

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Análise do Polimorfismo do Gene da Leptina e do Gene Receptor de Leptina em
Reprodutores Caprinos e Ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim-PE

João Fernandes Lima Neto

Serra Talhada-PE
2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

Análise do Polimorfismo do Gene da Leptina e do Gene Receptor de Leptina em
Reprodutores Caprinos e Ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim-PE

**Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Rural
de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Serra Talhada como
requisito básico para conclusão do curso de Zootecnia**

Aluno: João Fernandes Lima Neto

Orientadora: Ana Patrícia de Souza Lima

Serra Talhada-PE
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

L732a Lima Neto, João Fernandes

Análise do polimorfismo do gene da leptina e do gene receptor de leptina em reprodutores caprinos e ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim - PE / João Fernandes Lima Neto – Serra Talhada, 2018.

40 f.: il.

Orientadora: Ana Patrícia de Souza Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Genoma. 2. Genética molecular. 3. Caprino. 4. Ovino. 5. Animais – Melhoramento genético. I. Lima, Ana Patrícia de Souza, orient. II. Título.

CDD 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

JOÃO FERNANDES LIMA NETO

Graduando

Análise do Polimorfismo do Gene da Leptina e do Gene Receptor de Leptina em
Reprodutores Caprinos e Ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim-PE

EXAMINADORES

Dra. Ana Patrícia de Souza Lima (Orientadora)
Dr. Jorge André Matias Martins (Examinador)
Dra. Rossana Herculano Clementino (Examinador)
Dra. Ednéia de Lucena Vieira (Suplente)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

JOÃO FERNANDES LIMA NETO

Graduando

Análise do Polimorfismo do Gene da Leptina e do Gene Receptor de Leptina em
Reprodutores Caprinos e Ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim-PE

Aprovado em: 24/08/2018

EXAMINADORES

Dra. Ana Patrícia de Souza Lima

Dr. Jorge André Matias Martins

Dra. Rossana Herculano Clementino

Dra. Ednéia de Lucena Vieira (Suplente)

Dedico este trabalho as três mulheres mais importantes da minha vida. Minha vó Raimunda Maria que não está mais presente na minha vida física (*in memoriam*). A minha mãe Maria Zenir e a minha pequena princesa Nicolý Fernandes, por todo amor e em sempre acreditar nos meus objetivos me apoiando junto aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a Deus pelo o poder de existência, a natureza por nos banhar todos os dias de energia e forças nos momentos difíceis para seguir sempre em frente.

Agradeço com tanta imensidão a minha mãe Maria Zenir, aos meus irmãos Erika, Eduarda e Eduardo Jorge, a minha sobrinha Nicolý e aos meus filhos de quatro patas.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada pelas.

Aos os meus mestres que foram de fundamental importância na minha construção acadêmica, principalmente minha orientadora Dra. Ana Patrícia de Souza Lima e a Dra. Laura Leandro da Rocha.

A Estação de agricultura Irrigada de Parnamirim-Pe e ao Centro de Manejo Reprodutivo e Melhoramento Genético de Parnamirim-Pe.

Ao Laboratório de Genética Aplicada (LAGA), por toda contribuição no desenvolvimento desse projeto.

Ao Grupo de Estudos em Melhoramento Genético Animal (MEGA).

Agradeço aos meus amigos de longas e recentes jornadas.

Diretório Acadêmico Central – DCE da Universidade Federal Rural de Pernambuco por termos construído uma nova gestão em 2017 (Quem vem com tudo não cansa).

A todos os meus amigos da União da Juventude Socialista de Pernambuco em especial o núcleo Cida Pedrosa UFRPE.

“Ninguém quer saber o que fomos, o que possuímos, que cargo ocupávamos no mundo; o que conta é a luz que cada um já tenha conseguido fazer brilhar em si mesmo.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. O cenário mundial e nacional da caprinovinocultura.....	18
2.2. Principais raças Caprinas e Ovinas difundidas no Nordeste do Brasil.....	19
2.2.1. Raça caprina Anglo-Nubiana.....	19
2.2.2. Raça caprina Boer.....	19
2.2.3. Raça ovina Dorper.....	20
2.2.4. Raça ovina Santa-Inês.....	21
2.3. O uso de Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético Animal	22
2.4. Gene da Leptina.....	25
2.5. Gene do Receptor da Leptina.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Amostragem.....	29
3.2. Extração do DNA genômico.....	30
3.3. Amplificação dos genes da leptina (LepI2) e do receptor de leptina (RecLep).....	31
3.4. Técnica de PCR- RFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)	31
3.4.1. Gene da Leptina (LepI2)	32
3.4.2. Gene do receptor de leptina (RecLep).....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Gene da Leptina (LepI2) cortados com a enzima de restrição BsaAI.....	33
4.2. Gene do receptor de leptina (RecLep) cortados com a enzima de restrição HinfI.....	35
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição de caprinos e ovinos por região no estado de Pernambuco.....	18
TABELA 2 - Amostras dos reprodutores caprinos e ovinos da EAIP.....	29
TABELA 3 - Amostras dos reprodutores caprinos e ovinos da EAIP.....	30
TABELA 4 - Sequências dos <i>primers</i> da da leptina (LepI2) e do receptor de leptina (RecLep).....	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Caprino da raça Anglo-Nubiano.....	19
FIGURA 2 – Caprino da raça Boer.....	19
FIGURA 3 – Ovino da raça Dorper.....	22
FIGURA 4 – Ovino da raça Santa Inês.....	21
FIGURA 5 – Esquematização da técnica de PCR.....	24
FIGURA 6 – Genótipo da leptina.....	26
FIGURA 7 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 (522 pb)	32
FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 (522 pb)	33
FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 cortadas com enzima <i>Bsa AI</i> (522 pb)	33
FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 cortadas com enzima <i>Bsa AI</i> (522 pb)	34
FIGURA 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da RecLep (164 pb)	35
FIGURA 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene do RecLep cortados com enzima <i>Hinfl</i> (103 pb)	35

LISTA DE SIGLAS

AFLP – Polimorfismo do Comprimento de Fragmento Amplificados.

A-G – Adenina/Guanina.

– Citosina/ timina.

EAIP – Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim.

FCL – Fenol/Clorofórmico/Álcool Isomítico.

Lep – Leptina.

LepI2 – SNP da Leptina – 1620 – A/G.

OB – Obeso.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

QTLs - Quantitative Trait loci.

RAPD – Polimorfismo do DNA ao Acaso.

RecLep – Receptor de Leptina.

RFLP – Técnica do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação.

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

TM – GE Healthcare.

VNTR – Variação do Número de Repetições em Tandem.

RESUMO

Para a cadeia produtiva de caprinos e ovinos alcançar um nível competitivo e promissor é necessário o desenvolvimento de tecnologias que venham auxiliar na eficiência das criações. O uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético pode auxiliar na seleção dos animais geneticamente superiores. A utilização desses marcadores para investigação do polimorfismo existente nos genes que estão relacionados às características produtivas são técnicas bastante utilizadas dentro da genética molecular. O objetivo desse estudo foi investigar o polimorfismo *LEP 1620* (A/G) do gene que codifica hormônio da leptina, assim como, o polimorfismo do gene do receptor de leptina em reprodutores caprinos e ovinos. Para o gene *LepI2* os resultados encontrados evidenciaram apenas o genótipo homozigoto AA corresponde ao fragmento de 522 pb não digerido. Já para o gene *RecLep* foi possível identificar que todos os indivíduos possuíam o polimorfismo CC (103 pb). O polimorfismo CC para o gene *RecLep* está relacionado a características reprodutivas positivas para os ruminantes, porém, devem ser realizados mais estudos para compreender melhor esse polimorfismo presente no genoma dos caprinos e ovinos.

