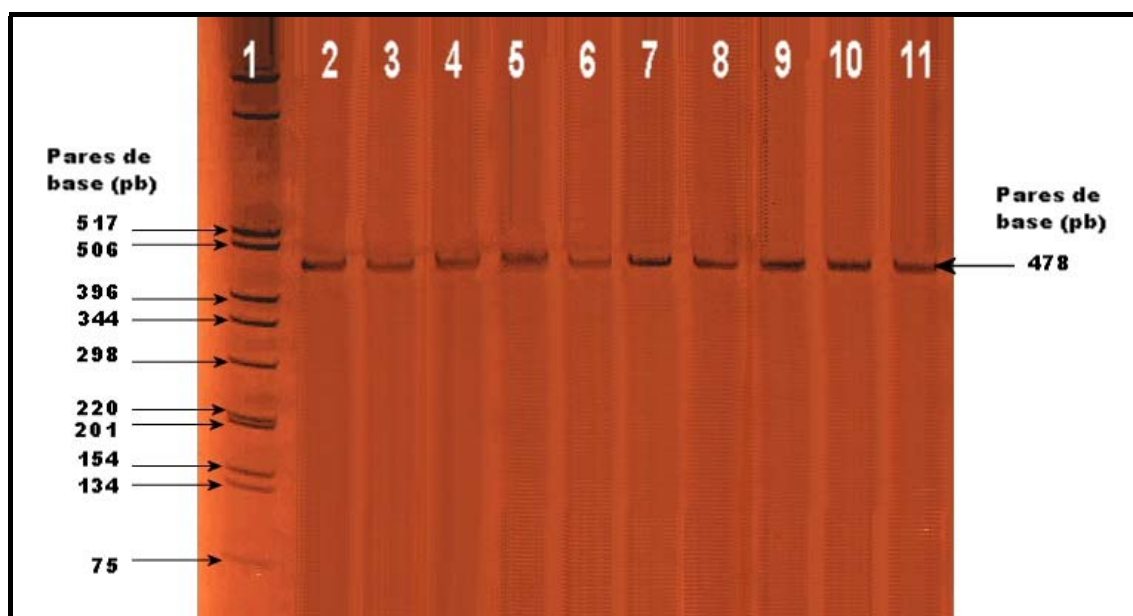


Figura 1 – Amplificação do fragmento I do gene FABP3 em suínos. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata a 0,2%. A canaleta 1 representa o padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen). As colunas numeradas de 2 a 9 são amostras de DNA amplificado de matrizes da geração parental. As canaletas 10 e 11 correspondem a amostras do DNA amplificado dos varrões C e J, respectivamente.

O seqüenciamento automático dos fragmentos de DNA gerou fenogramas, como os que são mostrados na Figura 2, de onde se extraíram as seqüências que foram editadas individualmente e montadas em contíguos.

Na Figura 2, pode-se notar uma diferença entre as seqüências dos dois animais. O Animal 1 (macho C) possui a base nitrogenada Guanina (G) na posição 90 e o macho J (animal 2) possui uma Adenina (A). Essa diferença, assim como as outras detectadas, possibilitam estudos de associação de polimorfismos com características quantitativas.

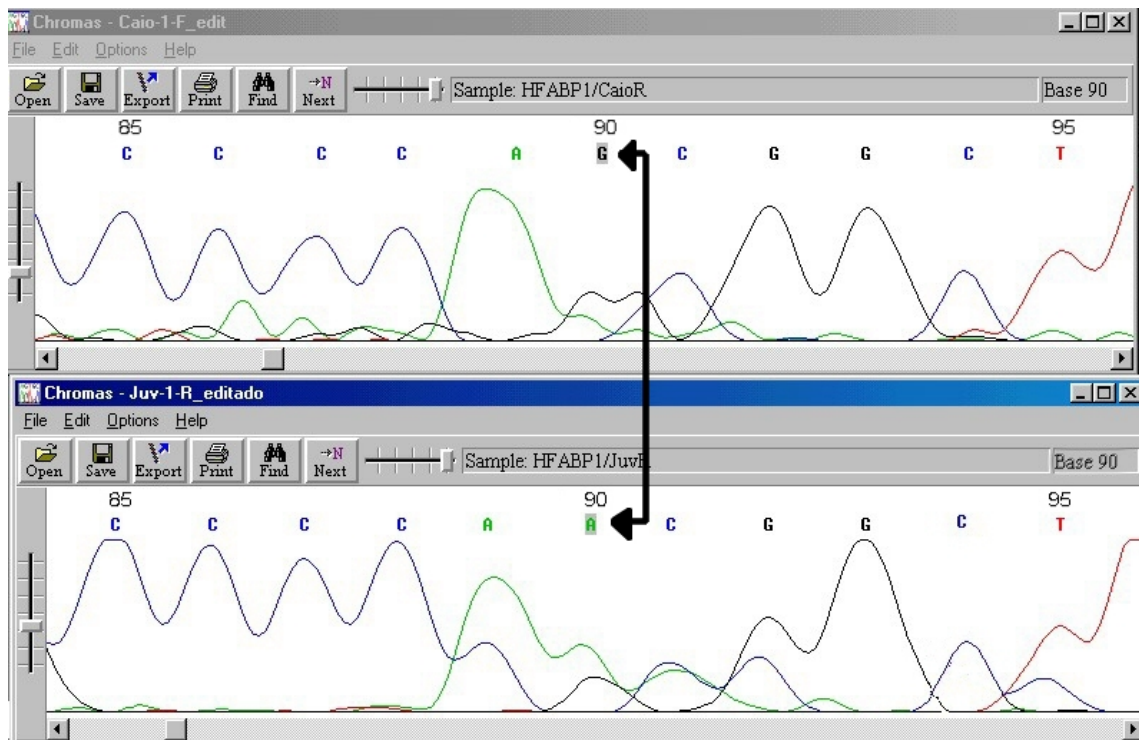


Figura 2 – Fenogramas obtidos pelo seqüenciamento automático. Os dois gráficos são referentes aos dois varrões utilizados como pais (geração parental), o primeiro referente ao macho C e o segundo ao macho J. Os gráficos mostram as seqüências das bases nitrogenadas dos fragmentos analisados. Cada base é representada por um pico no fenograma onde a base Adenina (A) é representada pela cor verde, Timina (T) pela vermelha, Citosina (C) pela cor azul e a Guanina (G) pela cor preta. Os números que aparecem acima de algumas bases indicam as posições das referidas bases nas seqüências analisadas. A seta mostra divergência entre as seqüências dos dois machos analisados, sendo que para o macho C existe uma base Guanina (G) na posição 90 e para o macho J a base existente é uma Adenina (A).

Nas Figuras 3, 4, 5 e 6 são apresentados os alinhamentos dos fragmentos I, II, III e IV, respectivamente. A seqüência de referência do gene FABP3 aparece completa no topo de cada conjunto. As seqüências logo abaixo se referem aos fragmentos analisados do gene nos dois varrões (J e C) e as demais seqüências, aos dos grupos de matrizes comerciais.

Nas seqüências de bases geradas por esse estudo foram observadas divergências em relação às seqüências padrões e também ocorreram mudanças de bases entre os animais de raças diferentes, concordando com os resultados obtidos por NECHTELBERGER *et al.* (2001) que estudaram polimorfismos no gene FABP3 em populações de raças suínas nativas austríacas.

Algumas diferenças mostradas na Figura 3, 4, 5 e 6 não foram consideradas por estarem muito nas extremidades das seqüências, em que a precisão do seqüenciamento não é suficientemente considerável.

