

GENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO MELHORAMENTO

Luciana Correia de Almeida Regitano

Embrapa Pecuária Sudeste.

Rodovia Washington Luiz, km 234. Cx.P. 339.

CEP 13560-970. São Carlos – SP.

luciana@cnpse.embrapa.br

Introdução

A genética molecular experimentou um extraordinário avanço desde a descoberta do DNA, que 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 capazes de processar o imenso volume de dados produzido.

Esses avanços culminaram com o desenvolvimento dos projetos de sequenciamento do genoma de um grande número de espécies. As informações geradas permitiram, por exemplo, o mapeamento de mais de 1.600 mutações responsáveis por características de herança Mendeliana em humanos. O desenvolvimento na área animal também tem sido considerável. O primeiro rascunho dos genomas do bovino e do suíno foram anunciados em Outubro de 2004 e o sequenciamento completo deve ser concluído em 2005. Os mapas genéticos de bovinos, suínos e aves estão disponíveis em diversas bases de dados.

Entre as possíveis aplicações desses conhecimentos no melhoramento animal, podem ser destacadas: o diagnóstico de anomalias hereditárias, a verificação de parentesco e a seleção assistida por marcadores (MAS) para características quantitativas. O rápido desenvolvimento da área de biotecnologia da reprodução permite antever outras aplicações para um futuro próximo, tais como transferência de genes e modulação da expressão de genes individuais.

Diagnóstico de anomalias hereditárias

Alguns exemplos de seleção contra anomalias hereditárias monogênicas são anteriores ao desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico, tais como o teste da sensibilidade ao halotano, utilizado para identificar uma mutação no gene do receptor da rianodina (RYR), responsável pela síndrome do estresse dos suínos.

O desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular apresenta várias vantagens sobre os métodos baseados no fenótipo, entre elas, permitir a identificação de portadores, já que um grande número de anomalias hereditárias é de natureza recessiva ou ainda apresenta penetrância ou expressividade variável. Outra importante vantagem é possibilitar o diagnóstico precoce, até mesmo antes da implantação embrionária.

Um exemplo claro da contribuição do diagnóstico molecular de doenças hereditárias para o melhoramento é o da deficiência de adesão dos leucócitos dos bovinos (BLAD). A anomalia foi descrita por Shuster et al. (1992); caracterizada pela redução da expressão de beta-2 integrina, resultando em leucócitos anormais que não conseguem penetrar nos tecidos para destruir os agentes patogênicos. Animais homocigotos para esta mutação raramente sobrevivem, causando perdas significativas para produtores.

A aplicação do diagnóstico molecular resultou na redução do número de portadores de BLAD, entre os touros de centrais de inseminação dos Estados Unidos, de mais de 150, em 1988, para menos de cinco, em 1992 (Dekkers, 2004).

Outras doenças hereditárias dos bovinos como a deficiência de uridina monofosfato sintetase (DUMPS) e Citrulinemia também já podem ser diagnosticadas pela análise do DNA.

Em suínos, os diagnósticos moleculares para mutações dos genes RYR e RN têm sido utilizados rotineiramente para eliminação de características indesejáveis da carne.

Informações atualizadas sobre caracteres mendelianos em animais podem ser obtidas na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Animals* (OMIA), que pode ser acessada no endereço <http://www.angis.org.au/omia> (Nicholas, 2003).

Verificação de parentesco

A correta informação sobre as relações de parentesco entre os indivíduos é fundamental para a acurácia da seleção, principalmente nos casos em que a matriz de parentesco é utilizada na estimativa do valor genético do animal. Além disso, essa informação é também fundamental para o controle da endogamia da população.

Estimativas da taxa de erros de genealogia em programas de melhoramento de bovinos variam entre cinco e 30 % (Ron et al., 1996). Segundo esses autores, considerando 5% de erros na informação das genealogias, a aplicação de testes de paternidade em 100 filhas por touro em teste, a um custo de US\$ 5,00 por filha, traria saldos positivos em dez anos de programa de melhoramento e, em 20 anos representaria lucro superior a 2 milhões de dólares.

