

- Kappes S.M.; Keele J.W.; Stone R.T.; McGraw R.A.; Sonstegard T.S.; Smith T.P.; Lopez-Corrales N.L.; Beattie, C.W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, 7(3):235-49, 1997.
- Massey, J.M. & Georges, M. Genmark's approach to marker-assisted selection. **Animal Biotechnology**, 3: 95-109, 1992.
- Mullis, K. B.. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, 262: 36 - 42, 1990.
- Ron, M.; Band, M.; Yanai, A.; Weller, J. I. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. **Animal Genetics**, 25: 259-264, 1994.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985.
- Tanksley, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, 27: 205-233, 1993.
- Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17: 6463-6471, 1989.
- Thoday, J.M. Location of polygenes. **Nature**, 191: 368-370, 1961.
- Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol.**, 34: 275-305, 2002.
- Wiggans, G.R. National genetic improvement programs for dairy cattle in the United States. **Journal of Animal Science**, 69 (9):3853-60, 1991.
- Wilson, T.; Wu, X.Y.; Juengel, J.L.; Ross, I.K.; Lumsden, J.M.; Lord, E.A.; Dodds, K.G.; Walling, G.A.; McEwan, J.C.; O'Connell, A.R.; McNatty, K.P.; Montgomery, G.W. 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**, 64: 1225-1235, 2001.

## Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento animal

Luciana Correia de Almeida Regitano

Embrapa Pecuária Sudeste

### Introdução

O melhoramento animal tem sido responsável por mudanças significativas na produção e na qualidade dos produtos de origem animal. Uma linhagem de frango de corte de 1999 chega a ser três vezes mais pesada do que uma linhagem de 1957 sob a mesma dieta e na mesma idade (Haley, 1995). A taxa de crescimento da produção anual de leite por vaca tem aumentado nos últimos anos na América do Norte. Os valores de DEP de fêmeas nascidas em 1986 foram aproximadamente 135 kg superiores aos das fêmeas nascidas em 1981 (Wiggans, 1991).

Nos últimos 10 anos, com os desenvolvimentos metodológicos e científicos alcançados pelos projetos genoma humano e de espécies modelo, surge a possibilidade de se utilizar ferramentas moleculares para auxiliar o melhoramento animal. Aliadas às metodologias tradicionais, as novas técnicas deverão aumentar ainda mais o progresso genético que vem sendo observado em animais domésticos. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes mesmo da expressão do seu fenótipo.

Projetos de mapeamento genômico em animais domésticos aliados ao mapeamento comparativo deverão fornecer as bases para a manipulação do genoma dos animais de acordo com as necessidades e exigências do mercado. Em bovinos, mapas de ligação compostos por cerca de 3.600 marcadores posicionados com média de intervalos inferior a 2,5 centimorgan (Bishop et al., 1994; Barendse et al., 1997; Kappes et al., 1997; <http://locus.jouy.inra.fr>) permitem o mapeamento de genes envolvidos na herança de caracteres quantitativos (QTLs).

Apesar do evidente progresso alcançado na tecnologia genômica e da identificação de várias regiões cromossômicas responsáveis pela herança de algumas características já se sabe que, na realidade, a questão do mapeamento de QTLs é complexa em virtude das variações da fase de ligação marcador-QTL entre populações, da presença de epistasia e da magnitude dos efeitos, que precisam ser suficientes para justificar sua aplicação no melhoramento animal. A identificação e clonagem dos QTLs em si já pode ser vislumbrada por recentes resultados (Wilson et al., 2001; Blott et al., 2003), o que deve contribuir para solucionar parte desse problema. Além disso, a aplicação de marcadores moleculares no diagnóstico de doenças hereditárias, na identificação individual e na verificação de parentesco vem deixando sua contribuição como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento.



## Tipos de marcadores moleculares

Marcadores genéticos são características de herança mendeliana simples que possibilitam a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, permitindo que a segregação do gene marcador seja acompanhada. A análise de segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador. Inicialmente, as características disponíveis para esse tipo de análise eram as mutações que produziam alterações morfológicas, como o nanismo, a ausência de asas em *Drosophila* e a ausência de pêlos em camundongos. Entretanto, tais mutações são pouco freqüentes nas populações naturais, nas quais a maior parte da variação genética é de caráter contínuo (Tanksley, 1993). Além disso, mutações como as citadas acima, freqüentemente comprometem a adaptação do indivíduo, o que reduz sua utilidade em estudos de comparação entre populações.