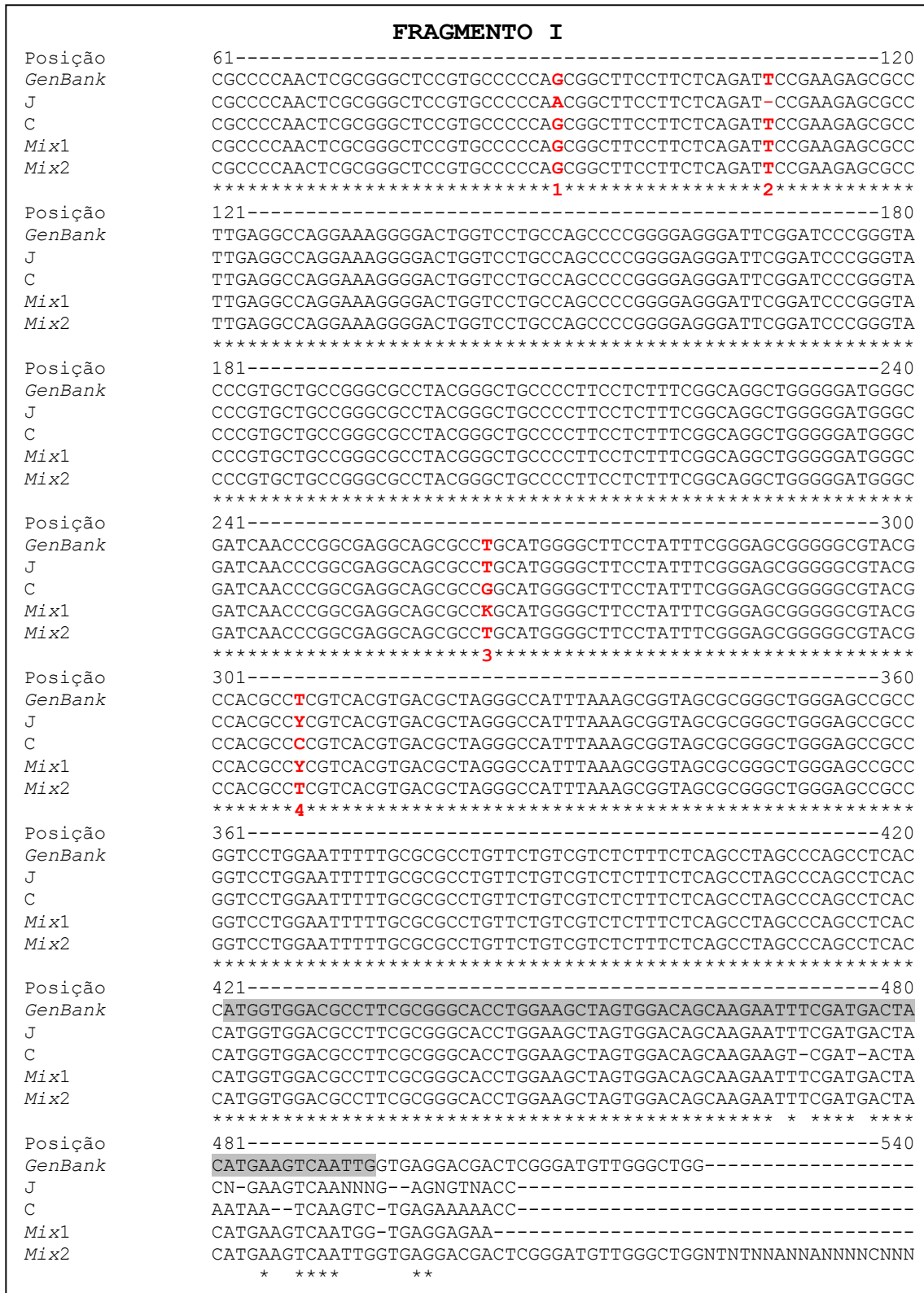


Figura 3 – Alinhamento da seqüência referência (*GenBank*) com as seqüências dos dois machos, C e J, e dos grupos de fêmeas (*mix 1* e *mix 2*) obtidas para o fragmento I do gene *FABP3*. Os polimorfismos encontrados estão indicados pela cor vermelha. A região referente ao éxon I está indicada pela hachura. Os asteriscos indicam homologia entre as seqüências e os números representam a identificação do polimorfismo. A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, G=Guanina, Y=C ou T, K=T ou G.

## FRAGMENTO II

```

Posição      1-----60
GenBank      -----TGCCGGGTCTG-TTCCAGCTTGACTCATAACCTTCCCTCTGCCCTCAGGTG
J            NNNNNNNNNNTCGGGTCTNGTTCCAGCTTGACTCATAACCTTCC-TCTGCCCTCAGGTG
Mix1        --GNNANTANTCGGGTCTG-TTCCAGCTTGACTCATAACCTTCCCTCTGCCCTCAGGTG
Mix2        -----TNNTCGGGTCTTGTTCCAGCTTGACTCATAACCTTCCCTCTGCCCTCAGGTG
Mix3        TNNNANAAGNTCGGGTCTG-TTCCAGCTTGACTCATAACCTTCCCTCTGCCCTCAGGTG
                *****  *****1*****

Posição      61-----120
GenBank      TGGGTTTTGCCACCAGGCAGGTGGCCAACATGACCAAGCCTACCACAATCATCGAAGTGA
J            TGGGTTTTGCCACCAGGCAGGTGGCCAACATGACCAAGCCTACCACAATCATCGAAGTGA
Mix1        TGGGTTTTGCCACCAGGCAGGTGGCCAACATGACCAAGCCTACCACAATCATCGAAGTGA
Mix2        TGGGTTTTGCCACCAGGCAGGTGGCCAACATGACCAAGCCTACCACAATCATCGAAGTGA
Mix3        TGGGTTTTGCCACCAGGCAGGTGGCCAACATGACCAAGCCTACCACAATCATCGAAGTGA
                *****

Posição      121-----180
GenBank      ATGGGGACACAATCATCATAAAAAACACAAAGCACCTTCAAGAGCACAGAGATCAGCTTCA
J            ATGGGGACACAATCATCATAAAAAACACAAAGCACCTTCAAGAGCACAGAGATCAGCTTCA
Mix1        ATGGGGACACAATCAYCATAAAAAACACAAAGCACCTTCAAGAGCACAGAGATCAGCTTCA
Mix2        ATGGGGACACAATCATCATAAAAAACACAAAGCACCTTCAAGAGCACAGAGATCAGCTTCA
Mix3        ATGGGGACACAATCAYCATAAAAAACACAAAGCACCTTCAAGAGCACAGAGATCAGCTTCA
                *****2*****

Posição      181-----240
GenBank      AGCTGGGAGTGGAGTTTGATGAGACAACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAGGTGAGTTGAG
J            AGCTGGGAGTGGAGTTTGATGAGACAACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAGGTGAGTTGAG
Mix1        AGCTGGGAGTGGAGTTTGATGAGACAACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAGGTGAGTTGAG
Mix2        AGCTGGGAGTGGAGTTTGATGAGACAACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAGGTGAGTTGAG
Mix3        AGCTGGGAGTGGAGTTTGATGAGACAACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAGGTGAGTTGAG
                *****

Posição      241-----300
GenBank      GGAAGTGTACAGGGAATGAAAGTCCCTGAAGGGGAATAGGATGGCACCCCTATTATTGCA
J            GGAAGTGTACAGGGAATGRAAGTCCCTGAAGGGGAATAGGATGGCACCCCTATTATTGCA
Mix1        GGAAGTGTACAGGGAATGRAAGTCCCTGAAGGGGAATAGGATGGCACCCCTATTATTGCA
Mix2        GGAAGTGTACAGGGAATGAAAGTCCCTGAAGGGGAATAGGATGGCACCCCTATTATTGCA
Mix3        GGAAGTGTACAGGGAATGAAAGTCCCTGAAGGGGAATAGGATGGCACCCCTATTATTGCA
                *****3*****

Posição      301-----360
GenBank      CCTTGAGGGGTAGGATGTTATGAGGAATTGAAACAAAGTCCCTAAAGCCTGTGCAGTG--
J            CCTTGAGGGGTAGGATGTTATGAGGAATTGAAACAAA-----
Mix1        CCTTGAGGGGTAGGATGTTATGAGGAATTGAAACAAA-----
Mix2        CCTTGAGGGGTAGGATGTTATGAGGAATTGAAACAAA-----
Mix3        CCTTGAGGGGTAGGATGTTATGAGGAATTGAAACAAA-----
                *****
    
```

Figura 4 – Alinhamento da seqüência referência (*GenBank*) com as seqüências do macho J e dos grupos de fêmeas (*mix 1*, *mix 2* e *mix 3*) obtidas para o fragmento II do gene FABP3. Os polimorfismos encontrados estão indicados pela cor verde. A região referente ao éxon II está indicada pela hachura. Os asteriscos indicam homologia entre as seqüências e os números representam a identificação do polimorfismo. A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, G=Guanina, Y=C ou T, R=A ou T.

