

GENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE

Luciana Correia de Almeida Regitano¹

Gisele Batista Veneroni²

Gustavo Gasparin²

¹Embrapa Pecuária Sudeste

Rodovia Washington Luiz, km 234

Cx.P. 339. CEP 13560-970.

São Carlos – SP. luciana@cnpq.embrapa.br

²UFSCar Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução

A genética molecular experimentou um extraordinário avanço desde a descoberta do DNA. Este avanço incluiu o desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e função do material genético, de equipamentos com capacidade para análise automatizada de grande quantidade de amostras, de métodos estatísticos e de ferramentas de informática, resultando na ciência conhecida como genômica.

Esses avanços culminaram com o desenvolvimento dos projetos de sequenciamento do genoma de um grande número de espécies. O sequenciamento do genoma do bovino teve sua primeira versão em julho de 2005, onde um mapa genético com aproximadamente 4.000 marcadores foi publicado, o que significa dizer que todos os intervalos de todos os cromossomos dos bovinos possuem pelo menos um ponto de referência. Em outubro de 2007 foram publicados resultados preliminares da última versão do genoma bovino (Btau_4.0). Foram sequenciados 3.247.500.072 pares de base, contendo 11.232 genes que codificam proteínas conhecidas e 2.057.872 SNPs (BIRNEY et al., 2006). Essa versão já está disponível no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As informações geradas pelos projetos genoma permitiram, por exemplo, o mapeamento de mais de 1.600 mutações responsáveis por características de herança Mendeliana em humanos. Em bovinos, dezenas de doenças hereditárias tiveram seu mecanismo molecular desvendado. Porém, o desafio de elucidar os mecanismos determinantes da variação genética de características mais complexas, entre as quais figura a

maioria das características de interesse econômico dos animais domésticos, permanece (Georges & Andersson, 2003). Essas características são, em geral, controladas por muitos genes, que podem resultar em complexas interações alélicas e não alélicas, e são influenciadas pelo ambiente. Diversos estudos têm demonstrado a possibilidade de mapear cada gene ou bloco de genes adjacentes que influenciam uma característica quantitativa, denominados QTL (Quantitative Trait Loci), em ruminantes.

O mapeamento de QTLs, ou seja, a detecção, localização e estimativa do efeito de regiões do genoma associadas à uma característica quantitativa, requer um grande número de animais para os quais sejam disponíveis dados de avaliação do fenótipo de interesse. O número de indivíduos necessários depende da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade do caráter, da estrutura da população, entre outros fatores, porém, esse número é freqüentemente da ordem de milhares. Esse requisito é particularmente restritivo em bovinos, nos quais os custos de produção e manutenção para se obter grandes populações experimentais são elevados.

As populações comerciais têm sido úteis para o mapeamento de QTL em bovinos de leite, onde grandes progênies de touro, resultantes do uso intensivo de inseminação artificial, podem ser encontradas. Georges & Andersson (2003) apontam como vantagem para o mapeamento de QTLs em gado leiteiro, a intensa anotação de dados referentes à avaliações fenotípicas tais como medidas de qualidade do leite, da saúde do animal, avaliações morfométricas e da anotação de informações de pedigree e de manejo, principalmente nos países mais desenvolvidos.

Essa situação, entretanto, não se aplica aos bovinos de corte, onde as famílias são menores e a quantidade de características fenotípicas avaliadas é restrita. Além disso, características de difícil avaliação, tais como taxa de ovulação, maciez da carne e resistência à doenças raramente são consideradas em programas de melhoramento, requerendo a utilização de populações experimentais, as quais devem ser obtidas utilizando algum delineamento genético, tais como F₂, retrocruzamento ou famílias de meio-irmãos.

Por outro lado, o mapeamento de QTLs em bovinos beneficia-se do reduzido tamanho efetivo das populações, pois a maioria das raças são formadas a partir de um pequeno número de animais fundadores. Esse fato leva à redução da complexidade das características dentro de raças, uma vez que poucos alelos estão representados na população. Outra consequência importante do pequeno tamanho efetivo é que os blocos de desequilíbrio de ligação (LD),

regiões do cromossomo que mantêm combinações ancestrais de alelos para os genes ligados, são mais extensos, em comparação com outras espécies, o que aumenta a probabilidade de se encontrar associações entre os alelos de um marcador e de um QTL. Do ponto de vista de melhoramento, a utilização de um pequeno número de indivíduos selecionados para dar origem à próxima geração, leva a um inevitável aumento de endogamia e aumenta a possibilidade da progênie de receber regiões do genoma que são idênticas por descendência dos parentais. Regiões estas que podem conter alelos recessivos deletérios, ou seja, que causam doenças, malformações ou anomalias hereditárias.

