



5 ADOTAR A GENÉTICA MOLECULAR

As biotécnicas moleculares compreendem a área da genética molecular que estuda a estrutura e a função dos genes no nível molecular e como estes são herdados; para isso, utilizam conhecimentos de genética clássica, estatística, bioquímica e biologia molecular.

A aplicação desses conhecimentos tem tornado possível o seu uso para a resolução de problemas encontrados no nosso dia a dia, como teste de paternidade pelo DNA, tanto para a espécie humana como para animais de produção, identificação de animais portadores de características indesejáveis (doença, pelagem etc.) e seleção de animais com características desejáveis. Para entendermos a aplicação desses conceitos faz-se necessário a revisão/entendimento de alguns conceitos básicos de genética.

5.1 ENTENDA OS CONCEITOS BÁSICOS

A área de genética molecular é um campo de elevada complexidade e, para melhor entendê-la, é necessário esclarecer alguns conceitos básicos.

▼ DNA

Conhecido como a molécula da vida, o DNA é responsável pela transmissão de informações genéticas de uma geração para outra.

DNA é a abreviação do nome de uma molécula orgânica (em inglês – *Deoxyribonucleic acid*) – o ácido desoxirribonucleico. O DNA é constituído por nucleotídeos formados pelo açúcar desoxirribose, um grupamento fosfato e uma das quatro bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Em uma analogia com um livro, pode-se dizer que os nucleotídeos são as letras e a molécula de DNA seria o texto utilizado para codificar os processos biológicos.

Figura 1 - Molécula de DNA



▼ GENE

O gene é a unidade que é herdada de uma geração para a outra. Molecularmente seria a sequência de nucleotídeos capaz de gerar uma mensagem que vai ser transcrita em ácido ribonucléico (RNA – *Ribonucleic acid*). O gene seria a combinação das letras (nucleotídeos) gerando uma palavra. O gene candidato, termo comumente visto em anúncios de serviços genéticos e de melhoramento, é o gene cuja função foi deduzida por meio de técnicas de genética molecular e que controla uma característica, seja simples, como a cor de pelagem, ou complexa, como a produção de leite, a resistência a carrapatos ou o peso ao nascer.

Figura 3 – Sequência do gene DGAT1 (diacilglicerol O- aciltransferase) de bovinos

```

1  gcgaactaag gccatgggag accgcgggcg cgcggggcgc tcccggcgcc ggaggaacggg
61  gtcgcgccct tcgatccagg gcggcagtgg gcccgcgca gcggaagagg aggtgcggga
121  tgtggcgctt ggaggggacg cgcgggtccg ggacacagac aaggacggag acgtagacgt
181  gggcagcggc cactgggacc tgaggtgtca ccgctgcag gattccctgt tcagttotga
241  cagtggcttc agcaactacc gtggcatcct gaattggtgt gtggtgatgc tgatcttaag
301  caacgcacgg ttatttttag agaacctcat caagtatggc atcctggtgg accccatcca
361  ggtggtgtct ctgttctga aggaccocct cagctggcca gctctgtgcc tggtcattgt
421  ggccaatata ttgocgtgg ctgctgtcca ggtggagaag cgcctggcgg tgggagctct
481  gacggagcag gcggggctgc tgetgcacgg ggtcaacctg gccaccatc tctgettccc
541  agcggcggg gcctttctcc tcgagtctat cactccagtg ggctcctgfc tggccctgat
601  ggtctacacc atcctcttcc tcaagctgtt ctctaccgg gacgtcaacc tctggtgccc
661  agagcgcagg gctggggcca aggccaagcg tgetttggca ggtaaggcgg ccaaccgggg
721  agctgccagg cgcaccgtga gctaccocga caacctgacc taccgcgatc tctactactt
781  cctcttgcgc cccaacctgt gctacgagct caacttcccc cgtctcccc gcactccgaaa
841  gcgcttccgt ctgcgggcac tccctggagat getgttctcc acccagctcc aggtggggct
901  gatccagcag tggatggtec cggccatcca gaactccatg aagcccttca aggacatgga
961  ctactccgcg atcgtggagc gcctcctgaa gctggcgctc cccaaccacc tcatctggct
1021  catcttcttc tactggctct tccactcctg cctgaacgoc gtggctgagc tcatgcaatt
1081  tggagaccgc gacttctacc gggactgggt gaactccgag tccatcactt acttctggca
1141  gaactggaac atccctgttc acaagtgggt catcagacac ttotacaagc coactgctccg
1201  gcggggcagc agcaagtggg cagccaggac ggcagtgttt ctggcctccg ccttcttcca
1261  cgagtacctg gtgagcatcc cctgctgat gttccgctc tgggcttcca cggcatgat
1321  ggcgcagatc ccgctggcct ggatagtggt ccgcttcttc cgcggcaact acggcaacgc
1381  ggcgctgtgt ctgtactca tcatcgggca gcgggtggcc gtcctgatgt acgtccacga
1441  ctactactgt ctcaaccgtg aggcggcggc agcggcacc tgagcgcctc caggtgggcc
1501  cctctgtggg tgttggaact ctttgccgcg ctgctcggcg ctggactaga gcctgcccca
1561  acctgggtgc agcaggagga ggcctgctgt gtggaagctg cctctgggcc tccaccaggc
1621  cctgctgcta agggcttct cctgccaggg gagagcaggg ccgacgcagt tctggccctt
1681  gggaggtgcc catgctctg aaacctaca gatctcgccc aaggtctga atgtgtcaat
1741  aaagtgctgt gcacagttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

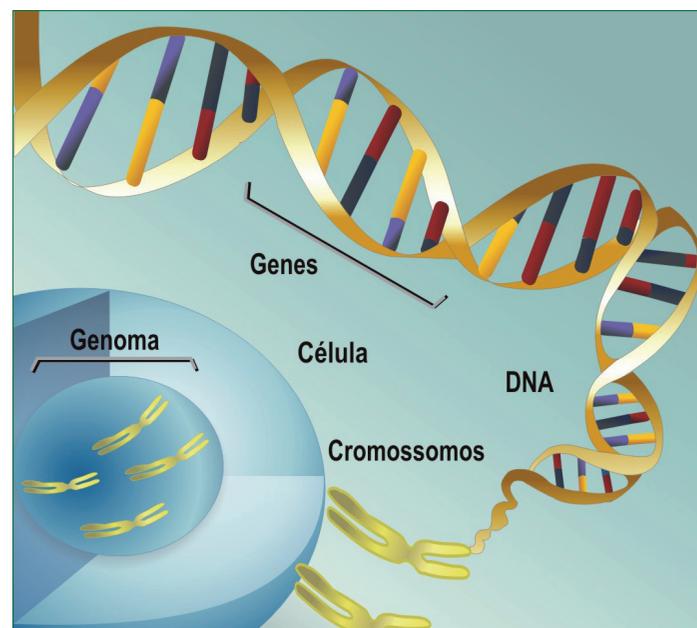
```