**FRAGMENTO III**

Posição	1-----60
GenBank	-TGGGCATCCCCTGGAGTATAGGATAAAGTGCCCATCTTGAAGGCTGGTGGCACTTCTCTA
J	NTGGGCATCCCCTGGAGTATAGGATAAAGTGCCCATCTTGAAGGCTGGTGGCACTTCTCTA
C	TTGGGCATCCCCTGGAGTATAGGATAAAGTGCCCATCTTGAAGGCTGGTGGCACTTCTCTA
Mix1	NTGGGCATCCCCTGGAGTATAGGATAAAGTGCCCATCTTGAAGGCTGGTGGCACTTCTCTA
Mix3	NTGGGCATCCCCTGGAGTATAGGATAAAGTGCCCATCTTGAAGGCTGGTGGCACTTCTCTA *****
Posição	61-----120
GenBank	GCTGGGCTGTCTGACTCTACCATATTGTCCACCTCTCCCTCCCTGCCAGCACCTGAAGG
J	GCTGGGCTGTCTGACTCTACCATATTGTCCACCTCTCCCTCCCTGCCAGCACCTGAAGG
C	GCTGGGCTGTCTGACTCTACCATATTGTCCACCTCTCCCTCCCTGCCAGCACCTGAAGG
Mix1	GCTGGGCTGTCTGACTCTACCATATTGTCCACCTCTCCCTCCCTGCCAGCACCTGAAGG
Mix3	GCTGGGCTGTCTGACTCTACCATATTGTCCACCTCTCCCTCCCTGCCAGCACCTGAAGG *****
Posição	121-----180
GenBank	CCCCTCCCCCACCAGCAGCAGTGGTGAACCTACACCTCCCATGGGGTAGCTTGAAGGT
J	CCCCTCCCCCACCAGCAGCAGTGGTGAACCTACACCTCCCATGGGGYTAGCTTGAAGGT
C	CCCCTCCCCCACCAGCAGCAGTGGTGAACCTACACCTCCCATGGGGCTAGCTTGAAGGT
Mix1	CCCCTCCCCCACCAGCAGCAGTGGTGAACCTACACCTCCCATGGGGTAGCTTGAAGGT
Mix3	CCCCTCCCCCACCAGCAGCAGTGGTGAACCTACACCTCCCATGGGGTAGCTTGAAGGT *****1*****
Posição	181-----240
GenBank	GGGCTACCTGAGCTCTGGTCTAGCACCATCAACAGTTTAGGTTAGAGGCTGAGTCTGCT
J	GGGCTACCTGAGCTCTGGTCTAGCACCATCAACAGTTTAGGTTAGAGGCTGAGTCTGCT
C	GGGCTACCTGAGCTCTGGTCTAGCACCATCAACAGTTTAGGTTAGAGGCTGAGTCTGCT
Mix1	GGGCTACCTGAGCTCTGGTCTAGCACCATCAACAGTTTAGGTTAGAGGCTGAGTCTGCT
Mix3	GGGCTACCTGAGCTCTGGTCTAGCACCATCAACAGTTTAGGTTAGAGGCTGAGTCTGCT *****
Posição	241-----300
GenBank	GTGGCCAGAGTGACCAGACACCCCTTCCTGTCCCTCAATCCAGCTCAGGCCTCTACCC
J	GTGGCCAGAGTGACCAGACACCCCTTCCTGTCCCTCAATCCAGCTCAGGCCTCTACCC
C	GTGGCCAGAGTGACCAGACACCCCTTCCTGTCCCTCAATCCAGCTCAGGCCTCTACCC
Mix1	GTGGCCAGAGTGACCAGACACCCCTTCCTGTCCCTCAATCCAGCTCAGGCCTCTACCC
Mix3	GTGGCCAGAGTGACCAGACACCCCTTCCTGTCCCTCAATCCAGCTCAGGCCTCTACCC *****
Posição	301-----360
GenBank	TCTTTCCACAGTCCATTGTGACACTGGATGGAGGCAAACCTGTCCACCTGCAGAAGTGGA
J	TCTTTCCACAGTCCATTGTGACACTGGATGGAGGCAAACCTGTCCACCTGCAGAAGTGGA
C	TCTTTCCACAGTCCATTGTGACACTGGATGGAGGCAAACCTGTCCACCTGCAGAAGTGGA
Mix1	TCTTTCCACAGTCCATTGTGACACTGGATGGAGGCAAACCTGTCCACCTGCAGAAGTGGA
Mix3	TCTTTCCACAGTCCATTGTGACACTGGATGGAGGCAAACCTGTCCACCTGCAGAAGTGGA *****
Posição	361-----420
GenBank	ATGGACAAGAGACAACGCTTGTTCGGGAAC TAGTTGATGGGAAACTCATCCTGGTAAGAT
J	ATGGACAAGAGACAACGCTTGTTCGGGAAC TAGTTGATGGGAAACTCATCCTGGTAAGAT
C	ATGGACAAGAGACAACGCTTGTTCGGGAAC TAGTTGATGGGAAACTCATCCTGGTAAGAT
Mix1	ATGGACAAGAGACAACGCTTGTTCGGGAAC TAGTTGATGGGAAACTCATCCTGGTAAGAT
Mix3	ATGGACAAGAGACAACGCTTGTTCGGGAAC TAGTTGATGGGAAACTCATCCTGGTAAGAT *****

Figura 5 – Alinhamento da seqüência referência (*GenBank*) com as seqüências dos macho C e J e dos grupos de fêmeas (*mix 1* e *mix 3*) obtidas para o fragmento III do gene *FABP3*. Os polimorfismos encontrados estão indicados pela cor azul. A região referente ao éxon III está indicada pela hachura. Os asteriscos indicam homologia entre as seqüências e os números representam a identificação do polimorfismo. A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, G=Guanina, Y=C ou T.

**FRAGMENTO IV**

```

Posição      1-----60
GenBank      -----CTGGCATGTAGTAGGTAGTAAATGACGAT-ATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
J            NNNNNNTGGGNANNNNANNNNGNNNTAAATNNGNATATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
C            -----TGACGATTATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
Mix1        -----NCGATTATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
Mix2        -----ACGATTATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
Mix3        -----GNTTGGCATGTAGTAGGTAGTAAATGATGATTATTAGCATGAAGGTAGAGGGCTT
                *      *****

Posição      61-----120
GenBank      TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGCCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
J            TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGCCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
C            TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGTCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
Mix1        TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGYCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
Mix2        TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGCCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
Mix3        TCCCCGGCAGAGTGAAGAGTGTCCCAGTACCTTCTGTGYCCCTTACCCCTGCCCTAATCT
                *****1*****

Posição      121-----180
GenBank      GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
J            GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
C            GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
Mix1        GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
Mix2        GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
Mix3        GACCCTCTTTTATTCCAGACACTCACCCATGGCAGTGCAGTTTGCACTCGCACTTACGAG
                *****

Posição      181-----240
GenBank      AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
J            AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
C            AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
Mix1        AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
Mix2        AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
Mix3        AAAGAGGCATGACCTGCCCATCCCTTCGACTGTTCTGCCAATTGGCTACTCCTGGACTC
                *****

Posição      241-----300
GenBank      AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
J            AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
C            AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
Mix1        AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
Mix2        AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
Mix3        AGCACCAGATTGCCTCATTTTTTCTCTGGCATTGTTGTAATAATCTACTTTGGGGATATT
                *****

Posição      301-----360
GenBank      CTCCTGGGGTCAGGTTGCACCAGCCTGCGTTCAGTTCCGGTTCCTTGTTGTGTATGTTT--
J            CTCCTGGGGTCAGGTTGCACCAGCGTGCGTTCAGT-----
C            CTCCTGGGGTCAGGTTGCACCAGCCTGCGTTCAGTTCCGGTTCCTTGTTGTGTATGGGNCCN
Mix1        CTCCTGGGGTCAGGTTGCACCAGCCTGCGTTCAGTTCCGGTTCCTTGTTGTGTATGANNNN
Mix2        CTCCTGGGGTCAGGTTGCACCAGCCTGCGTTCAGTTCCGGTTCCTTGTTGTGTATGANNNN
Mix3        CTCSTGGGGTCAGGTTGCACCAGCCTGCGTTC-----
                ***2*****3*****4*****
    
```