Apesar das dificuldades relacionadas ao mapeamento de QTLs em ruminantes, várias características já tiveram parte de sua variação atribuída à regiões do genoma dos bovinos. QTLs para produção e composição do leite foram mapeados no cromossomo 14 (Coppieters et al., 1998), no cromossomo 6 (Zhang et al., 1998), entre outros, para taxa de ovulação nos cromossomos 7, 10 e 19 (Arias & Kirkpatrick, 2004), para área de olho de lombo nos cromossomos 5 e 6, para marmoreio nos cromossomos 17, 23 e 27, para maciez da carne no cromossomo 29 (Casas et al., 2000; Casas et al., 2003). Holmberg et al. (2006) realizaram uma varredura de 20 cromossomos bovinos, utilizando 145 microssatélites e mapearam 13 QTLs sugestivos nos cromossomos 1, 3, 4, 18, 19, 22 e 25 para características reprodutivas. Em relação à resistência a patógenos há poucos resultados na literatura, mas Hanotte et al. (2003) mapearam um QTL para tripanotolerância e vários QTLs para resistência ao carrapato estão sendo descritos em uma família de geração F2 produzida pelo cruzamento de Gir e Holandês (Regitano, Martinez e Machado, 2006).

Os primeiros resultados de mapeamento fino de QTLs, ou seja, a identificação da mutação responsável pela variação fenotípica ou QTN (Quantitative Trait Nucleotide), têm sido descritos (Grisart et al., 2001; Wilson et al., 2001; Blott et al., 2003; Li et al., 2004).

Atualmente, a identificação de regiões do genoma associadas à características de interesse econômico recebeu um importante reforço via utilização da técnica de microarranjo, que possibilita a análise de milhares de polimorfismos de base única, denominados SNPs, de uma só vez. Essa metodologia fornece uma alternativa rápida e confiável para análises de múltiplos SNPs. Já existem estudos de microarranjos associados com características economicamente importantes como o trabalho desenvolvido por Kamiński et al. (2006) que utilizaram um microarranjo de SNPs de genes envolvidos na biossíntese de proteínas do leite e encontraram 4 SNPs associados com características de

leite em vacas holandesas. Daetwyler et al. (2008), usando um chip de 9.919 SNPs, encontraram regiões nos cromossomos 3, 5 e 16 para produção de leite, no 14 e 19 para produção de gordura, no 1, 3, 16 e 28 para produção e proteína, no 2 e no 13 para precocidade reprodutiva e no cromossomo 14 para idade ao primeiro serviço. Druet et al. (2008), em um estudo com bovinos holandeses, encontraram um QTL altamente significativo para fertilidade no cromossomo 3, utilizando um arranjo com 1373 SNPs.

Alguns testes comerciais para bovinos de corte já estão disponíveis (Van Eenennaam, 2004). O teste GeneSTAR Marbling (Genetic Solutions) é um polimorfismo da região que precede a seqüência do gene da tireoglobulina, proteína que desempenha papel fundamental na regulação da síntese de ácidos graxos. O alelo 3 desse marcador, caracterizado pela seqüência GATT, foi associado com marmoreio em confinamentos comerciais da Austrália. Esta associação foi confirmada nos Estados Unidos em cruzamentos Simental x Angus pelo Consórcio de Avaliação Nacional de Gado de Corte (NBCEC). No entanto Rincker et al. (2006), em um trabalho com bovinos da raça Simental, submetidos a uma dieta de alta energia, não encontraram associação deste marcador com deposição de gordura intramuscular e, este polimorfismo no gene da tireoglobulina não foi associado com outra característica de carcaça e parâmetros de desempenho. Esse resultado foi atribuído, dentre outras coisas, à raça, pois raças diferentes de bovinos podem expressar diferentemente genes e tipo de manejo. Outro marcador comercialmente disponível para marmoreio é o IgenityTML (Merial), que também afeta o apetite dos animais. Esse teste avalia uma variação na região codificadora do gene da leptina. Esse gene passou a ser considerado candidato à associação com características de deposição de gordura por ter sido relacionado à obesidade em camundongos.