Entre os métodos disponíveis para verificação de parentesco, a análise de DNA é o mais eficiente, permitindo probabilidades de exclusão de paternidade superiores a 99,9%. Para a realização dos testes há necessidade de conhecer as frequências alélicas dos marcadores utilizados na população a que pertencem os indivíduos em disputa. A Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG) regulamenta exames com padrões internacionais para diversas espécies de animais domésticos, que recomendam quantos e quais marcadores devem ser utilizados para cada espécie.

A tendência de redução de custos, à medida que as técnicas de biologia molecular são aperfeiçoadas e que equipamentos automatizados permitem o processamento de amostras em maior escala, torna a aplicação de paternidade por análise de DNA mais próxima da rotina dos programas de melhoramento.

Seleção assistida por marcadores (MAS)

O melhoramento animal tem sido conduzido com base em conhecimentos teóricos sobre a herança dos caracteres quantitativos, sem que se conhecessem os genes responsáveis pela variação fenotípica das características sob seleção.

A hipótese de que seria possível mapear e identificar todos os genes envolvidos na herança de caracteres quantitativos ou QTLs (Quantitative trait loci) foi formulada na década de 1960, porém os recursos técnicos disponíveis à época limitavam sua execução.

Atualmente, as principais estratégias utilizadas para identificar esses genes são a abordagem do gene candidato, a varredura do genoma e a análise funcional.

A abordagem do gene candidato se baseia na avaliação de mutações em genes de interesse, que são escolhidos com base em conhecimentos de fisiologia, bioquímica, doenças genéticas ou estudos de inativação (knockout) gênica. A vantagem desse método é que se pode reduzir custos e tempo, mas tem a desvantagem de exigir conhecimento prévio dos genes. Muitas vezes, ao se focalizar a atenção em um determinado gene, o que se encontra é um efeito de ligação a outro gene próximo. Experimentos exaustivos podem ser necessários para se concluir se o efeito observado é relacionado ao próprio gene candidato ou a um desequilíbrio de ligação.

A varredura do genoma utiliza-se de marcadores à intervalos regulares de modo a permitir que, um QTL, situado em qualquer ponto do genoma, esteja posicionado entre dois marcadores e possa ter seu efeito identificado.

A análise funcional permite verificar se uma determinada mutação afeta ou não a função de um gene, se afeta a taxa de transcrição, de tradução, a afinidade do peptídeo correspondente por substratos, por receptores ou por seqüências regulatórias. Essa abordagem tem sido extremamente útil no mapeamento fino de QTLs, onde se procura identificar o gene e a variação de nucleotídeo responsável pelo fenótipo (QTN).

O mapeamento de QTLs, ou seja, a detecção, localização e estimativa do efeito de regiões do genoma associadas a 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 distância entre o marcador e o QTL, do delineamento genético, entre outros. Em animais domésticos beneficia-se do reduzido tamanho efetivo das populações, que leva à redução da complexidade das características em termos de heterogeneidade de alelos, aliada à uma maior extensão dos blocos de desequilíbrio de ligação (LD), em comparação com outras espécies.

Em bovinos de leite, as populações comerciais têm sido úteis para o mapeamento de QTLs em função da existência de grandes progênies de touro, resultantes do uso intensivo de inseminação artificial (Georges & Andersson, 2003). Outra vantagem para o mapeamento de QTLs em gado leiteiro é a intensa anotação de dados referentes à avaliações fenotípicas tais como medidas de qualidade do leite, da saúde do animal, avaliações morfométricas, principalmente nos países mais desenvolvidos. Essa situação, entretanto, não se aplica à bovinos de corte, onde as famílias são menores e a quantidade de características fenotípicas avaliadas é restrita. Em ambos os casos, 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.

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 características de crescimento e muscularidade nos cromossomos 5 (Machado et al., 2003; Casas et al., 2000), para marmoreio nos cromossomos 17, 23 e 27, para maciez da carne no cromossomo 29 (Casas et al., 2000; Casas et al., 2003).