Palavras chaves: Genoma, Gene Candidato, Genética Molecular, Melhoramento Genético.

ABSTRACT

In order to the productive chain of goats and sheep to reach a competitive and promising level it is necessary the development of technologies that will help in the efficiency of the breeding. The use of molecular markers in breeding programs may aid in the selection of animals that are considered genetically superior. The use of these markers to investigate the existing polymorphism in genes that are related to the productive is widely used when it comes to molecular genetics. The objective of this study was to investigate the LEP 1620 (A / G) polymorphism of the gene coding for leptin hormone, as well as the leptin receptor gene polymorphism in goat and sheep reproducers. For the LepI2 gene the results found only showed the homozygous AA genotype corresponding to the 522 bp fragment undigested. For the RecLep gene, it was possible to identify that all individuals had the CC polymorphism (103 bp). The CC polymorphism for the RecLep gene is related to positive reproductive traits for ruminants, but more studies should be done to better understand of this polymorphism that is present in the goat and sheep genomes.

Keywords: Genome, Gene Candidate, Molecular Genetics, Genetic Improvement.

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos e caprinos são encontrados em todos os continentes, são espécies que têm ampla distribuição devido ao seu potencial adaptativo a diferentes regiões. Sendo descritas como as primeiras espécies domesticadas pelo homem, fato esse, que possibilitou a exploração dos seus produtos, como o uso da pele contra o frio, artesanato, e da carne e leite para o consumo alimentar (VIANA, 2008).

Segundo Rego Neto et al. (2014) as exigências por produtos de qualidade de origem animal pelo mercado consumidor está mudando o cenário de criação animal no Brasil, ocasionando um desenvolvimento considerável na produção animal como um todo. Nos últimos cinco anos o crescimento mundial dos rebanhos caprinos e ovinos passou da ordem de 1% ao ano (MARTINS, 2016).

Para a cadeia produtiva da caprinovinocultura alcançar um nível competitivo e promissor é necessário o desenvolvimento de tecnologias que venham auxiliar na melhoria da qualidade e eficiência das criações desde o pesquisador até o produtor, o uso de dados moleculares como marcadores bioquímicos e de DNA em programas de melhoramento genético pode auxiliar em melhorias na eficiência, intensidade e precisão na seleção dos animais (SILVA et al, 2011).

Assim, as regiões polimórficas de DNA podem ser utilizadas para a localização relativa de segmentos cromossômicos ou de genes responsáveis por variações fenotípicas observadas em características de interesse zootécnico (LIU, 1998).

A identificação de polimorfismos em genes de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma característica de interesse econômico, constitui a chamada estratégia do gene candidato. Dentre os genes candidatos mais utilizados em investigações, encontra-se o gene da leptina (Lep).

Segundo Passos (2006) a leptina é uma proteína composta por 167 aminoácidos, produzida pelos adipócitos. Tal proteína tem como função o controle da ingestão alimentar, agindo no sistema nervoso central (hipotálamo), em mamíferos, reduzindo tal ingestão, aumentando o gasto energético e regulando a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras. A leptina tem sido associada também a regulação de outros processos biológicos, como por exemplo, reprodução e resposta imune (ROMERO e ZANESCO, 2006).

Dentro da produção animal, o gene da leptina e o receptor de leptina estão associados a diversas características de interesse, como por exemplo, produção de leite,

porcentagem de gordura no leite, maturidade sexual, deposição de gordura na carcaça, síntese de hormônios e metabolismo energético (SALMAN e GIACHETTO, 2008).

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo investigar o polimorfismo *LEP 1620 (A/G)* do gene que codifica hormônio da leptina, assim como, o polimorfismo do gene do receptor de leptina em reprodutores caprinos e ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O cenário mundial e nacional da caprinovinocultura

A caprinovinocultura (criação de caprinos e ovinos) encontra-se distribuída por todos os continentes do planeta, apesar da ampla distribuição dessas espécies, tais criações estão mais concentradas nos países em desenvolvimento (CONAB, 2016). Em 2014 o rebanho mundial de caprinos era de ordem de 1,06 milhões de cabeças. Já o efetivo mundial de ovinos da ordem de 1,2 bilhões de animais (FAO, 2016).

De acordo com o IBGE (2016), no ano de 2014 foi registrada uma quantia de 9.092.724 caprinos concentrados na região nordeste, equivalente a cerca de 92,9% de todo efetivo brasileiro. Para o rebanho ovino foram registrados 11.622.243 animais, com distribuição de 63% no nordeste e 24% na região sul do Brasil.

A criação de ovinos e caprinos no estado de Pernambuco representa 2.478.072 e 2.492.388, respectivamente. Diante do cenário brasileiro, o estado de Pernambuco destaca-se em relação ao seu efetivo, ficando atrás apenas da Bahia, que possui o maior rebanho do Nordeste. As regiões em destaque encontram-se na tabela 1. Dentre as microrregiões com maior produção no estado de Pernambuco estão: Petrolina, Itaparica, Moxotó, Pajeú e Salgueiro (IBGE, 2016).

Tabela 01. Distribuição de caprinos e ovinos por região no estado de Pernambuco.

REGIÃO	CAPRINOS	OVINOS
Metropolitana do Recife	4.767	14.719
Zona da Mata	21.929	34.830
Agreste	282.547	454.607
Sertão	870.461	881.335
São Francisco	1.312.684	1.092.591

(Fonte: IBGE, 2016).

A caprinocultura em Pernambuco está distribuída na região do São do Francisco com efetivo de 51% do total de caprinos, destacando-se as cidades de Floresta e Petrolina que representa 26% do total. No sertão os polos mais produtivos estão localizados nas cidades de Sertânia, Custódia e Serra talhada com 13,45% dos animais. Em relação à ovinocultura as regiões mais produtoras são as cidades de Floresta, Dormentes e Petrolina para região do São Francisco, representando 23,30%, já no sertão, as cidades de Afrânio, Serra Talhada, Custódia, Sertânia, Santa Cruz e Parnamirim são responsáveis por 21,63% do total de animais no estado.

Principais raças Caprinas e Ovinas difundidas no Nordeste do Brasil

Raça caprina Anglo Nubiana



Figura 01. Caprino da raça Anglo-Nubiana. Fonte: João Neto.

Pertencente às raças do tronco das cabras Asiáticas-Africanas, sendo originária da Inglaterra, a Anglo Nubiana (Figura 01) é resultante do cruzamento de cabras comuns Inglesas com bodes Nubianos, importados da Núbia, Índia e Arábia. O resultado foi uma raça rústica de dupla aptidão (carne e leite). Essa raça é explorada em vários países e foi introduzida no Brasil por volta do ano de 1932 (BERRO, 2010).

Os animais desta raça são rústicos e prolíficos, de grande porte, com pelos curtos e pele variada, sendo aceito qualquer cor para efeito de registro genealógico. Suas orelhas são longas, de implantação alta sua pele é solta, predominando a cor escura, da mesma forma que as mucosas (RIBEIRO, 1997).