Figura 6 – Alinhamento da seqüência referência (*GenBank*) com as seqüências dos machos C e J e dos grupos de fêmeas (*mix 1*, *mix 2* e *mix 3*) obtidas para o fragmento IV do gene FABP3. Os polimorfismos encontrados estão indicados pelo sublinhado. A região referente ao éxon IV está indicada pela hachura. Os asteriscos indicam homologia entre as seqüências e os números representam a identificação do polimorfismo. A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, G=Guanina, Y=C ou T, S=C ou G.

O seqüenciamento de alguns fragmentos para alguns animais não foi conclusivo. Fatores que justificam essas falhas são problemas que podem ter ocorrido na reação de amplificação, não gerando quantidade suficiente de produto para a reação de seqüenciamento, ou problemas na própria reação de seqüenciamento, desde os processos de purificação das amostras até mesmo na leitura do material pelo equipamento.

As mutações verificadas nas seqüências de nucleotídeos do gene FABP3 nos varrões e matrizes, que alteraram sítios de restrição de enzimas, são apresentadas na Tabela 3.

Algumas mutações foram detectadas apenas em um dos machos, o que pode significar que processos de seleção eliminaram a mutação nas linhagens comerciais. Outras mutações, porém, foram encontradas nas fêmeas comerciais, o que pode significar que a mutação foi selecionada ou é neutra. Provavelmente esses polimorfismos estejam associados às diferenças fenotípicas favoráveis (mutações selecionadas) ou desfavoráveis (mutações descartadas no processo de seleção) para os sistemas de produção de suínos.

Como apresentado na Tabela 3, as diferenças encontradas possibilitaram a construção de mapas de restrição para análise com enzimas de restrição que permitem a distinção destes polimorfismos nas gerações filiais.

As enzimas apresentadas na Tabela 3 reconhecem os sítios específicos que surgiram com a mutação encontrada. Como exemplo, a enzima *Hinf* I reconhece o sítio de restrição na posição 108 do fragmento I, caracterizado pela presença da base Timina (T) na posição citada. Durante a reação de digestão com a *Hinf* I, o fragmento que possui esse sítio é clivado nessa região, o que não ocorre quando há a perda do sítio (deleção da base nitrogenada Timina). Isso gera padrões de bandas diferentes que podem ser visualizados em gel de poliacrilamida corados com nitrato de prata.

Tabela 3 – Polimorfismos detectados nas seqüências de nucleotídeos do gene FABP3 dos varrões e *mix* de matrizes

Fragmento	Posição	Polimorfismo	Animal/Grupo	Enzima
I	90	G→A	J	<i>Fnu</i> DII e <i>Nsp</i> BII
	108	T→ –	J	<i>Dpn</i> I, <i>Hinf</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Tfi</i> I e <i>Xho</i> II
	264	T→G K	C <i>Mix</i> 1	<i>Alw</i> NI, <i>Cfr</i> 10I, <i>Cvi</i> RI, <i>Msp</i> I e <i>Nae</i> I
	308	T→C Y	C J e <i>Mix</i> 1	*
II	46	C→ –	J	*
	136	Y	<i>Mix</i> 1 e <i>Mix</i> 3	*
	260	A/G R	J e <i>Mix</i> 1 <i>Mix</i> 3	*
III	168	T→C Y	C e <i>Mix</i> 3 J	<i>Cac</i> 8I, <i>Cvi</i> JI, <i>Mae</i> I e <i>Nhe</i> I
		100	C→T Y	C <i>Mix</i> 1 e <i>Mix</i> 3
IV	304	S	<i>Mix</i> 3	<i>Eco</i> RII, <i>Scr</i> FI e <i>Sec</i> I
	316	T→ –	<i>Mix</i> 3	<i>Apa</i> LI, <i>Bsi</i> HKAI e <i>Sdu</i> I
	325	C→G	J	<i>Cvi</i> JI e <i>Msl</i> I

\* Nenhuma enzima foi encontrada.

A=Adenina, T=Timina, C=Citosina, G=Guanina, Y=C ou T, K=T ou G, R=A ou T, S=C ou G.

As setas indicam mudança e o traço, deleção de base nitrogenada, respectivamente.

Os resultados obtidos por LIN *et al.* (2002), em estudo com 561 suínos das raças Duroc, Landrace, Yorkshire, Nanchang white pig, Erhualian, Meishan, Yushan black pig, Leping spotted pig, Jinhua black head-hind pig e Shanggao black head-hind pig, mostraram variações nos sítios de restrição para *Hinf* I-RFLP, *Hae* III-RFLP e *Msp* I-RFLP neste mesmo gene, embora os autores não especifiquem a posição das mutações.

Apenas o polimorfismo 2 do fragmento II – posição 136 – foi detectado em região de éxon (Figura 4), entretanto, nenhuma enzima reconhecadora desse sítio polimórfico foi encontrada, como apresentado na Tabela 3.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os polimorfismos detectados a partir da amplificação e seqüenciamento dos fragmentos do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração, mesmo aqueles que não se encontram em regiões de éxon, possibilitaram a construção de um mapa de restrição onde enzimas específicas reconhecem as diferentes formas alélicas do gene. Desta forma, os polimorfismos poderão ser usados para estudar a associação do gene com características de importância econômica em suínos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KINGHORN, B., ARENONK, J., HETZEL, J. Detection and use of principal gene in animal breeding. *Ag. Biol. News Info.*, 6:297-302, 1994.
- LIN W.H.; HUANG, L.S.; REN, J.; DENG, S.H.; WANG, W.J.; LIU, B.S.; ZHOU, L.H.; CHEN, C.Y. Research on genetic variation of heart fatty acid-binding protein gene in ten pig breeds. *Yi Chuan Xue Bao*, China. PubMed-Abstract – MEDLINE, 29:12-15, 2002.
- NECHTELBERGER, D.; PIRES, V.; SOOLKNET, J.; STUR BREM, G.; MUELLER, M.; MUELLER, S. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J. Anim. Sci.*, 79:2798-2804, 2001.
- PLASTOW, G.S. Molecular genetics in the swine industry. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Belo Horizonte, 2000. *Anais...* Belo Horizonte: SBMA, p.21-30, 2000.
- QIAN, Q.; KUO, L.; YU, Y.T.; ROTTMAN, J. N. A Concise Promoter Region of the Heart Fatty Acid-Binding Protein Gene Dictates Tissue-Appropriate Expression. *American Heart Association*, 84:276-289, 1999.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe*, 8:13-20, 1997.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 564p.
- SANCEVERO, A.B., ANTUNES, R.C. Qualidade de carcaça e qualidade da carne em suínos. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2, Uberaba, 1998. II Simpósio Nacional de Melhoramento Animal: SBMA, 2:167-172, 1998.