Em ovinos, esforços de mapeamento de QTL vêm sendo conduzidos e alguns genes principais já foram descritos, como o *FecB*, associado à taxa de ovulação (Davis et al, 1982), e o gene *callipyge* (*CLPG*), associado à muscularidade (Cockett et al., 1994).

Tentativas de utilização de informações de QTLs em seleção assistida por marcadores são escassas em ruminantes. As raras citações referem-se ao uso de MAS para genes principais. Um exemplo foi o trabalho de um grupo de pesquisadores da Organização de Pesquisa em Agricultura de Israel (ARO), liderados por Gootwine, que obteve uma linhagem altamente prolífica da raça leiteira *Awassi fat-tail* pela introgressão de alelos B do gene *Fec^B*. Os pesquisadores utilizaram a linhagem Booroola da raça Merino como doadora. A introgressão foi assistida por marcadores flanqueadores do gene *Fec^B*, para os quais os alelos em fase de ligação com o alelo B eram raros na raça leiteira *Awassi fat-tail*, permitindo a pronta identificação dos homozigotos *Fec^BB Fec^BB* entre os produtos de inter cruzamento da terceira geração de retrocruzamento. A substituição de uma cópia do alelo B desse gene aumentou a média de desempenho produtivo na raça *Awassi fat-tail* em 0,6 borregos nascidos por fêmea em serviço (<http://www.agri.gov.il/AnimalScience/Reproduction/Rep-Gootwine2.html>).

Atualmente a mutação responsável pelo aumento da taxa de ovulação na linhagem Booroola encontra-se descrita (Wilson et al., 2001) de tal forma que seria possível realizar essa introgressão pela análise direta da mutação do gene responsável pela característica.

Em suínos e aves o panorama é mais favorável, não apenas em função da prolificidade e do menor intervalo entre gerações dessas espécies, mas também pelas diferenças relacionadas aos métodos de melhoramento, que se utilizam do cruzamento entre linhagens, e pelas características de produção, mais sintonizadas com a filosofia industrial.

Os suínos são os animais domésticos para os quais o maior avanço foi verificado na área, tendo sido descritos QTLs para características de crescimento, composição corporal, qualidade da carne, cor da pelagem, tamanho da ninhada, resistência à doenças, entre outros (Plastow, 2003; Dekkers, 2004). A seleção assistida por marcadores é uma realidade na indústria de suínos, que se utiliza de informações sobre genes candidatos para características de qualidade de carne, prolificidade e resistência à doenças. Nessa espécie é também notável a contribuição da abordagem do gene candidato, principalmente quando se considera os conhecimentos efetivamente transferidos para a indústria do melhoramento.

Parte dessa prevalência de genes candidatos nos programas de MAS se deve à diferenças nas estratégias de aplicação da informação de marcadores. Essa estratégia depende do tipo de relação entre o marcador e o gene responsável pela variação fenotípica da característica de produção. Quando o marcador é a própria mutação funcional, há um efeito direto, não havendo necessidade de considerar a possibilidade de recombinação nem a fase de ligação entre os alelos do marcador e do QTL. Quando o marcador não está diretamente relacionado à diferença de função, temos um efeito de ligação. Nesse caso a fase de ligação entre os alelos do marcador e do QTL deve ser determinada para cada população em que se pretende aplicar a MAS. Essa situação pode ser ainda agravada quando não há desequilíbrio de ligação na população. Nesse caso a probabilidade de associação de um alelo marcador com qualquer alelo do QTL é a mesma e a associação só pode ser verificada dentro de famílias (Dekkers, 2004).

Os efeitos de substituição de alelos de um QTL são parâmetros intrínsecos de cada população, podendo, por exemplo, não existir variação para o QTL em questão em uma dada população. 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, tanto do ponto de vista climático e de suas implicações como por exemplo, na incidência de doenças, quanto de manejo nutricional.