Raça caprina Boer



Figura 02. Caprino da raça Boer. Fonte: João Neto.

Os caprinos que deram origem a atual raça Boer (Figura 02) foram encontrados em regiões da África e da Ásia, e apresentavam porte inferior ao animal moderno tal qual conhecemos. O Boer é um animal de porte médio, com cabeça forte, pelos brancos com a cabeça e orelhas vermelhas. São muito resistentes e adaptáveis a diversos tipos de climas. Uma das principais características de seleção para a raça é a gestação de partos duplos que levam em média de 148 a 149 dias. O abate é realizado entre cinco e nove meses onde esses animais jovens apresentam uma carne de excelente qualidade, atingindo um peso final entre de 38 kg a 43 kg, sendo 25 kg de carcaça. Dentre as raças caprinas, o Boer consegue atingir o melhor peso entre os caprinos jovens comercializados (ABCBoer, 2017).

Raça ovina Dorper



Figura 03. Ovino da raça Dorper. Fonte: Google imagens.

A raça Dorper (Figura 03) é originária da África do Sul, a partir do ano de 1942, foram realizados cruzamentos de carneiros da raça Dorset Horn com ovelhas Blackhead Persian. Após oito anos desses cruzamentos, criadores e técnicos em ovinocultura, realizaram a escolha do nome da raça. Para padrões de registro da raça, o Dorper deve apresentar uma cabeça de forma triangular, forte e longa, o pescoço deve ser de comprimento médio, largo, bem inserido no quarto dianteiro, o peito moderadamente largo, profundo e ligeiramente proeminente em relação às paletas, os membros anteriores devem ser bem posicionados em relação ao corpo, com bons aprumos, o quarto traseiro deve ser musculoso, a garupa deve ser larga e longa, os membros traseiros, bem aprumados, fortes e distantes entre si (ARCO, 2018). Deve possuir também um temperamento calmo e uma aparência vigorosa, deve ser robusto e bem musculoso, produzindo carne mais eficiente possível.

Raça ovina Santa Inês



Figura 04. Ovino da raça Santa-Inês. Fonte: Google imagens.

A raça Santa Inês (Figura 04) foi desenvolvida no nordeste brasileiro com aptidão para carne, resultante do cruzamento intercorrente das raças Bergamácia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos sem raça definida (SRD). Possuindo características oriundas da seleção realizada por técnicos e criadores através da sua genealogia, a raça foi selecionada para total ausência de lã. Esses animais possuem pelos curtos e sedosos, de grande porte com média de peso para os machos entre 80 e 120 kg e para as fêmeas de 60 a 90 kg. Os animais apresentam excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura, rústicos, precoces, adaptável a qualquer sistema de criação e as mais diversas regiões do país, as fêmeas são prolíferas e com boa habilidade materna. E sua pelagem pode variar de vermelho, preta, branca e suas combinações (ARCO, 2018).

O uso de Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético Animal

A utilização dos marcadores moleculares vem se tornando uma prática rotineira no melhoramento genético animal, para o conhecimento da diversidade dos genes das espécies, confirmação de genealogias duvidosas, testes de paternidade, assessoramentos em acasalamentos dirigidos e seleção assistida por marcadores (DE VRIES et al., 1998).

Um marcador de DNA é tipicamente uma pequena região do DNA apresentando polimorfismo entre indivíduos (LIU, 1998). O termo “marcador” tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permite o estudo comparativo de genótipos.

Curi (2004) classifica os marcadores de duas formas: Diretos, sendo aqueles que codificam proteínas, atuando nas características fenotípicas de interesse, quer seja pela função de própria proteína, ou por sua atuação como intermediário em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo, contribuindo, assim, para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de controle da função gênica. E indiretos, que são marcadores que estão próximos aos genes de interesse, tendo como exemplo, marcadores microssatélites e os “*Quantitative Trait Loci*” (QTLs).

As proteínas e isoenzimas foram os primeiros marcadores utilizados, seguidos pelo Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), Variação do Número de Repetições em *Tandem* (VNTR), que constituem os minissatélites e os microssatélites, e pelo Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP). No entanto, esses marcadores não apresentam um uso comum, possuindo características distintas utilizáveis em aplicações específicas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A utilização dos marcadores moleculares para investigação do polimorfismo existente nos genes que estão relacionados às características de interesse econômico são técnicas bastante utilizadas dentro da genética molecular. Com análises mais detalhadas dos genes, podemos diferenciar os alelos que tenham associação positiva com características de interesse (AZEVEDO, 2014). A utilização dessas informações dentro do melhoramento genético animal, tem como vantagem principal, a utilização direta da informação do material genético para realização da seleção, possibilitando eficiência da mesma e diminuindo o tempo na avaliação dos animais. (REGO NETO, 2017).

O termo polimorfismo é definido como uma variante genética presente na população com uma frequência maior que 1%, variantes da sequência de DNA que estão presentes em uma frequência menor que 1% na população são chamadas de mutação.

Dentro de uma espécie, nos cromossomos homólogos pode haver diferentes versões de mesma sequência de nucleotídeos (SCHAFER, 1998).

Muitas variantes podem existir em um determinado *locus*, algumas delas são evidentes, porque afetam o fenótipo, já outras estão ocultas, por não ter efeito visível (LEWIN, 2001). Os polimorfismos atuam como marcadores genéticos, sendo transmitidos e associados a genes localizados na região cromossômica ou próximos a eles. Tais polimorfismos são responsáveis pela diversidade das espécies, pois distintos fenótipos são decorrentes de distintos polimorfismos (OLSSON et al., 2001).

A maneira mais eficiente de tornar visível o polimorfismo dos genes por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Segundo Nicholas (2011), a PCR se tornou uma das ferramentas mais eficientes dentro da biologia molecular. Desenvolvida no ano de 1985, por Kary Mullis, e colaboradores, a PCR é utilizada intensamente em pesquisas e também aplicada em diagnósticos e na detecção de determinados genes (favoráveis ou danosos) para os animais domésticos.

A PCR (Figura 05) gera cerca de um milhão de fragmentos de um pequeno segmento de DNA molde, quantidade suficiente para permitir que esse segmento seja clonado ou sequenciado. Para realização da PCR é necessário conhecer a sequência do segmento que se deseja amplificar ou, pelo menos, a sequência de cada extremidade do segmento. Empregando-se essa referência sobre sequências, dois segmentos de nucleotídeos chamados de Oligonucleotídeos, oligos, ou iniciadores (em inglês, *primers*), devem possuir cerca de 20 pares de bases de comprimento. Os *primers* são sintetizados artificialmente, e todas as fitas de DNA sintetizadas durante a PCR tem sequência dos *primers* na extremidade 5' e a sequência complementar aos primers na posição 3'. (NICHOLAS, 2011).

A técnica de PCR tem sido uma ferramenta de alta confiabilidade para o desenvolvimento e o progresso na produtividade dos rebanhos, auxiliando programas de melhoramento genético animal, que tem como objetivo o aumento e lucratividade da produção animal.