Com o desenvolvimento de métodos de análise do DNA, a possibilidade de caracterizar as variações individuais na seqüência do material genético permitiu uma grande ampliação do leque de marcadores genéticos para incluir diferentes tipos de marcadores moleculares, classificados de acordo com a natureza da variação observada.

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica foi desenvolvida por Mullis, em 1983 (Mullis, 1990), mas sua importância só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação da PCR em diagnóstico de doenças (Saiki *et al.*, 1985). A técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase termoestável, em presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos ou "primers", complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. A técnica possibilita o estudo de quantidades ínfimas de DNA em um reduzido espaço de tempo, desde que se conheça parte da seqüência a ser analisada.

Os polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLPs) são marcadores geralmente dialélicos, resultantes da variação do número de cortes efetuados por determinada enzima de restrição em função do número de sítios de restrição presentes ao longo da molécula de DNA. Essa variação é o resultado de mutações de ponto, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinada enzima, podendo também resultar de eventos de inserção ou de deleção entre dois sítios de restrição adjacentes. Esses marcadores foram originalmente analisados pela técnica de "Southern blot" e sua identificação passava por uma longa etapa de desenvolvimento de sondas e teste destas contra um painel de DNA de diferentes indivíduos tratados com diversas endonucleases de restrição até a identificação de combinações polimórficas. A partir de sua caracterização, é possível transformar um marcador RFLP tradicional em um PCR-RFLP, bastando para isso desenvolver "primers" complementares à região que flanqueia o sítio polimórfico de restrição.



Uma classe de marcadores de grande importância em genética animal são os microssatélites ou SSR (simple sequence repeats). Esses marcadores caracterizam-se por repetições em *tandem* de um a cinco nucleotídeos, amplamente distribuídos pelo genoma, localizadas dentro de regiões de seqüência única. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). O intenso polimorfismo está relacionado a diferenças no número de repetições presentes em diferentes alelos, provavelmente resultantes de erros no deslocamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA.

Os microssatélites podem ser amplificados de maneira específica pela técnica de PCR, utilizando *primers* que contêm parte da seqüência flanqueadora. A amplificação resulta em produtos de diferentes tamanhos, em função do número de cópias da seqüência repetitiva delimitada pelos *primers*. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos microssatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente. Entretanto, sua elevada freqüência, ampla distribuição pelo genoma e alto conteúdo de polimorfismo fazem dos microssatélites marcadores ideais para mapeamento, identificação individual e verificação de relações de parentesco.

Recentemente, com a automação dos métodos de sequenciamento do DNA, uma nova categoria de marcadores vem ganhando destaque, os polimorfismos de um nucleotídeo ou SNP (single nucleotide polymorphism). O polimorfismo resulta de mutações de ponto que podem ser transições, transversões, inserções ou deleções. Sua detecção pode ser feita por sequenciamento, PCR alelo-específico, hibridação alelo-específica em chips de DNA ou espectrometria de massa. Alguns SNPs podem ser também convertidos em PCR-RFLP, quando a mutação de ponto altera um sítio de restrição (Vignal et al., 2002).

Apesar de geralmente dialélicos, os SNPs são marcadores atraentes por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma ou seqüência de interesse, como por exemplo, em genes candidatos à associação com uma característica. Outras características importantes são a maior estabilidade, quando comparados aos marcadores microssatélites.

Sua maior aplicação tem sido no mapeamento fino de QTLs, quando a informação de microssatélites na região que contém o QTL foi esgotada e os genes com possível papel fisiológico sobre a característica, contidos nessa região, foram identificados. Esses genes são analisados quanto à presença de SNPs que, uma vez encontrados, são avaliados quanto à associação com a característica fenotípica.