Os maiores benefícios da MAS são esperados para características em que a mensuração do fenótipo a ser selecionado ocorre após a época da seleção, tais como características reprodutivas e de produção de leite, ou características de difícil avaliação, como qualidade de carne e resistência a doenças. A máxima exploração dos benefícios dessa tecnologia será obtida por um balanço adequado entre os métodos quantitativos e moleculares. Ênfase excessiva à informação de marcadores poderá resultar em rápida fixação do QTL com perda da variabilidade correspondente à fração poligênica não explicada pelo QTL. Essa restrição pode não ser tão importante em programas de melhoramento

de linhagens, em que a variação quantitativa é mantida dentro da população base, e a ênfase sobre as informações de QTLs pode ser utilizada para acelerar a obtenção de linhagens com características particulares.

Perspectivas Futuras

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. Com os desenvolvimentos que as técnicas de cultivo de células, clonagem e fusão nuclear vêm experimentando, é possível antever o estabelecimento de células tronco de animais domésticos. Neste cenário, a compreensão dos mecanismos biológicos e do controle genético das características de interesse será um campo aberto para a manipulação da expressão de genes via transgênese.

Referências Bibliográficas

- Arias, J. and Kirkpatrick, B. Mapping of bovine ovulation rate QTL; an analytical approach for three generation pedigrees. *Anim. Genet.*, 35:7-13, 2004.
- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes, and M. Koohmaraie. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560-569, 2000.
- Casas, E.; Shackelford, S. D.; Keele, J. W.; Koohmaraie, M.; Smith, T. P. L.; Stone, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2976-2983, 2003.
- Cockett, N.E., Jackson, S.P., Shay, T.L., Nielsen, D.M., Moore, S.S., Steele, M.R., Barendse, W., Green, R.D., and Georges, M. Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3019-3023, 1994.
- Coppieters, W.; Riquet, J.; Arranz, J.J.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Grisart, B.; Karim, L.; Marcq, F.; Moreau, L.; Nezer, C.; Simon, P.; Vanmanshoven, P. Wagenaar, D.; Georges, M. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. *Mamm. Genome* 9: 540-544, 1998.
- Davis GH, Montgomery GW, Allison AJ, Kelly RW, Bray AR. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N. Z. J. Agric. Res.*, 25:525-529, 1982.
- Dekkers, J.C.M. Commercial application of marker-and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.*, 82, (E. suppl):E313-E328, 2004.
- Georges, M. & Andersson, L. Positional Identification of Structural and Regulatory Quantitative Trait Nucleotides in Domestic Animal Species. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LXVIII. Cold Spring Harbor Laboratory Press 0-87969-709-1/04, 2003.
- Machado, M. B. B.; Alencar, M. M. de; Pereira, A P; Oliveira, H. N de; Casas, E.; Coutinho, L. L.; Regitano, L. C. A. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 259-265, 2003.
- 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 Electronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture: Conference 10. <http://www.fao.org/biotech/Conf10.htm>, 2003.
- Nicholas, F.W. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals. *Nuc. Acids Res.*, 31: 275-277, 2003.
- Plastow, G.S. The Changing World of Genomics and its Impact on the Pork Chain. *Advances in Pork Production*. Volume 14, pg. 67, 2003.
- Ron, M., Blanc, Y., Band, M., Ezra, E., Weller, J.I. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J. Dairy Sci.* 79:676-681, 1996
- Shuster DE, Kehrl ME Jr, Ackermann MR, Gilbert RO Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9225-9229, 1992.
- Wilson, T.; Wu, X.; 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.
- Zhang, Q.; Boichard, D.; Hoeschele, I.; Ernst, C.; Eggen, A.; Murkve, B.; Pfister-Genskow, M.; Witte, L. A.; Grignola, F. E.; Uimari, P.; Thaller, G.; Bishop, M. D. Mapping Quantitative Trait Loci for Milk Production and Health of Dairy Cattle in a Large Outbred Pedigree. *Genetics* 149: 1959-1973, 1998.