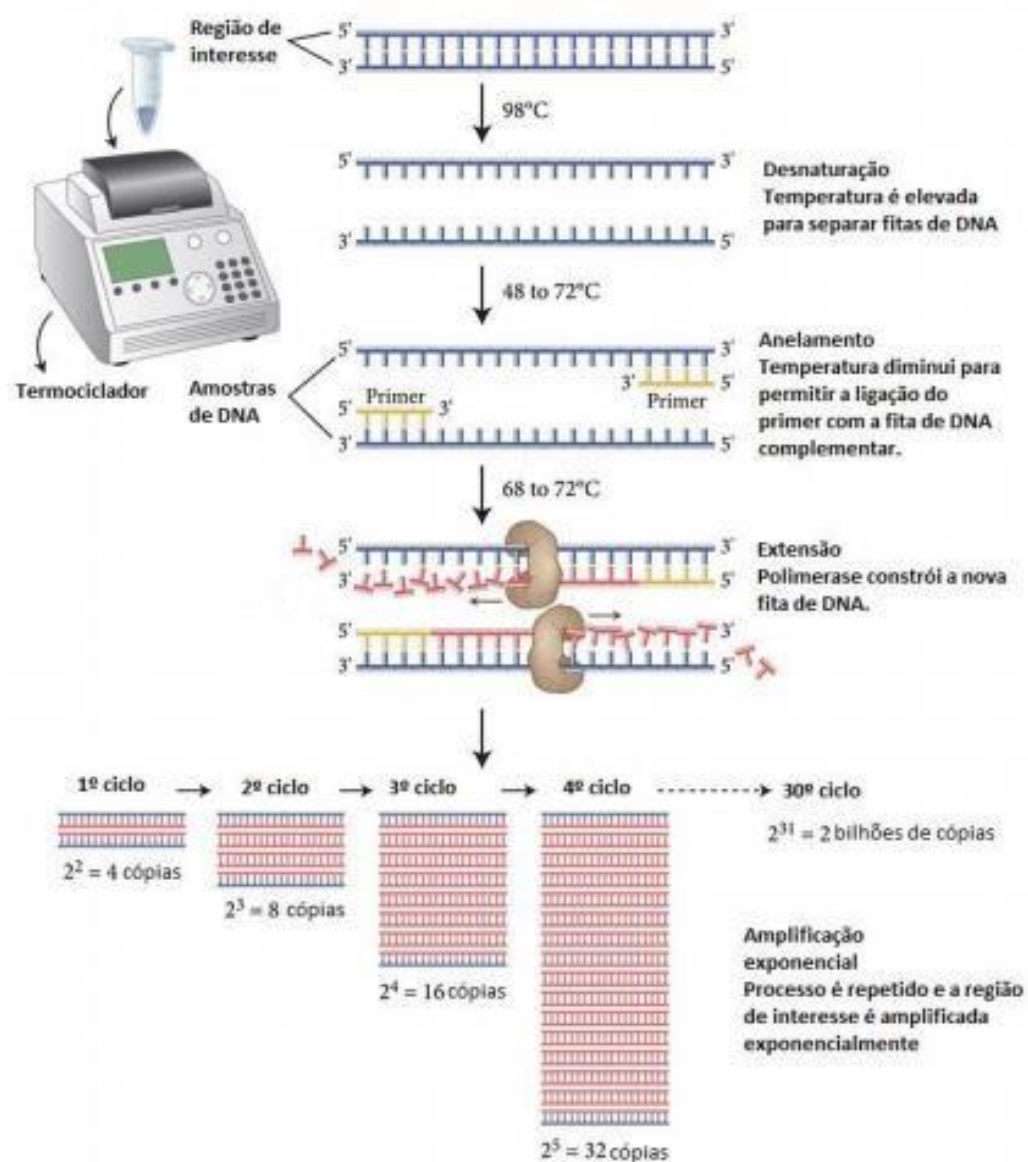


Figura 05. Esquematização da técnica de PCR. Fonte: adaptada da New England BioLabs.

Gene da Leptina

A leptina tem origem do termo grego (*leptos* = magro), é um hormônio que através de um sinal endócrino informa para o sistema regulador da alimentação, o tamanho das reservas energéticas, substratos utilizados e o balanço energético ligando a energia, utilizada como combustível, com a quantidade. Possuindo, portanto, um papel fisiológico no mecanismo que adapta o comportamento alimentar as necessidades energéticas, de acordo com estoques de energia (LEWANDOWKI, 2006).

A leptina é uma adipocitocina (substância, secretada pelas células do tecido adiposo), considerada como um sinal adipostático ao cérebro e aos tecidos periféricos sobre o balanço energético e as reservas corporais em mamíferos (CATUNDA, et al 2014).

A leptina é uma proteína formada de 167 aminoácidos, com uma estrutura, que consiste em um complexo de hélices, sendo identificada, pela primeira vez em camundongos como produto de gene designado *OB* (obeso), possuindo duas cópias defeituosas (genótipo *ob/ob*) uma forma mutante do gene. Após a sua produção, a leptina é secretada na corrente sanguínea (LEWANDOWKI, 2006). O gene da leptina humana localiza-se no cromossomo 7.

A leptina tem um papel fundamental na regulação da homeostasia energética, sendo produzida predominante pelo adipócito. Atuando como sinalizadora da massa gorda presente no organismo, que está relacionado com o controle e balanço dos lipídeos nos tecidos não adiposos, na ingestão alimentar e termogênese, com subseqüentes implicações metabólicas (LAU et al., 2014).

A produção e segregação de leptina normalmente acontecem no tecido adiposo, porém, podendo também ser sintetizada em muitos outros sítios, como na placenta, ovários, musculo esquelético, estômago, células epiteliais da glândula mamária, medula óssea, hipófise e fígado (CATUNDA, et al 2014). Seus níveis circundantes são correlacionados fortemente com as reservas de tecido adiposo, ou seja, o aumento da adiposidade aumenta a produção de leptina, e consecutivamente, sua redução está associada à diminuição de massa gorda (ZHANG et al., 1994).

A expressão do gene da leptina no tecido subcutâneo abdominal em humanos teve correlação positiva entre a leptina e o índice de massa corporal (CONSIDINE et al., 1996).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca da associação de genes da leptina com características zootécnicas de interesse econômico, Kumar et al. (1998) e Soares et al. (2006), investigaram a expressão do mRNA gene da obesidade (ob) em ovinos e suínos, respectivamente.

O SNP *LEP* – 1620 (A/G) (GenBank 11369), localizado na posição 70 do íntron 2 do gene da leptina (LIEN, 1997), foi relacionado positivamente com o peso ao desmame da raça nelore e com características de produção leiteira em bubalinos (COSTA, 2015; SOUZA, 2010).

Duas variantes distintas da leptina podem ser produzidas por animais, dependendo do genótipo, Leptina-C e Leptina-T, o genótipo CC produz apenas Leptina-C, e igualmente para a Leptina-T, enquanto o genótipo CT produz ambas as variantes. Presume-se que apenas a variante Leptina-C é reconhecida pelos receptores de leptina, e a Leptina-T não é reconhecida, os níveis elevados no sangue desta variante não resultam em envios de sinais para supressão do apetite. Essa variação deve-se a uma substituição de Timina (T) por Citosina (C) (BUCHANAN et al., 2002).