Além desses, testes indicativos de maciez também estão disponíveis: o teste TenderGENE TM, que analisa duas variações na região codificadora do gene da calpaína, enzima responsável pela degradação das fibras musculares; o teste GeneSTAR Tenderness, que se baseia em um polimorfismo da calpastatina, proteína responsável pela modulação da degradação pos-mortem das fibras musculares pela calpaína. Esses testes são atualmente oferecidos pela Pfizer. Outros estudos têm focalizado a identificação de novos SNPs nesses genes com o intuito de, no futuro, constituir novos testes. Um exemplo foi o estudo de Juszczuk-Kubiak et al. (2008) que identificaram SNPs no intron 12 do gene da calpastatina. Outras características que afetam a produção animal também têm sido alvo de

desenvolvimento de testes com marcadores moleculares, comercialmente disponíveis, como por exemplo características relacionadas a eficiência alimentar. Estudos de parentesco, paternidade e de identificação individual também já possuem testes comerciais como é o caso do SireTRACE™ DNA Profiling também pertencente a Pfizer Animal Genetics, entre outros.

A utilização desses testes deve ser avaliada com cautela pois, uma vez que os efeitos de substituição de alelos de um QTL são parâmetros intrínsecos de cada população, os efeitos desses genótipos podem variar entre as populações. É possível, por exemplo, que apenas um dos alelos do gene em questão esteja presente na população em que se pretende aplicar o teste. Além disso, há que se considerar a existência de interações não alélicas com os demais genes que compõem o genoma da espécie, que podem exibir combinações diferentes daquelas em que o QTL foi descrito.

Outra questão importante a ser considerada é a interação com o ambiente. Assim, os QTLs mapeados em experimentos conduzidos no hemisfério norte podem não ser importantes para as condições ambientais de criação nos trópicos que são distintas do ponto de vista climático, de incidência de doenças e de manejo nutricional.

A seleção assistida por marcadores (MAS) tem por objetivo aumentar a acurácia da seleção. Porém, quando se utiliza MAS, apenas alguns dos genes que contribuem para a variação do caráter selecionado estão sendo avaliados. Assim, a utilização de informação de genótipo para o marcador sem considerar as avaliações de DEPs pode conduzir à rápida fixação do alelo QTL selecionado e à maior perda de variabilidade durante o processo de seleção. A MAS deve ser realizada concomitantemente com a Seleção Tradicional, pois dar grande ênfase a somente um marcador poderá ocasionar perda da variabilidade em outros locos (impede futuras seleções), efeito carona e fixação de alelos desfavoráveis. Na Figura 1, pode-se verificar o aumento da eficácia da seleção quando a seleção tradicional é complementada pela MAS.

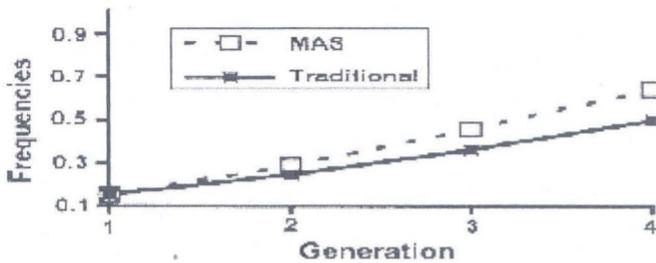


Figura 1. Frequência dos genótipos favoráveis para a característica selecionada ao longo das gerações, considerando seleção apenas com base no fenótipo (Tradicional) e seleção assistida por marcadores (MAS)

Segundo Eeennaam (2004), os benefícios da MAS são maiores para características que tem baixa herdabilidade, são difíceis ou caras para mensurar, não podem ser medidas até depois que o animal já tenha contribuído para dar origem à próxima geração, não são selecionadas atualmente por não serem medidas habituais. Outras características que podem ser beneficentemente selecionadas com MAS são produção de leite, habilidade materna, resistência a doenças, rendimento de carcaça, performance de crescimento, fertilidade, eficiência reprodutiva e características limitadas pelo sexo.

Os maiores avanços na área de MAS deverão ser experimentados quando as novas tecnologias de análise de marcadores, tais como microarranjos de DNA, que permitem a investigação simultânea de um grande número de marcadores, chegarem ao mercado à um custo compatível com a aplicação. Nesse caso, a seleção será feita com base no genoma do animal, e não mais baseada em informações pontuais de poucos genes.