▼ GENOMA

Ao conjunto de sequências de nucleotídeos necessários para a formação de um indivíduo dá-se o nome de genoma e ele está localizado no núcleo das células eucariotas.

Foi estimado que o genoma de bovinos contém três bilhões de pares de nucleotídeos e aproximadamente 22.000 genes. Usando a mesma analogia, o genoma seria o conjunto de textos utilizados na codificação dos processos biológicos.

Figura 2 – Representação das relações genoma, DNA e genes



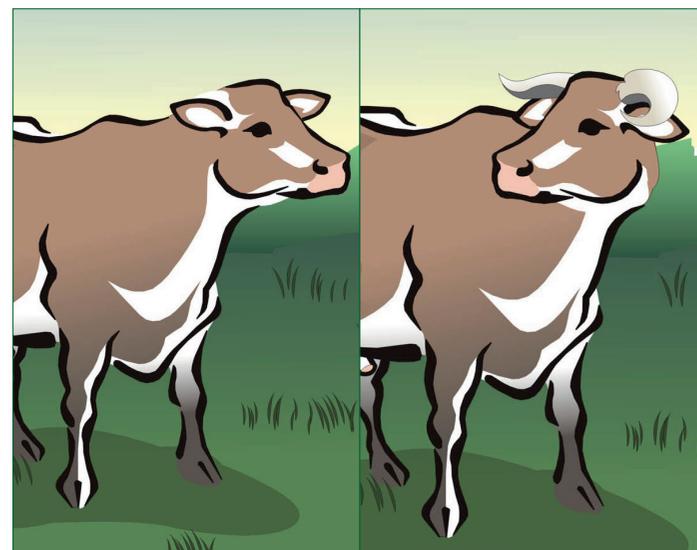
▼ GENÓTIPO

É a constituição genética de um indivíduo e normalmente se refere a uma característica em particular. Os genes têm formas alternativas, e cada uma delas é denominada alelo.

Os bovinos são organismos diplóides, ou seja, para cada loco autossômico simples há dois alelos. Normalmente se representa os diversos alelos de um mesmo gene por letras maiúsculas e minúsculas, por exemplo: em bovinos das raças Hereford e Limousin a presença ou não de chifres é determinado por um gene. O alelo mocho (M) é dominante sobre o alelo corno ou aspado (m).

O genótipo “MM” ou “Mn” resulta em animais mochos e o genótipo “mm” resulta em animais aspados, ou com chifres.

Figura 4 – Exemplo de uma característica condicionada por um gene



Animal mocho

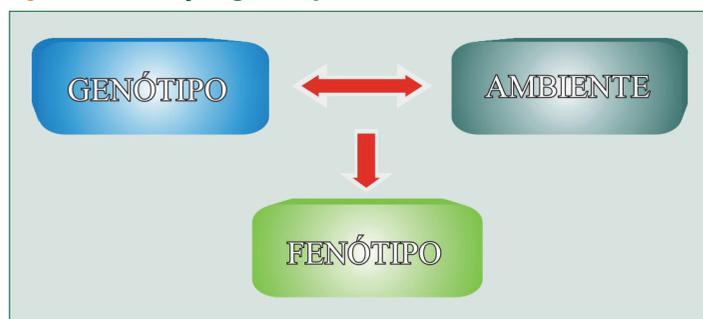
Animal com chifres

▼ FENÓTIPO

Fenótipo é a característica observada de um organismo. Por exemplo: cor dos olhos, da pelagem, altura e comportamento.