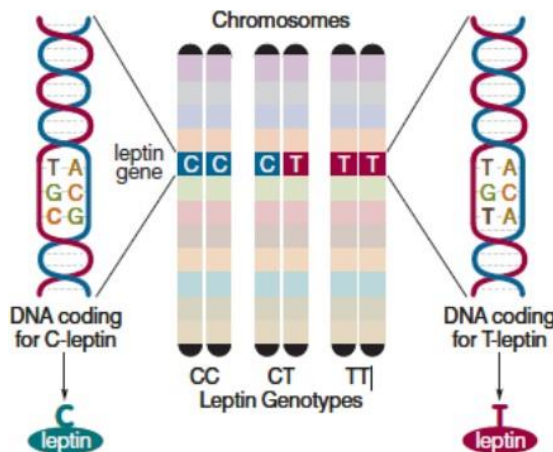


Figura 06. Genótipo da Leptina. Fonte. Western Dary Digest (2004).

Marcadores moleculares relacionados a uma melhor qualidade de carne vêm sendo desenvolvidos, as informações obtidas do genótipo do animal, vem possibilitando a identificação e seleção de animais com características produtivas mais apropriadas, em idade precoce (LANDI, 2011).

Woronuk et al. (2012) investigaram três variações a partir da substituição de uma citosina por uma timina, e relataram que o polimorfismo (CT) na leptina existente nos

bovinos demonstram um impacto nas características das carcaças, já os animais com polimorfismo CC precisavam de mais dias para atingir os 12 mm de gordura lombar (45 dias), os CT, 42 dias e os TT, 38 dias. Os resultados revelaram o polimorfismo genético da leptina e sua contribuição para a deposição de mais ou menos gordura em bovinos de corte. Outro estudo relatou que animais (bovinos) com genótipo TT tinham maior deposição de gordura intramuscular do que os de polimorfismo CT e CC (MCEVERS et al., 2012).

O gene da leptina é bastante associado a características de interesse na produção animal, mais investigações relacionadas a esse gene são necessárias, principalmente para as espécies ovinas e caprinas, como uma forma de auxiliar na seleção precoce dos animais.

Gene do Receptor da Leptina

Os receptores da leptina são encontrados de duas formas, a longa (OB-RL) e a curta (OB-RS). A forma longa está presente em várias regiões do cérebro e a forma curta nos demais tecidos (adiposo, gástrico, gônadas, placenta e etc). O OB-RL é encontrado no núcleo arqueado, dorsomedial, ventromedial e paraventricular do hipotálamo, regiões chave do controle do apetite (COSTA, 2001).

A função principal dos receptores do hormônio da leptina é desencadear estímulos celulares na presença do hormônio específico, no caso desses receptores apresentarem alguma alteração, não haverá resposta à ação hormonal, o que irá comprometer a função fisiológica do indivíduo (ABUB et al, 2017).

O RNA do receptor da leptina (Ob-R) foi isolado pela primeira vez em camundongos. Tais resultados mostraram que a leptina se liga com alta afinidade nesta região, sugerindo que este seja o local de expressão do receptor da leptina (TARTAGLIA et al., 1995).

Em mamíferos, foram descritos duas isoformas de OB - R: a forma longa (OB - RL) com padrão de expressão mais restrito, que inclui o núcleo hipotalâmico, importante para a regulação do peso corporal. E a curta (OB – RS), nessa segunda há uma possível evidência, dessa forma está envolvida com o transporte e eliminação da leptina, entretanto, sua função escala permanece desconhecida. Porém, a isoforma OB – RL tem sua ação conhecida como receptor hipotalâmico (WHITE, 2000).

Em bovinos o gene do receptor de leptina foi mapeado e descrito no cromossomo 3 com 20 exons (PFISTER-GENSKOW et al., 1997) possuindo homologia de 84% com

as sequências de humanos e 78% com as dos camundongos TARTAGLIA et al., 1997; CHEN et al., 1996).

Caso ocorra uma mutação gênica envolvendo a alteração em um único par de bases numa determinada região do gene do Receptor da Leptina (G→T), ocorrerá à troca de aminoácidos, de treonina (ACT) para metionina (ATG). Tais alterações podem modificar as funções da proteína e interferir na eficiência reprodutiva dos indivíduos.

Alguns estudos do polimorfismo do RecLep para raças bovinas foram realizados e seus resultados foram associados com características de crescimento, carcaça e a ocorrência de precocidade sexual em fêmeas bovinas (ABUD et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Assim, o estudo de possíveis associações de características produtivas com mutações no gene receptor de leptina permitirá a sua utilização para seleção precoce de animais, porém, até momento nenhum trabalho foi descrito com esse gene para espécies caprinas e ovinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas amostras de sangue de 14 reprodutores (oito ovinos e seis caprinos) da EAIP (Tabelas 2 e 3), em dezembro de 2017. Cada amostra continha 5 ml de sangue periférico, coletadas por punção da veia jugular, utilizando-se tubos *vacutainer*, devidamente identificados com o número de registro de cada animal. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C no Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Todas as análises laboratoriais foram realizadas nos meses de janeiro e fevereiro do corrente ano.

Tabela 2. Amostras dos reprodutores caprinos e ovinos da EAIP.

AMOSTRAS	RAÇA	REGISTRO
01	Dorper	215
02	Dorper	274
03	Boer	-
04	Santa Inês	276
05	Dorper	233
06	Dorper	267
07	Santa Inês	207
08	Anglo Nubiano	05010/14022
09	Santa Inês	235
10	Anglo Nubiano	063
11	Boer	1400
12	Boer	14017

Tabela 3. Amostras dos reprodutores caprinos e ovinos da EAIP.

AMOSTRA	RAÇA	REGISTRO
01	Dorper	215
02	Dorper	274
03	Boer	-
04	Dorper	233
05	Santa Inês	207
06	Anglo Nubiano	05016/14022
07	Santa Inês	235
08	Anglo Nubiano	063
09	Boer	1400
10	Boer	14017
11	Anglo Nubiano	-
12	Santa Inês	175
13	Anglo Nubiano	4014
14	Dorper	171
15	Dorper	128

Extração do DNA genômico

O DNA total foi extraído seguindo o protocolo padrão de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI), com poucas modificações (SAMBROOK et al., 1989). Em cada amostra foram adicionados 700µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, 1% SDS) e 30µL de Proteinase K (10µg/mL). Em seguida as amostras foram incubadas a 50°C por 2 horas e depois a 37°C por 12 horas. Posteriormente o DNA foi purificado sucessivamente com FCI (25:24:1), clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a cada etapa a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Para a remoção final do excesso de sal e etanol o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol

a 70% e brevemente centrifugado (10.000 g por 5 min). O DNA foi re-suspendido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado no freezer a -20°C.

A concentração de DNA total foi estimada em espectrofotômetro *NanoVue Plus*™ (GE Healthcare). A qualidade e integridade foram verificadas a partir da análise da razão OD260/OD280 e pela eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (Figura 07). A visualização foi realizada com o auxílio de transiluminador UV.