### **Diagnóstico de doenças hereditárias**

A aplicação de análise molecular para identificar mutações deletérias é de extrema utilidade, visto que muitas dessas mutações são recessivas e se encontram em baixa freqüência nas populações. A alternativa tradicional para a seleção de reprodutores livres de uma determinada mutação seria o teste de progênie com um número tanto maior de fêmeas:

quanto menor a frequência do alelo mutante na população. Com o diagnóstico molecular, é possível determinar se o animal é ou não portador dessa mutação antes mesmo do início da reprodução ou ainda, no caso de transferência de embriões, na seleção dos embriões a serem transferidos.

Alguns exemplos de mutações para as quais já existem testes diagnósticos com base na análise molecular são a Deficiência de Adesão dos Leucócitos (BLAD), a citrulinemia e a deficiência de uridina monofosfato sintetase (DUMPS), as quais acometem bovinos da raça Holandesa. As informações sobre o estado de portador ou não dessas mutações é disponibilizada pela maioria das empresas que comercializam sêmen de animais dessa raça. Com as informações geradas pelos projetos genoma humano e de espécies modelo, um grande número de doenças hereditárias dos animais domésticos têm tido sua etiologia esclarecida, o que possibilitará o desenvolvimento de testes diagnósticos moleculares. As principais doenças hereditárias dos animais são descritas no endereço <http://morgan.angis.su.oz.au>.

### **Verificação de parentesco**

A correta documentação das relações de parentesco entre os animais é fator fundamental para o sucesso do melhoramento animal, uma vez que a premissa básica da hereditariedade é a transmissão vertical dos caracteres, ou seja, os alelos favoráveis só serão transmitidos à progênie verdadeira dos reprodutores selecionados. Além disso, muitos dos métodos de estimativa do valor genético de um animal utilizam as informações de produção de parentes.

O controle genealógico é também uma prática que permite a manutenção de raças como *pools* gênicos isolados, sem efeitos de introgressão de genes de outras raças.

Marcadores moleculares são reconhecidamente eficazes para a identificação individual e verificação de parentesco, sendo tanto mais eficazes quanto mais polimórficos e reprodutíveis tecnicamente. A possibilidade de utilização da técnica de PCR para sua análise é um ponto importante para casos de investigação forense por viabilizar a análise de marcadores a partir de poucas moléculas de DNA, que podem ser obtidas a partir de praticamente qualquer tecido do indivíduo.

### **Mapeamento de QTLs**

A existência de genes principais, que contribuem com grande parte da variação fenotípica de um caráter quantitativo, tem sido demonstrada. Alguns exemplos são o gene da hipertrofia muscular (*mh*) em bovinos, a mutação no receptor da Ryanodina dos suínos e o gene de fertilidade (*Fec*) dos ovinos. Essa situação, entretanto, pode ser considerada como exceção uma



vez que a maioria dos caracteres quantitativos deve ser controlada por um grande número de genes, cada um com pequeno efeito sobre o caráter (Massey & Georges, 1992).

Thoday (1961) formulou a hipótese de que se a segregação de um gene marcador pudesse ser utilizada para identificar e estimar o efeito de um poligene, e se um número suficiente de marcadores estivesse distribuído pelo genoma de uma espécie, seria possível mapear e caracterizar todos os poligenes que afetam um caráter quantitativo.

Para alcançar esse objetivo, duas estratégias vêm sendo utilizadas. A primeira utiliza marcadores aleatórios para a construção de mapas genéticos saturados. Esses marcadores são então avaliados em estudos de correlação com características de interesse econômico e utilizados no mapeamento QTLs. O sucesso dessa estratégia depende primariamente da construção de mapas de ligação detalhados, com marcadores dispostos a intervalos inferiores a 20 cM. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso em diversos estudos, como o de Ron et al. (1994) no qual um QTL com um efeito de 0,2 desvios-padrões fenotípicos para produção de leite e 0,16 desvios-padrões para proteína total foi mapeado no cromossomo 21 dos bovinos. Georges et al. (1995), encontraram fortes evidências da presença de QTLs para características de produção de leite nos cromossomos 1, 6, 9, 10 e 20 dos bovinos. Os efeitos dos diferentes QTLs contribuíram com 11 a 52% da variância total dentro de famílias de meio-irmãos.

A segunda estratégia baseia-se na avaliação de polimorfismos em genes sabidamente importantes para a característica que se pretende estudar. Os animais são classificados quanto às variações genéticas observadas nesses genes (RFLPs, SNPs, polimorfismos de conformação) e a média de produção das diferentes classes genotípicas é comparada.