## **CAPÍTULO 2 – Associação de polimorfismos do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração com características quantitativas em suínos de raças divergentes**

**Resumo** – Objetivou-se, no presente trabalho, estudar associações dos polimorfismos do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos – Coração com características quantitativas avaliadas em animais F2. Foram genotipados 246 animais F2 provenientes do cruzamento entre machos da raça nativa brasileira Piau e fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain). Utilizou-se a enzima *Hinf* I, que reconheceu o sítio polimórfico caracterizado pela deleção de uma base Timina (T), presente na posição 108 do primeiro fragmento amplificado do gene FABP3 (Capítulo 1). Dois genótipos foram identificados, sendo 198 animais HH e 48 animais Hh. Foram testados os efeitos dos genótipos sobre características de desempenho, carcaça, cortes de carcaça e qualidade da carne em suínos. Houve efeito significativo para as características: peso ao 63 dias de idade ( $p=0,1528$ ), idade ao abate ( $p=0,0110$ ), comprimento de carcaça pelo método americano ( $p=0,1789$ ), espessura de toucinho imediatamente após a última costela ( $p=0,0449$ ), espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar ( $p=0,1199$ ), espessura de toucinho medida na carcaça direita resfriada na região da última costela, a partir de corte transversal no carré, a 6,5cm da linha dorso-lombar ( $p=0,1377$ ), comprimento do intestino ( $p=0,0287$ ), peso total de copa ( $p=0,1623$ ), peso da copa sem pele e sem capa de gordura ( $p=0,1271$ ), peso total de carré ( $p=0,0442$ ), peso de papada ( $p=0,0195$ ), peso de filezinho ( $p=0,0867$ ), peso de rim ( $p=0,0028$ ) e pH 45 minutos após o abate ( $p=0,1256$ ). Os resultados obtidos indicam que o gene FABP3 possui potencial para aplicação em programas de seleção assistida por marcadores moleculares para características de interesse econômico na cadeia produtiva de suínos.

Palavras-chave: cruzamento divergente, enzimas de restrição, FABP3, gene candidato, melhoramento animal, polimorfismo

## **CHAPTER 2 – Association of polymorphisms of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H – FABP) gene with quantitative traits in swine of divergent breeds**

**Abstract** – The objective of this work was to study association of polymorphisms of the Heart Fatty Acid Binding Protein (H – FABP) gene with quantitative traits in swine of divergent breeds. Was used the enzyme of restriction Hinf I, that recognize the polymorphism in the position 108 in sequence I (chapter I), characterized by the absence of a Thymine (T). Using the restriction reaction, 246 F2 animals were analyzed. Two genotypes were identified, 198 HH animals and 48 Hh animals. The polymorphism was significantly associated with: weight at 63 days of age ( $p=0.1528$ ), slaughter age ( $p=0.0110$ ), carcass length by the american carcass classification method ( $p=0.1789$ ), backfat thickness after last rib ( $p=0.0449$ ), backfat thickness between last 1st–2nd lumbar vertebrae ( $p=0.1199$ ), backfat thickness after last rib, at 6.5 cm from the midline ( $p=0.1377$ ), intestine length ( $p=0.0287$ ), total boston shoulder weight ( $p=0.1623$ ), skinless and fatless boston shoulder weight ( $p=0.1271$ ), loin (bone-in) weight ( $p=0.0442$ ), jowl weight ( $p=0.0195$ ), sirloin weight ( $p=0.0867$ ), kidney weight ( $p=0.0028$ ) and pH evaluated at 45 minutes after slaughter ( $p=0.1256$ ). According to the results, H–FABP gene can be used in programs of marker assisted selection for quantitative traits in swine.

**Key Words:** outbred cross, restriction enzymes, FABP3, gene candidate, animal breeding, polymorphism

## 1. INTRODUÇÃO

A estratégia para o estudo de genes candidatos baseia-se na associação de seus polimorfismos com diferenças fenotípicas, evidenciando a ação do referido gene na característica.

Uma das melhores técnicas para detecção de polimorfismos, em escala populacional, é a de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP). Basicamente a técnica consta da amplificação de determinada seqüência do DNA por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) que, posteriormente, é submetida à clivagem com enzimas de restrição.

As principais limitações do uso de genes candidatos são os elevados custos iniciais e a grande demanda de tempo na obtenção dos *primers* para amplificação e na identificação de sítios polimórficos dentro do gene escolhido. Porém, após essa fase inicial, o processo se torna simples para a detecção de variantes alélicas em nível populacional, uma vez que os mesmos *primers* iniciais serão utilizados para obtenção dos fragmentos a serem submetidos à reação de RFLP.

Diversos estudos, como os de GERBENS *et al.* (1999), GERBENS *et al.* (2000), NECHTELBERGER *et al.* (2001) e URBAN *et al.* (2002), evidenciaram polimorfismos do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos - Coração (H-FABP) por meio da técnica de PCR-RFLP e detectaram efeitos significativos dos mesmos em características quantitativas, como qualidade da carne, em suínos. Desta forma, o gene da H-FABP pode ser considerado como um candidato para aplicação direta em programas de seleção assistida por marcadores.

Objetivou-se, no presente trabalho, estudar associações dos polimorfismos do gene FABP3, descritos no Capítulo 1, com características quantitativas avaliadas em animais F2, obtidos pelo cruzamento de suínos da raça nativa brasileira Piau e matrizes comerciais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local e animais

A formação das famílias e obtenção dos dados fenotípicos foram realizadas na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001. A cidade de Viçosa está localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e tem como coordenadas geográficas de posição 20°45'20" de latitude sul, 45°52'40" de longitude oeste de Greenwich e altitude de 657m.

Para tanto, foram construídas duas famílias provenientes do cruzamento de dois machos da raça nativa brasileira Piau com 18 fêmeas comerciais (Landrace X Large White X Pietrain).

A geração F1 nasceu entre os meses de março e maio de 1999. Dentre os machos F1, foram selecionados ao acaso 11 varrões provenientes de diferentes leitegadas, que foram acasalados (monta natural) com 54 fêmeas F1. Estes animais foram acasalados entre os meses de fevereiro e outubro de 2000, para a produção da geração F2, nascida entre junho de 2000 e fevereiro de 2001. Assim, foram obtidos 617 animais F2, divididos em cinco lotes:

lote 1 = animais nascidos entre 20/06/00 e 03/07/00;

lote 2 = animais nascidos entre 03/08/00 e 23/08/00;

lote 3 = animais nascidos entre 16/09/00 e 01/11/00;

lote 4 = animais nascidos entre 30/11/00 e 25/12/00;

lote 5 = animais nascidos entre 19/01/01 e 12/02/01.

Os animais tiveram o manejo padrão da Granja de Melhoramento de Suínos da UFV, sendo os machos castrados aos 10 dias de idade. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e, dos 77 aos 105 dias de idade, foram submetidos ao teste de conversão alimentar individual. Posteriormente, foram transferidos para baias coletivas até atingirem o peso de abate, 65 (64,84 ± 5,53) kg de peso vivo (147,83 ± 9,95 dias de idade), quando tiveram suas carcaças dissecadas e analisadas.

## 2.2. Características avaliadas

As seguintes características de desempenho foram mensuradas na geração F2: número de tetas (NTETAS), peso ao nascer (PNAS), peso aos 21 (P21), 42 (P42), 63 (P63), 77 (P77) e 105 (P105) dias de idade, peso vivo ao abate (PVIVO), ganho de peso médio diário (GPD), consumo de ração à vontade (CONSRAC) e conversão alimentar (CA) dos 77 aos 105 dias de idade, e idade ao abate (IDABATE).

Avaliaram-se as seguintes características de carcaça na geração F2: peso de carcaça com cabeça e pés (PCARC), rendimento de carcaça com cabeça e pés (RCARC), pesos dos seguintes órgãos internos: pulmão (PULMÃO), coração (CORAÇÃO), fígado (FÍGADO) e baço (BAÇO), comprimento de carcaça pelo método brasileiro (MBCC) e pelo método americano (MLC); espessura de toucinho nas posições SH (maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar), UC (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar), UL (espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar), L (menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar) e P2 (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar). Na meia-carcaça resfriada na região da última costela, a partir de um corte transversal no carré, mediram-se: ETO (espessura de toucinho, a 6,5 cm da linha dorso-lombar, equivalente à P2) e PROFLOMB (profundidade de lombo, diâmetro do músculo *Longissimus dorsi* sobre uma reta traçada da coluna vertebral serrada até a posição onde foi medida a ETO). Foram medidos também o comprimento total do intestino delgado (INTEST) e a área de olho de lombo (AOL).