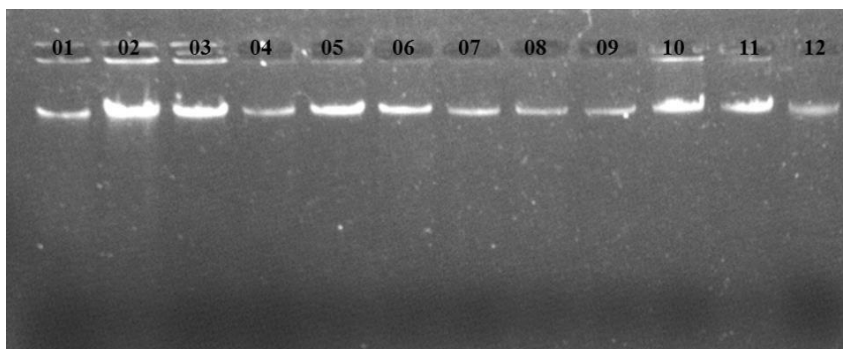


Figura 07. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das amostras de DNA dos reprodutores caprinos e ovinos da EAIP. Amostras: 01 (Dorper), 02 (Dorper), 03 (Boer), 04 (Santa Inês), 05 (Dorper), 06 (Dorper), 07 (Santa Inês), 08 (Anglo Nubiano), 09 (Santa Inês), 10 (Anglo Nubiano), 11 (Boer) e 12 (Boer).

Amplificação dos genes da leptina (LepI2) e do receptor de leptina (RecLep)

Todos os *primers* (Tabela 4) foram amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as reações foram conduzidas utilizando-se as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5min; 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento por 30s, extensão a 72° C por 1 min e extensão final a 72° por 4 min. Cada reação continha 1U de *Taq* polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 1µM de cada primer e 100ng de DNA para um volume final de 10 µL.

Em seguida os produtos gerados pelas PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio. Um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) foi utilizado para estimar o tamanho fragmento.

Tabela 4. Sequências dos *primers* da da leptina (LepI2) e do receptor de leptina (RecLep) .

<i>Primer</i>	<i>Sequencia (5' - 3')</i>	<i>T° anelamento</i>	<i>Tamanho pb</i>	<i>Referência bibliográfica</i>
LepI2	F: GTCTGGAGGCAAAGGGCAGAGT R: CCACCACCTCTGTGGAGTAG	58°C	522	LIEN et al. (1997).
RecLep	F: ACCACACCTTCCGTTCTCAG R: GGGACAACACTCTTGACTC	52°C	164	KAWACHI et al., (2007).

Técnica de PCR- RFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição).

Gene da Leptina (LepI2)

Para realização da PCR- RFL, utilizou-se uma reação contendo 10 µL produto da PCR amplificada para o gene da leptina de todas as amostras, 0,5 µL da enzima de restrição *BsaAI*, 0,5 µL do tampão da enzima 10X e 8,0 µL de água ultrapura, em um volume final de 19 µL.

Em seguida as amostras foram submetidas a 37°C por 3 horas, para a digestão do fragmento. Posteriormente os produtos de digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi utilizado para estimar o tamanho fragmento.

Gene do receptor de leptina (RecLep)

Para realização da PCR- RFL, utilizou-se uma reação contendo 5 µL produto da PCR amplificada para o gene do receptor de leptina de todas as amostras, 1 µL da enzima de restrição *HinfI*, 1,5 µL do tampão da enzima 10X e 2,5 µL de água ultrapura, em um volume final de 10 µL.

Em seguida as amostras foram submetidas a 37°C por 3 horas, para a digestão do fragmento. Posteriormente os produtos de digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi utilizado para estimar o tamanho fragmento.

Para o gene RecLep foi feita também uma análise do gene pelo software GeneRunner v.3.01 (HASTINGS SOFTWARE, 1994) para confirmação do corte gerado pela enzima *HinfI* (anexo I).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Gene da Leptina (LepI2) cortados com a enzima de restrição *BsaAI*

O gene da leptina foi amplificado para todas as amostras analisadas, exceto para amostra 02, obtendo-se fragmentos de 522pb (Figura 08). Através da técnica de RFLP foi possível identificar apenas o genótipo homozigoto AA corresponde ao fragmento de 522 pb não digerido (Figuras 9 e 10). Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos encontrados por Maitra et al., (2014), que analisaram o polimorfismo do gene LepI2 em cabras indianas e observaram uma maior frequência de genótipos homozigotos AA.

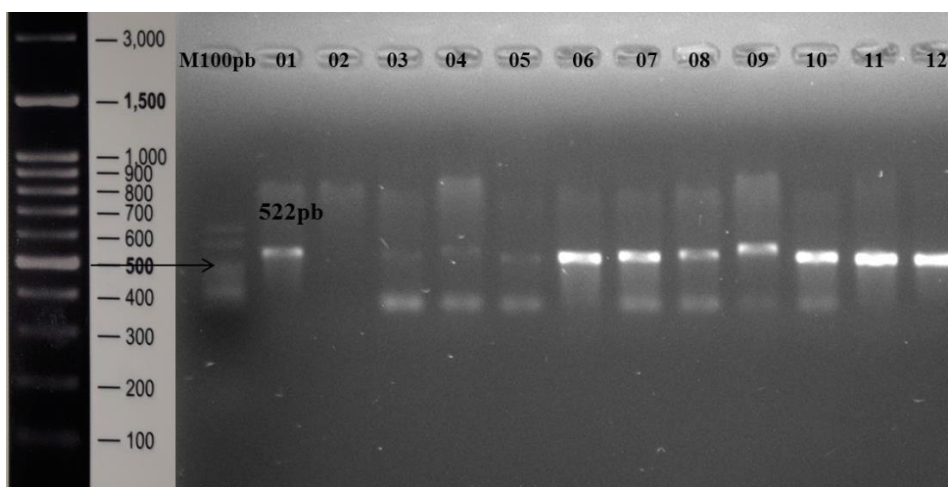


Figura 08. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 (522pb). M= Marcador 100pb; Amostras: 01 (Dorper), 02 (Dorper), 03 (Boer), 04 (Santa Inês), 05 (Dorper), 06 (Dorper), 07 (Santa Inês), 08 (Anglo Nubiano), 09 (Santa Inês), 10 (Anglo Nubiano), 11 (Boer) e 12 (Boer).

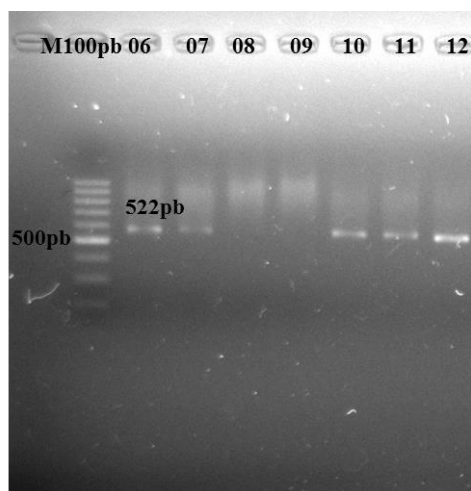


Figura 09. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 cortados com a enzima *BsaAI* (522pb). M= Marcador 100pb; Amostras: 06 (Anglo Nubiano), 07 (Santa Inês), 08 (Anglo Nubiano), 09 (Boer), 10 (Boer), 11 (Anglo Nubiano) e 12 (Santa Inês).