Alguns locos que controlam características monogênicas, de herança mendeliana, também estão sendo usados em ensaios de diagnósticos diretos ou indiretos. Exemplos desses testes são apresentados na Tabela 1. Há disponível on line (<http://omia.angis.org.au/>) um banco de dados denominado “Online Mendelian Inheritance in Animals” (OMIA) que contém informações 135 espécies animais, dentre elas o boi, o porco, o cavalo, a ovelha e a galinha. Dentre essas informações podemos destacar a listagem de características controladas por um único loco, sendo que algumas já possuem marcadores moleculares característicos. Em bovinos, por exemplo, encontra-se disponível informações de 72 características controladas por um loco e, algumas doenças encontram-se dentre esses

dados.

Com base no exposto, podemos concluir que a utilização de MAS traz muitas vantagens como: Permitir a predição do valor genético para características que são difíceis de medir previamente, permitindo sua inclusão no critério de seleção; Pode-se determinar o efeito individual de cada loco de um carácter quantitativo; Conseguem-se determinar quanto de um carácter quantitativo é explicado por um ou mais marcadores; Não é necessário o desenvolvimento completo do indivíduo para que se possa realizar seleção; Permite a seleção para características difíceis de serem medidas ou, difíceis de conseguir progresso genético, devido a baixa herdabilidade; Permite a identificação e descarte de animais portadores de doenças deletérias ou que diminuem a produção; Não sofre a influência do ambiente.

Talvez a maior contribuição do mapeamento de QTLs ainda esteja por ser alcançada. Aliadas às técnicas de análise do genoma funcional e da genômica comparada, as informações sobre QTLs deverão rapidamente nos conduzir à descoberta de genes e de QTNs. A compreensão dos mecanismos biológicos e do controle genético das características de interesse será um campo aberto para a manipulação da expressão de genes, quer via transgênese, quer via técnicas de expressão transitória tais como a de RNA de interferência.

Tabela 1. Exemplos de caracteres de herança simples para os quais é possível realizar diagnóstico molecular

Locos ^m	Cromossomo	Característica	Referência
CD18 (2 -integrina)	BTA1	BLAD	Shuster et al. 1992
TG	BTA14	Hipotiroidismo congênito	Ricketts et al. 1987
(MH) Miostatina	BTA2	Hipertrofia muscular	Grobet et al. 1997
SLC35A3	BTA13	Malformação vertebral complexa	Agerholm et al. 2001
MC1R (receptor do hormônio estimulante de melanócito)	BTA18	Cor da pelagem	Klungland et al. 1995

- SNPs identified by arrayed primer extension (APEX) microarray. *Anim Biotechnol.* 2006;17(1):1-11
- KLUNGLAND, M. E., VAGE, D. I., GOMEZ-RAYA, L., ADALSTEINSSON, S., LIEN, S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome*, v.6, p.636-639. 1995
- Li, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W.M.; et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on chromosomes 2, 5, 6, 19, 21 and 23 in a comercial line of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science*, v.82, p.967-972. 2004.
- MEUWISSEN, T. Genomic selection: the future of marker assisted selection and animal breeding. In: Marker assisted selection: a fast track to genetic gain in plant and animal breeding? Session II: MAS in animals. FAO Eletronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture: Conference 10. <http://www.fao.org/biotech/Conf10.htm>. 2003.
- VAN EENENNAAM, A. Marker assisted selection in beef cattle. http://repositories.cdlib.org/anrrec/sfrec/2004_marker_assisted_selection_in_beef_cattle. (Consultado em agosto de 2004).
- REGITANO, L. C. A., MARTINEZ, M. L. AND MACHADO, M. A. Molecular aspects of bovine tropical adaptation. In: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Abstracts. CDROM., Belo Horizonte, Brazil, 2006.
- RICKETTS, M.H, SIMONS, M.J., PARMA, J., MERCKEN, L., DONG, Q., VASSART, G. A nonsense mutation causes hereditary goiter in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.84, p.3181-3184. 1987.
- RINCKER, C. B., PYATT, N.A., BERGER, L.L. AND FALKHER, D.B. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J. Anim. Sci.* v.84, p.686-692. 2006.
- SHUSTER, D. E., KEHRLI, M. E., ACKERMANN, M.R., GILBERT, R. O.. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, p.9225-9229. 1987.

WILSON, T.; WU, X.; JUENGEL, J. L. et al. Highly Prolific Booroola Sheep Have a Mutation in the Intracellular Kinase Domain of Bone Morphogenetic Protein IB Receptor (ALK-6) That Is Expressed in Both Oocytes and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1225–1235, 2001.

ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I. et al. Mapping Quantitative Trait Loci for Milk Production and Health of Dairy Cattle in a Large Outbred Pedigree. *Genetics*, v.149, p. 1959–1973, August, 1998.