O principal requisito desta estratégia é o conhecimento da fisiologia da característica fenotípica que se deseja estudar. A principal limitação é que, apesar de haver grande volume de sequências conhecidas na maioria dos genomas de espécies domésticas, o número de genes com função conhecida ainda é reduzido. Essa limitação tem sido sobrepujada pela análise comparativa com genomas mais conhecidos.

A associação das duas estratégias é freqüentemente necessária para se obter o mapeamento fino e clonagem posicional do QTL. Resultados de estudos integrando estratégias de mapeamento por intervalos, genes candidatos, mapeamento comparativo e técnicas de análise de expressão gênica têm demonstrado a possibilidade de clonagem posicional de um QTL. Um exemplo elegante é o estudo conduzido por Wilson et al. (2001) que atribuiu o fenótipo de alta taxa de ovulação de ovelhas da linhagem Booroola à uma mutação no gene do receptor da proteína de morfogênese óssea (BMPR-IB).

## **Considerações finais**

Os primeiros esforços no sentido de identificar genes que controlam características de interesse econômico em animais foram limitados pela falta de marcadores genéticos informativos. Com o desenvolvimento da genética molecular, bons resultados vêm sendo

obtidos, demonstrando a existência de QTLs para diferentes características nos diversos cromossomos dos bovinos.

Os conhecimentos acumulados na área da genética molecular devem-se em grande parte ao desenvolvimento científico decorrente dos projetos de mapeamento do genoma humano. A utilização dessas informações por meio de mapeamento comparativo e homologia de seqüências têm contribuído, e deverá ser fundamental para futuro desenvolvimento dos projetos na área animal.

## Referências bibliográficas

- Barendse, W., Vaiman, D., Kemp, S.J., Sugimoto, Y., Armitage, J.L., Williams, J.L., Sun, H.S., Eggen, A., Agaba, M., Aleyasin, S.A., Band, M., Bishop, M.D., Buitkamp, J., Byrne, K., Collins, F., Cooper, L., Copettiers, W., Denys, B., Drinkwater, R.D., Easterday, K., Elduque, C., Ennis, S., Erhardt, G., Ferretti, L., Flavin, N., Gao, Q., Georges, M., Gurung, R., Harzilius, B., Hawkins, G., Hetzel, J., Hirano, T., Hulme, D., Jorgensen, C., Kessler, M., Kirkpatrick, B.W., Konfortov, B., Kostia, S., Kuhn, C., Lenstra, J.A., Leveziel, H., Lewin, H.A., Leyhe, B., Lil, L., Burriel, I.M., Mcgraw, R.A., Miller, J.R., Moody, D.E., Moore, S.S., Nakane, S., Nijman, I.J., Olsaker, I., Pomp, D., Rando, A., Ron, M., Shalom, A., Teale, A.J., Thieven, U., Urquhart, B.G.D., Vage, D.I., Van De Weghe, A., Varvio, S., Velmala, R., Vilkki, J., Weikard, R., Woodside, C., Womack, J.E., Zanotti, M., Zaragoza, P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, **8**:21-28, 1997.
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S.L.F., Hawkins, G. A., Toldo, S. S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., Beattie, C. W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, **136**: 619-639, 1994.
- Blott, S.; Kim, J.J.; Moio, S.; Schmidt-Küntzel, A; Cornet, A.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Ford, C.; Grisart, B.; Johnson, D.; Karim, L.; Simon, P.; Snell, R.; Spelman, R.; Wong, J.; Vilkki, J.; Georges, M.; Farnier, F.; Coppieters, W. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with major effect on milk yield and composition. **Genetics**, **163**: 253-266.
- Georges, M.; Nielsen, D.; Mackinnon, M.; Mishra, A.; Okimoto, R.; Pasquino, A.T.; Sargeant, L.S.; Sorensen, A.; Steele, M.R.; Zhao, X.; Womack, J.E.; Hoeschele, I. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, **139**: 907-920, 1995.
- Halley, C. S. Livestock QTLs – bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, **11**: 488 – 492, 1995.
- <http://locus.jouy.inra.fr> - INRA Biotechnology Laboratories Home Page. Consultado em maio de 2003.