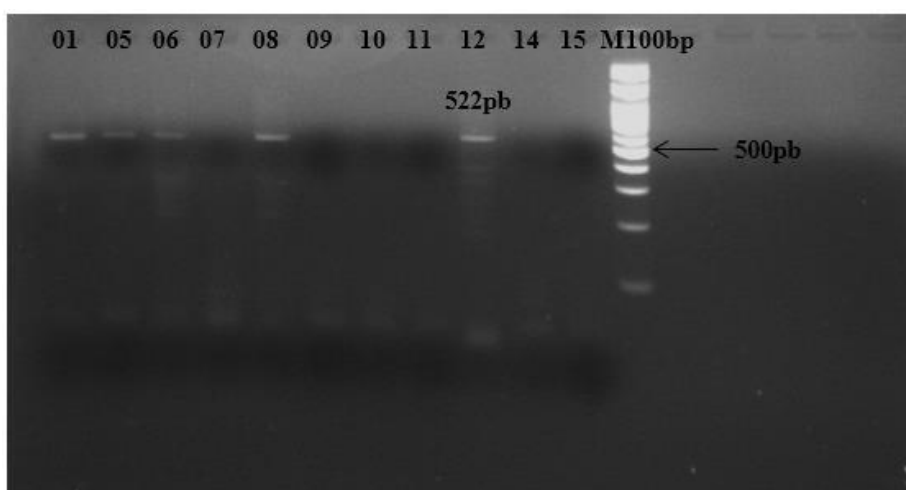


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR do gene da LepI2 cortados com a enzima *BsaAI* (522pb). M= Marcador 100pb; Amostras 01 (Dorper), 05 (Santa Inês), 06 (Anglo Nubiano), 07 (Santa Inês), 08 (Anglo Nubiano), 09 (Boer), 10 (Boer), 11 (Anglo Nubiano), 12 (Santa Inês), 14 (Dorper) e 15 (Dorper).

Todavia, diferem dos encontrados por COSTA (2015), que investigou o polimorfismo do gene LepI2 em uma pesquisa com 139 búfalas dos estados de Pernambuco e Alagoas, e obteve três genótipos diferentes: AA (522pb), AG (522, 441 e 81pb) e GG (441 e 81pb) e AZARI et al (2012) que avaliaram o polimorfismo do mesmo gene em três populações animais (vacas holandesas, bovinos nativos e búfalos) que obtiveram maior frequência do genótipo AG.

A expressão do genótipo heterozigoto (AG) do gene LepI2 (SNP *LEP-1620-A/G*), localizado na posição 70 do íntron 2 do gene da leptina está relacionado positivamente com o peso ao desmame e a deposição de gordura em ruminantes, já em bubalinos esse

gene está associado com características de produção leiteira (COSTA, 2015; SOUZA, 2010).

O interesse pelo polimorfismo do gene da leptina para caprinos e ovinos é uma ferramenta importante no auxílio do melhoramento genético, visto que, é um gene amplamente associado a características de interesse em ruminantes. Muitos estudos foram publicados para outros polimorfismos desse gene (*National Center for Biotechnology Information Search database* – NCBI), porém, fazem-se necessárias mais investigações desse gene para caprinos e ovinos, a fim de encontrar possíveis associações entre seus polimorfismos e as características produtivas de relevância.

4.2 Gene do receptor de leptina (RecLep) cortados com a enzima de restrição *HinfI*

O gene do receptor de leptina foi amplificado para todas as amostras analisadas, obtendo-se fragmentos de 164pb (Figura 11). Através da técnica de RFLP foi possível identificar apenas indivíduos com polimorfismo CC (103 pb) (Figura 12), o que não ocasionou a substituição do nucleotídeo C→T (anexo I), não alterando o aminoácido treonina→metionina e assim sua isoforma do receptor com porção citoplasmática longa (RecLep-b).

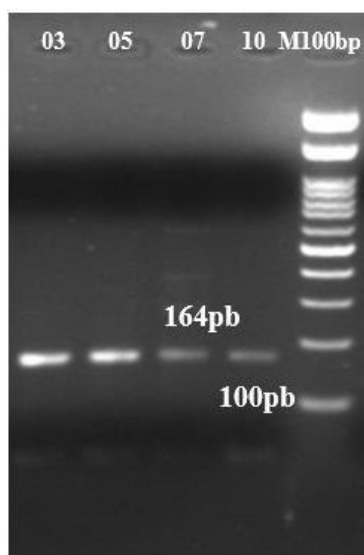


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produtos de PCR do gene da RecLep (164 pb). Marcador de 100pb; Amostras: 03 (Boer), 05 (Santa Inês), 07 (Santa Inês) e 10 (Boer).

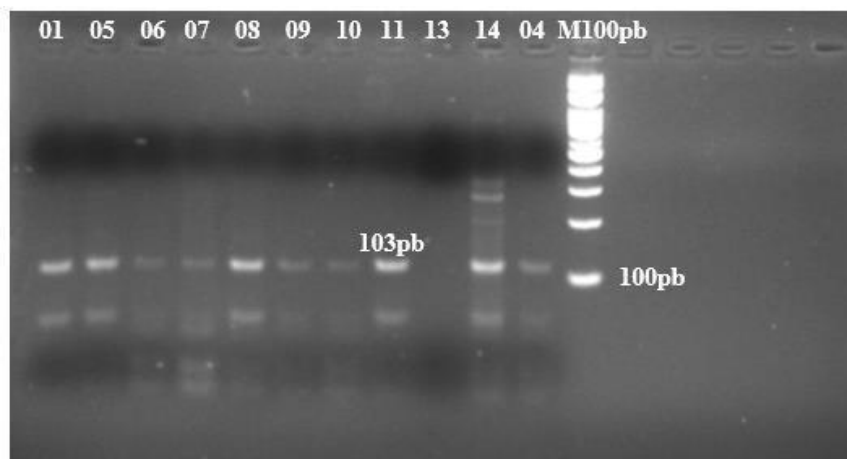


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produtos de PCR do gene do RecLep cortados com a enzima *HinfI* (103pb). M= Marcador 100pb; Amostras: 01 (Dorper), 05 (Santa Inês), 06 (Anglo Nubiano), 07 (Santa Inês), 08 (Anglo Nubiano), 09 (Boer), 10 (Boer), 11 (Anglo Nubiano), 13 (Anglo Nubiano), 14 (Dorper) e 04 (Dorper).

Resultados parecidos foram encontrados por Abud et al., (2017), quando avaliaram o polimorfismo do gene RecLep para 56 animais da raça Nelore e encontraram 80,35% (45 animais) com polimorfismo CC e, com os descritos por Nascimento et al., (2012) e Silva et al., (2012), que analisaram esse mesmo polimorfismo para animais Nelore, e encontraram os valores de 77, 3% e 72, 7% de polimorfismo CC. Todos os referidos autores relacionaram em seus estudos o polimorfismo do gene RecLep com características de crescimento, carcaça e a ocorrência de precocidade sexual em fêmeas Nelore.

Caso ocorra uma mutação gênica envolvendo a alteração em um único par de bases numa determinada região do gene do Receptor da Leptina (C - T), ocorrerá à troca de aminoácidos, de treonina (ACT) para metionina (ATG). Tais alterações podem modificar as funções da proteína e interferir na eficiência reprodutiva dos indivíduos.

O polimorfismo CC parece está relacionado a características produtivas positivas para os ruminantes, porém, devem ser realizados mais estudos para compreender melhor esse polimorfismo presente no genoma dos caprinos e ovinos.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse estudo, concluiu-se que o polimorfismo encontrado para o gene do RecLep está relacionado positivamente com características zootécnicas de interesse.