As características de cortes de carcaça avaliadas foram os seguintes pesos: banda direita resfriada (PBDIRres), pernil limpo (PPERNIL) e pernil total (PTPERNIL), copa sem pele e sem capa de gordura e total de copa (PCOPA e PTCOPA), paleta limpa e paleta total (PPALETA e PTPALETA), carré (PTCARRE), lombo (PLOMBO), bacon (PBACON), costela (COSTELA), papada (PAPADA), cabeça (CABEÇA), filezinho (FILEZIN), rim (RIM), banha rama (BARAMA). Avaliou-se também a espessura do bacon (ESPBACON).

As seguintes características de qualidade de carne foram avaliadas na geração F2: pH medido 45 minutos e 24 horas *post-mortem* (pH45 e pH24, respectivamente), perda de peso por gotejamento (GOTEJ), perda de peso por cozimento (COZ), perda de peso total (PERDATOT), gordura intramuscular (GORINT), maciez objetiva (força de cisalhamento – MACIEZ) e coloração. A coloração foi determinada pelo sistema HUNTER LAB, sendo medidos a luminosidade (LUM), o índice de vermelho (A) e o índice de amarelo (B), em espectrofotômetro. Foram, então, calculados os índices de saturação [ $C = (A^2 + B^2)^{1/2}$ ] e de tonalidade ( $H = \arctang B/A$ ).

### 2.3. Genotipagem dos animais F2

Após a detecção de polimorfismos no gene FABP3 e montagem do mapa de restrição, genotipou-se 246 animais F2. Neste trabalho, o polimorfismo escolhido para estudo foi o encontrado no fragmento I, posição 108, como mostrado na Figura 3 do Capítulo 1. A mudança no sítio de restrição da enzima *Hinf* I causada pela mutação encontrada é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Alteração no sítio de restrição da *Hinf* I devido a deleção da Timina do fragmento I, na posição 108

Posição Seqüência Sentido	Mutação	Reconhecimento do sítio
102-----113 TCAGAT <b>T</b> CCGAA 5' ..... 3'	–	sim
102--- --113 TCAGAT-CCGAA 5' .... ... 3'	Deleção de Timina (T)	não

O diagnóstico das possíveis mutações foi feito por meio de reações de digestão pela enzima de restrição *Hinf* I, cuja clivagem da seqüência de DNA é específica para o polimorfismo encontrado, como apresentado na Tabela 1.

A reação de amplificação seguiu o protocolo descrito no Capítulo 1.

As reações de digestão foram feitas em um volume final de 15,0 µL, contendo 3,85 µL de água, 0,5 µL da enzima *Hinf* I (equivalente a 5 unidades),

0,15 µL de BSA, 1,5 µL de tampão de restrição 10X e 9 µL do DNA amplificado. Esse *mix* foi deixado em banho-maria a 37°C por duas horas. Após a digestão, as amostras foram aplicadas em gel de poli-acrilamida a 8%, corado com nitrato de prata 0,2%, identificando-se, assim, os fragmentos de DNA para genotipagem dos animais.

Animais que possuíam as duas fitas de DNA do fragmento analisado com o sítio de restrição para a enzima *Hinf* I, apresentando em gel três bandas distintas de 314, 105 e 59pb, receberam a denominação de homozigotos HH. Para os animais que, além da fita com a presença do sítio, apresentavam uma fita com a deleção da base nitrogenada Timina (T), levando ao não reconhecimento do sítio de restrição pela enzima, foram, então, denominados de heterozigotos Hh.

#### 2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas para associação dos genótipos com as características avaliadas foram feitas utilizando-se modelo:

$$y_{ijklm} = \mu + G_i + S_j + L_k + b(C_{ijklm} - \bar{C}) + p_l + e_{ijklm}$$

em que:

$y_{ijklm}$  = característica observada no animal m, do genótipo i, do sexo j, do lote k, filho do pai l;

$\mu$  = constante inerente a todas as observações;

$G_i$  = efeito fixo do genótipo i;

$S_j$  = efeito fixo do sexo j;

$L_k$  = efeito fixo de época de nascimento (lote) k (k = 1, 2, 3, 4 e 5);

b = coeficiente de regressão linear da característica em função da covariável;

$C_{ijklm}$  = valor observado da covariável no animal m, do genótipo i, do sexo j, do lote k, do pai l;

$\bar{C}$  = média da covariável;

$p_l$  = efeito aleatório do pai l, com l variando de 1 a 11; e

$e_{ijklm}$  = erro aleatório associado a cada observação.

As covariáveis utilizadas foram:

- tamanho de leitegada ao nascimento (TLN) para PNAS;
- tamanho de leitegada ao desmame (TLD) para P21, P42, P63, P77, P105 e PVIVO;

- peso aos 77 dias (P77) para CONSRAC, GPD e CA;
- peso de carcaça (PCARC) para as características de carcaça;
- peso da banda direita resfriada (PBDIRres) para as características de corte de carcaça;
- idade ao abate (IDABATE) para as características de qualidade da carne.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 pode-se observar o padrão de bandas gerado pela digestão do DNA amplificado pela enzima *Hinf* I.

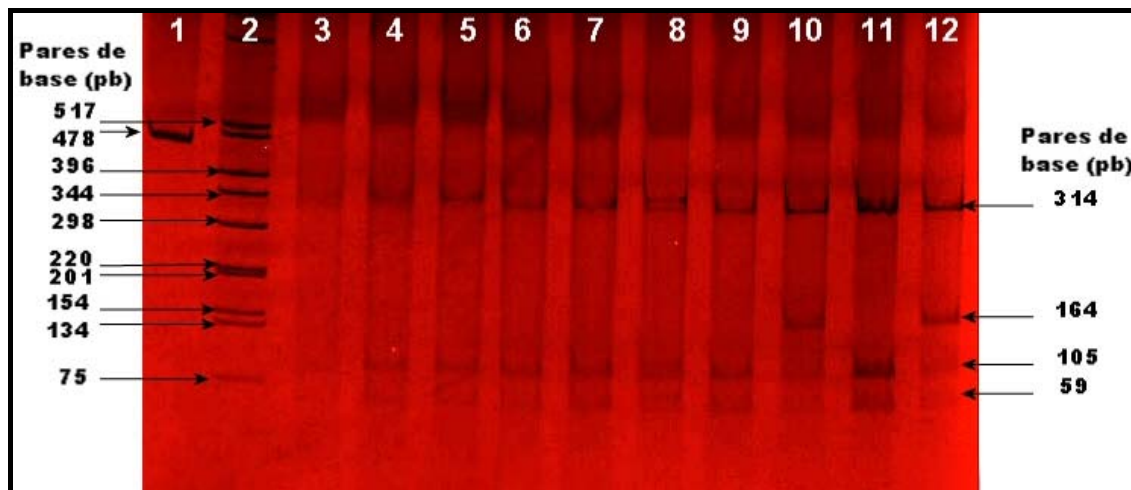


Figura 1 – Gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata 0,2%. Padrão de bandas resultantes da digestão pela enzima *Hinf* I do DNA amplificado. A canaleta 1 apresenta o padrão de banda da amostra não digerida, com 478 pares de base (pb). Na canaleta 2 se encontra o padrão de peso molecular 1Kb, usado como referência para os tamanhos de bandas. As canaletas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11 referem-se a animais homocigotos (HH) para o reconhecimento do sítio polimórfico, com 3 tamanhos de bandas (314, 105 e 59 pb). Nas canaletas 10 e 12, encontram-se amostras de DNA de animais heterocigotos (Hh) para a clivagem do polimorfismo pela *Hinf* I, com fragmentos de 314, 164, 105 e 59 pb.

Todos os 246 animais F2 genotipados apresentaram o sítio monomórfico para a enzima, cuja clivagem resultava em 2 fragmentos de 314 e 164 pb. Nos animais em que o polimorfismo *Hinf* I estava ausente, o fragmento de 164pb era digerido em outros dois fragmentos menores de 105 e 59pb.