Análises genéticas a partir de marcadores moleculares fornecem informações sobre o polimorfismo de alguns genes de interesse comercial, auxiliando na seleção precoce de indivíduos geneticamente superiores. A integração das técnicas moleculares com as metodologias tradicionais utilizadas no melhoramento genético animal, irá resultar em melhorias na produção do rebanho, permitindo, por exemplo, um menor intervalo entre gerações com aumento do ganho genético.

Porém, fazem-se necessárias mais investigações do polimorfismo desses genes em espécies caprinas e ovinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, L. J.; ABUD, C. O. G.; FIORAVANTI, M. C. S.; MELO, E. O.; ARNHOLD, E.; PAULINI, F.; SERENO, J. R. B. Polimorfismo do exon 20 do gene do receptor da leptina e concentrações séricas de leptina em novilhas nelore criadas a pasto. *SCIENTE, Agracia Paranaensis*. v. 16, N. 4, P. 443-448. Paraná, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAPRINOS BOER. 2017. Disponível em: <<http://portaldoboer.com.br/downloads/abcboer>> ACESSO EM: 12/04/2018.

AZEVEDO, A. S. Análise de polimorfismo dos genes da miostatina e da leptina e sua associação com características de carcaça de animais Santa Inês e cruzamentos com Dorper. Campos dos Goytacazes – RJ, 2014.

BERRO, 2010. Disponível em <www.revistaberro.com.br>http://www.caprinocultura.com.br/site/anglo_nubiano.php> Acesso no dia 15 de março de 2018.

BONNET, E. et al. Evidence that micro RNA, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*. Nov. 22; 20 (17): 2911 – 7. 2004.

BUCHANAN, F. C.; VAN KESSEL, A. G.; WALDNER, C.; CHRISTENSEN, D. A.; SCHMUTZ, S. M. Hot topic: an association between a leptin nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86 (10), 3164-3166, 2002.

CATUNTA, A. G. V.; LIMA, F. R. G.; LIMA, I. C. S.; MACHADO, A. A. C.; GADELHA, C. R. F.; PEREIRA, G. A.; CAMPOS, A. C. N. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 18, n.1, p. 3-9, jan./fev., 2014.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L. A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S. J.; LAKEY, N. D.; CULPEPPER, J.; MOORE, K. J.; BREITBART, R. E. DUYK, G. M.; TEPPER, R. I.; MORGENSTERN, J. P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, Cambridge, v.84, p.491-495. 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em <<https://www.conab.gov.br>> Acesso em 15 de fevereiro de 2018.

CONSEDINE, R. V.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNASA A.; STEPHENS, T. W.; NYCE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.*, February. 1996.

CURI, R. A. Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoces. Botucatu – SP, 2004.

- DE VRIES, A. A. et al. The role of maior genes and DNA technology in selection for meat quality pigs. *Meat science*, 49 (Supplement 1) a 245, 1998.
- FAO, Food and Agriculture Organization, (2014). Disponível em: <<http://faostat.fao.org.br>> Acesso em 15 de fevereiro de 2018.
- FERREIRA, M. E.; GRTTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 3ª edição.
- GOLDSTEIN, D. B.; CAVALLERI, G. L. Understanding human diversity. *Nature*, v. 437, p. 1241-1242. 2005.
- GUIMARÃES, D. E. D. Adipocitocinas uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de Nutrição*. V. 20, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Pesquisa Pecuária Municipal*. 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin.>> Acesso em: 06 Agosto. 2018.
- KUMAR, B.; FRANCES, M. S.; SUTTIE, J. M.; THOMPSON, M. P. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. *Comp Bio chem Physiol B Biochem Mol Biol*, v.120, 1998.
- LANDI, V. Q. V. Los Avances De Las Nuves Tecnologias Genéticas Y Su Aplicación Animal. 2011.
- LAU, E.; FREITAS, P.; OLIVEIRA, A. I.; CARVALHO, D. A leptina e o seu impacto metabólico nas lipodistrofias. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 9 (1), 36-40. 2014.
- LEWIN, BENJAMIN. *Genes VII*. Editora ARTMED. P. 39-42. São Paulo, 2001.
- LIU, B. H. Statistical genomics linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton CRC Press. Boca Raton. 1998.
- MCEVERS, T. J.; DORIN, L. C.; BERG, J. L., ROYAN, G. F.; HUTCHESON, J. P.; APPEYARD, G. D.; LAWRENCE, T. E. Effect of leptin genotype and zilpaterol hydrochloride supplementation on the growth rate and carcass characteristics of finishing steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 93 (2). 2012.
- NASCIMENTO, A. V.; CRISPIM, B. A.; SILVA, L. E.; BANARI, A. C. SENO, L. O.; GRISOLIA, A. B. Precocidade sexual em fêmeas da raça Nelore e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene receptor da leptina. *Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Anais... Dourados – MS*, 2012.
- OLSSON, M. L. ET AL. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood*; 98 (5):1585-93, 2001.

PASSOS, D. T. Efeito de polimorfismos no gene LEP na expressão da leptina em adipócitos de bovino de corte. Porto Alegre – SC, 2006.

REGO NETO, A. A. et al. Estrutura e distribuição geográfica do rebanho de ovinos Santa Inês no Estado do Piauí. Revista Brasileira Saúde animal. Salvador, v.15, n.2, p.272-280 abr./jun., 2014.

REGO NETO, A. A. Estrutura genética e associação genômica ampla para características de tamanho corporal em ovinos da raça Santa Inês. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí. Teresina – Piauí, 2017.

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

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grealina na gênese da obesidade. Revista Nutrição, v. 19, jan./fev., 2006.

SALMAN, A. K. D.; GIACHETTO, P. F. Identificação de polimorfismos no gene da leptina bovina. Porto Velho – RO, dezembro de 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998.

SILVA, N. M. V.; RIBEIRO, M. N.; ROCHA, L. L.; GOMES FILHO, M. A.; LIMA, A. P. S. Polimorfismo genético e do receptor do hormônio do crescimento em caprinos. 2011.

SILVA, R. C. G.; FERRAZ, J. B. S.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; BALIEIRO, J. C. C.; CUCCO, D. C.; RESENDE, F. M.; SILVA, S. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v.11, n. 4, p. 3721-3728, 2012.

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

TARTAGLIA, L.A., DEMBSKI, M., WENG, X., DENG, N., CULPEPPER, J., DEVOS, R., RICHARDS, G.J., CAMPFIELD, L.A., CLARK, F.T., DEEDS, J., MUIR, C., SANKER, S., MORIARTY, A., MOORE, K.J., SMUTKO, J.S., MAYS, E.A., WOLF, E.A., MONROE, C.A., TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell, v.83, p.1263-1271. 1995.

VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul. Ciência Rural, Santa Maria, RS, Dezembro de 2008.

WHITE, D. W. et al. Identification of leptin – induced transcripts. Diabetes, v. 49, p. 1443-1450, 2000.

WORONUK, G. N.; MARQUES, F. L.; JAMES, S. T.; PALMER, J.; BERRYERE, T.; DEOBALD, H.; KONONOFF, P. J. Association of leptina genotypes with beef cattle characteristics. *Animal Genetic*, 43 (5). 2012.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994.