As canaletas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11 do gel mostrado na Figura 1, representam animais denominados homocigotos (HH). As amostras das canaletas 10 e 12 (Figura 1) representam os animais denominadas de heterocigotos (Hh).

As freqüências dos genótipos encontrados são apresentadas nas Tabela 2. Não foram encontrados genótipos hh na população de animais genotipados.

Tabela 2 – Freqüências dos genótipos HH e Hh do gene da H-FABP na população de animais genotipados

Genótipo	N	% dos animais genotipados
HH	198	80,49
Hh	48	19,51

N=Número de observações.

Na Tabela 3, são apresentadas as frequências dos alelos H e h do gene da H-FABP no grupo de animais estudados.

Tabela 3 – Frequências dos alelos H e h do gene da H-FABP na população de animais genotipados

Alelo	Frequência alélica (%)
H	90,24
h	9,76

O número de observações, a média dos genótipos e os valores do teste F para as características de desempenho são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Número de observações (N) e média para características de desempenho de acordo com os genótipos HH e Hh do gene da H-FABP

Características	Genótipos				SIG
	HH		Hh		
	N	Média $\pm$ DP	N	Média $\pm$ DP	
NTETAS	196	13,17 $\pm$ 1,30	48	12,96 $\pm$ 1,24	0,6302
PNAS(kg)	197	1,16 $\pm$ 0,25	48	1,13 $\pm$ 0,27	0,9174
P21(kg)	195	4,73 $\pm$ 0,98	46	4,85 $\pm$ 1,21	0,2364
P42(kg)	188	8,28 $\pm$ 1,79	45	7,98 $\pm$ 2,17	0,3848
P63(kg)	191	15,54 $\pm$ 3,27	45	15,68 $\pm$ 3,62	0,1528
P77(kg)	188	20,42 $\pm$ 3,88	44	20,46 $\pm$ 4,04	0,2611
CONSRAC (kg)	188	37,24 $\pm$ 7,68	41	38,34 $\pm$ 8,58	0,2036
P105(kg)	182	34,18 $\pm$ 5,74	39	34,74 $\pm$ 6,21	0,4220
GPD(kg)	187	0,48 $\pm$ 0,13	39	0,50 $\pm$ 0,14	0,9569
CA(kg/kg)	186	2,87 $\pm$ 0,72	39	2,95 $\pm$ 0,84	0,4795
PVIVO(kg)	151	65,20 $\pm$ 5,39	37	64,78 $\pm$ 5,75	0,9733
IDABATE(dias)	158	152,15 $\pm$ 10,25	38	147,32 $\pm$ 9,13	0,0110

DP=Desvio Padrão.

SIG=Limite de significância para o teste F.

NTETAS=número de tetas; PNAS, P21, P42, P63, P77, P105=peso ao nascer, aos 21, 42, 63, 77 e aos 105 dias de idade, respectivamente; PVIVO=peso ao abate; GPD=ganho de peso médio diário; CONSRAC e CA=consumo de ração à vontade e conversão alimentar dos 77 aos 105 dias de idade e IDABATE=idade ao abate.

Foram verificados efeitos significativos para idade ao abate ( $p < 0,05$ ) e peso aos 63 dias ( $p < 0,20$ ). Não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que tenham efetuado associação entre características de desempenho e polimorfismos no gene da H-FABP.

Na Tabela 5 são apresentados o número de observações, a média dos genótipos e os valores do teste F para as características de carcaça.

Tabela 5 – Número de observações (N) e média para características de carcaça de acordo com os genótipos HH e Hh do gene da H-FABP

Características	Genótipos				SIG
	HH		Hh		
	N	Média $\pm$ DP	N	Média $\pm$ DP	
PCARC(kg)	159	53,80 $\pm$ 5,48	37	53,27 $\pm$ 5,08	0,5695
RCARC(%)	153	81,72 $\pm$ 2,32	37	81,68 $\pm$ 1,91	0,7935
MBCC(cm)	161	85,89 $\pm$ 4,48	39	86,99 $\pm$ 4,17	0,2327
MLC(cm)	158	71,66 $\pm$ 3,25	39	72,32 $\pm$ 3,62	0,1789
SH(mm)	161	41,34 $\pm$ 5,56	39	39,92 $\pm$ 6,53	0,4568
UC(mm)	161	20,04 $\pm$ 4,67	39	18,36 $\pm$ 4,89	0,0449
UL(mm)	161	29,18 $\pm$ 6,06	39	27,10 $\pm$ 6,31	0,1199
L(mm)	164	45,11 $\pm$ 1,95	40	45,44 $\pm$ 1,90	0,2316
P2(mm)	160	16,79 $\pm$ 3,50	39	16,28 $\pm$ 4,28	0,2694
ETO(mm)	153	21,90 $\pm$ 5,22	37	20,55 $\pm$ 5,78	0,1377
PROFLOMB(mm)	143	43,73 $\pm$ 4,63	38	43,48 $\pm$ 3,91	0,7837
AOL(cm <sup>2</sup> )	148	26,63 $\pm$ 3,87	39	26,76 $\pm$ 3,22	0,5874
PULMÃO(kg)	157	0,45 $\pm$ 0,08	38	0,46 $\pm$ 0,07	0,8796
CORAÇÃO(kg)	160	0,24 $\pm$ 0,03	39	0,24 $\pm$ 0,03	0,6040
FÍGADO(kg)	159	1,27 $\pm$ 0,16	39	1,30 $\pm$ 0,17	0,4204
BAÇO(kg)	160	0,09 $\pm$ 0,02	39	0,09 $\pm$ 0,02	0,7501
INTEST (m)	161	18,24 $\pm$ 1,91	39	18,32 $\pm$ 2,07	0,0287

DP=Desvio Padrão.

SIG=Limite de significância para o teste F.

PCARC, PULMÃO, CORAÇÃO, FÍGADO e BAÇO=pesos de carcaça com cabeça e pés; pulmão, coração, fígado e baço, respectivamente; RCARC=rendimento de carcaça com cabeça e pés; MBCC e MLC=comprimento de carcaça pelo método brasileiro e método americano; SH, UC, UL, L e P2=espessuras de toucinho em diversas posições; ETO=espessura de toucinho, a 6,5 cm da linha dorso-lombar (equivalente à P2); PROFLOMB=profundidade de lombo;INTEST=comprimento total do intestino delgado; AOL=área de olho de lombo.

Efeitos significativos foram encontrados para as características espessura de toucinho UC, e comprimento de intestino ( $p < 0,05$ ), comprimento

de carcaça pelo método americano e espessuras de toucinho UL e ETO ( $p < 0,20$ ).

Não foram encontrados trabalhos que tenham verificado efeito significativo para o conjunto de características da tabela 5, exceto para ETO, que apresentou contraste significativo em estudo realizado por GERBENS *et al.* (1999).

Na Tabela 6 são apresentados o número de observações, a média dos genótipos e os valores do teste F para as características de corte de carcaça.

Tabela 6 – Número de observações (N) e média para características de corte de carcaça de acordo com os genótipos HH e Hh do gene da H-FABP

Características	Genótipos				SIG
	HH		Hh		
	N	Média $\pm$ DP	N	Média $\pm$ DP	
PBDIRres(kg)	161	26,46 $\pm$ 3,11	39	26,36 $\pm$ 2,93	0,9105
PTPERNIL(kg)	159	7,22 $\pm$ 0,90	39	7,24 $\pm$ 0,83	0,6669
PPERNIL(kg)	156	5,06 $\pm$ 0,64	39	5,08 $\pm$ 0,52	0,8589
PTCOPA(kg)	161	2,34 $\pm$ 0,36	39	2,38 $\pm$ 0,40	0,1623
PCOPA(kg)	161	1,70 $\pm$ 0,28	39	1,74 $\pm$ 0,28	0,1271
PTPALETA(kg)	160	4,81 $\pm$ 0,68	37	4,78 $\pm$ 0,65	0,4679
PPALETA(kg)	160	2,73 $\pm$ 0,44	39	2,78 $\pm$ 0,42	0,5764
PTCARRE(kg)	157	3,50 $\pm$ 0,50	39	3,40 $\pm$ 0,49	0,0442
PLOMBO(kg)	160	1,08 $\pm$ 0,18	39	1,08 $\pm$ 0,17	0,9653
PBACON(kg)	158	2,71 $\pm$ 0,48	39	2,66 $\pm$ 0,47	0,7310
ESPBACON(cm)	158	25,72 $\pm$ 6,12	38	25,76 $\pm$ 7,82	0,9549
COSTELA(kg)	161	1,56 $\pm$ 0,25	38	1,59 $\pm$ 0,26	0,7989
PAPADA(kg)	160	0,72 $\pm$ 0,20	38	0,82 $\pm$ 0,25	0,0195
CABEÇA(kg)	160	1,52 $\pm$ 0,22	39	1,52 $\pm$ 0,24	0,7621
FILEZIN(kg)	160	0,24 $\pm$ 0,04	38	0,23 $\pm$ 0,04	0,0867
BARAMA(kg)	160	0,49 $\pm$ 0,15	38	0,46 $\pm$ 0,14	0,3841
RIM(kg)	160	0,12 $\pm$ 0,02	39	0,13 $\pm$ 0,02	0,0028

DP=Desvio Padrão.

SIG=Limite de significância para o teste F.

PBDIRres, PPERNIL, PTPERNIL, PCOPA, PTCOPA, PPALETA, PTPALETA, PTCARRE, PLOMBO, PBACON, COSTELA, PAPADA, CABEÇA, FILEZIN, BARAMA e RIM=pesos de carcaça com cabeça e pés, banda direita resfriada, pernil limpo, pernil total, copa sem pele e sem capa de gordura, total de copa, paleta limpa, paleta total, carré, lombo, bacon, costela, papada, cabeça, filezinho, banha rama e rim; ESPBACON=espessura do bacon.

Foram verificados efeitos significativos para peso de rim ( $p < 0,01$ ); peso de carré e peso de papada ( $p < 0,05$ ); peso de filezinho ( $p < 0,10$ ) e peso total de copa e peso de copa sem pele e sem capa de gordura ( $p < 0,20$ ). URBAN *et al.* (2002), ao trabalharem com suínos das raças Large White e Landrace não verificaram efeitos significativos dos genótipos do gene da H-FABP sobre pesos e rendimentos de cortes.

Na Tabela 7 são apresentados o número de observações, a média dos genótipos e os valores do teste F para as características de qualidade da carne.

Tabela 7 – Número de observações (N) e média para características de qualidade da carne de acordo com os genótipos HH e Hh do gene da H-FABP

Características	Genótipos				SIG
	HH		Hh		
	N	Média	N	Média	
pH45	163	6,60 $\pm$ 0,28	38	6,62 $\pm$ 0,31	0,1256
pH24	163	5,74 $\pm$ 0,19	40	5,75 $\pm$ 0,16	0,4201
LUM	164	45,11 $\pm$ 1,95	40	45,44 $\pm$ 1,90	0,2710
A	162	0,79 $\pm$ 0,58	40	0,68 $\pm$ 0,49	0,5123
B	165	6,70 $\pm$ 0,58	40	6,75 $\pm$ 0,50	0,4085
GORINT(%)	152	1,65 $\pm$ 0,56	37	1,58 $\pm$ 0,51	0,5456
GOTEJ(%)	164	3,04 $\pm$ 1,74	40	3,20 $\pm$ 1,54	0,9844
COZ(%)	165	32,48 $\pm$ 2,39	40	32,58 $\pm$ 2,54	0,5578
MACIEZ(g/1,2 cm)	162	5638,26 $\pm$ 803,97	38	5635,16 $\pm$ 959,92	0,8453
PERDATOT(%)	165	34,39 $\pm$ 2,65	38	34,18 $\pm$ 2,60	0,3165
H	155	83,05 $\pm$ 5,06	39	84,27 $\pm$ 4,20	0,5712
C	159	6,74 $\pm$ 0,57	39	6,80 $\pm$ 0,50	0,3384

DP=Desvio Padrão.

SIG=Limite de significância para o teste F.

pH45 e pH24=pH medido 45 minutos e 24 horas post-mortem, respectivamente; GOTEJ, COZ e PERDATOT=perda de peso por gotejamento, cozimento e perda de peso total; GORINT=gordura intramuscular; MACIEZ=maciez objetiva (força de cisalhamento); LUM=luminosidade; A=índice de vermelho; B=índice de amarelo; C e H= índices de saturação e tonalidade, respectivamente.

Verificaram-se efeitos significativos dos genótipos sobre pH medido 45 minutos *pos-mortem* ( $p < 0,20$ ). URBAN *et al.* (2002) e NECHTELBERGER *et al.* (2001) não verificaram efeitos dos genótipos sobre as características descritas na tabela 7. Por outro lado, foram encontrados efeitos significativos sobre

gordura intramuscular em suínos de duas populações da raça Duroc (GERBENS *et al.*, 1999) e em suínos das raças Meishan e ocidentais (GERBENS *et al.*, 2000). No último estudo, os autores sugerem que o gene FABP3 pode ser aplicado em programas de seleção para aumentar o teor de gordura intramuscular sem que haja aumento concomitante da espessura de toucinho, uma vez que encontraram efeitos significativos do gene na característica gordura intramuscular e não detectaram na espessura de toucinho.

Neste estudo, a ausência de efeitos significativos dos genótipos sobre grande maioria das características pode ter sido causada pela ausência do terceiro genótipo (hh), que poderia ser visualizado em gel apenas como duas bandas de DNA (314 e 164 pb). Outro fator que poderia contribuir para a detecção de efeitos significativos sobre outras características seria a genotipagem de maior número de animais.

A utilização de cruzamentos divergentes possui algumas vantagens como a segregação dos alelos de grande efeito na população F2. Entretanto, em populações comerciais, os alelos podem estar com efeito diminuído ou até mesmo anulado. Desta forma, devem ser confirmados primeiramente em populações comerciais para que se possa utilizar o gene como marcador molecular em programas de seleção (ANDERSSON *et al.*, 1998).

#### **4. CONCLUSÕES**

A partir dos efeitos significativos encontrados para as variantes alélicas do gene da Proteína de Ligação dos Ácidos Graxos – Tipo Coração, pode-se concluir que o gene possui potencial para aplicação em programas de seleção assistida por marcadores moleculares para características de interesse econômico na cadeia produtiva de suínos; no entanto, deve ser, primeiramente, testado em populações comerciais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L.; ANDERSSON, K.; ANDERSSON – EKLUND, L. et al. Case history in animal improvement: genetic mapping of QTLs for growth and fatness in the pig. In: Molecular Dissection of Complex Traits. Ed. Paterson, A. H., CRC Press, New York. p.241-254, 1998.
- GERBENS, F., VAN ERP, A.J.M., HARDERS, F.L., VERBURG, F.J., MEUWISSEN, T.H.E., VEERKAMP, J.H, te PAS, M.F.W. Effect of genetic variants of the Heart Fatty Acid-binding Protein Gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *J. Anim. Sci.*, 77:846-852, 1999.
- GERBENS, F.; DE KONING, D.J.; HARDERS, F.L.; MEUWISSEN, T.H.; JANSSE, L.L.; GROENEN, M.A.; VEERKAMP, J.H.; VAN ARENDONK, J.A.; TE PAS, M.F. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J. Anim. Sci.*, 78:552-559, 2000.
- NECHTELBERGER, D.; PIRES, V.; SOOLKNET, J.; STUR BREM, G.; MUELLER, M.; MUELLER, S. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J. Anim. Sci.*, 79:2798-2804, 2001.
- URBAN, T.; MIKOLASOVA, R.; KUCIEL, J.; ERNST, M.; INGR, I. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. *J. Appl. Genet.*, 43:505-509, 2002.