O fenótipo é o resultado da expressão do conjunto de genes de um organismo, modulada pelos fatores ambientais. Organismos que tenham um mesmo genótipo não terão necessariamente um fenótipo igual. Desse mesmo modo, organismos com mesmo fenótipo também não têm obrigatoriamente o mesmo genótipo.

Figura 5 - Interação genótipo versus ambiente

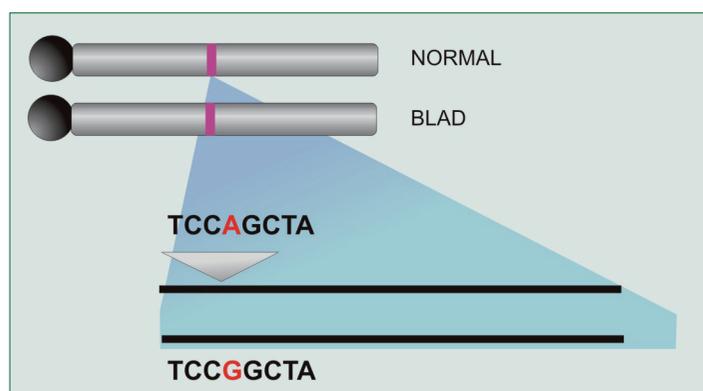


▼ MARCADOR MOLECULAR

Marcador molecular, em biologia, é uma substância de um organismo cuja detecção indica um estado particular. Por exemplo, a presença de um anticorpo no plasma de um indivíduo indica uma infecção causada por um patógeno específico.

Em genética molecular representa a sequência de DNA ou um tipo de proteína que está associada a uma parte do genoma. Os melhores marcadores moleculares são os baseados em DNA, uma vez que as sequências de DNA são altamente específicas, não se modificam de acordo com idade ou estado fisiológico e são altamente variáveis entre os indivíduos. Um marcador de DNA apresenta segregação mendeliana e pode ser utilizado para estudos evolucionários, identificação genética e como ferramenta para a seleção de animais mais produtivos e resistentes às doenças.

Figura 6 - Exemplo de um marcador molecular para a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina (BLAD)



Uma única mutação em que há a troca de um A por G causou esta doença.

▼ CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS

Características quantitativas ou complexas são as características para as quais as variações fenotípicas entre os indivíduos de uma população são distribuídas continuamente. Produção de leite, peso ao desmame, altura, comportamento de docilidade/agressividade são exemplos de características quantitativas.

Estas características são fortemente influenciadas pelo ambiente e são reguladas por muitos genes. Um exemplo de uma característica quantitativa em vegetais é a cor da flor da planta do gênero *Primula* (Figura 7). As regiões do DNA que estão relacionadas com a variação fenotípica das características quantitativas são chamadas de QTL (*Quantitative Trait Loci*).

Figura 7 - Segregação de uma característica quantitativa (cor de flor) na planta do gênero *Primula*



Fonte: HOWARD, 2009.

5.2 COLETE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA EXAMES DE DNA

Vários tecidos ou partes do animal podem ser utilizados como fonte de material genético para a realização de análises moleculares. Teoricamente, qualquer parte do animal que contenha células com núcleo pode ser utilizada. Os tecidos mais rotineiramente utilizados são pelo, sangue e sêmen.

Cada indivíduo tem um perfil genético próprio; por isso, as amostras devem ser coletadas individualmente e identificadas adequadamente.

5.2.1 COLETE AMOSTRAS DE PELO

As amostras de pelo são as mais fáceis de coletar, armazenar e enviar para os laboratórios especializados.

Atenção: 1 – É recomendada a coleta de pelos de animais com mais de oito meses de idade, a fim de garantir que os bulbos capilares apresentem tamanho mínimo adequado.

2 – Para animais mais jovens, recomenda-se coletar amostras de sangue.

a) Contenha o animal selecionado



Precaução: Ao conter o animal, o operador deve, primeiramente, amarrar as patas traseiras, para evitar coices.

b) Retire da cauda do animal os pelos para análise

Os pelos mais facilmente acessíveis são os da cauda do bovino, sendo que 20 fios contendo bulbos capilares são suficientes para a maioria das análises de DNA.



c) Acondicione os pelos no kit

Cada laboratório tem um *kit* acompanhado das recomendações sobre a forma correta de enviá-lo, que devem ser lidas com atenção.

d) Identifique a amostra

Normalmente os laboratórios solicitam as seguintes informações:

- nome do animal;
- sexo;
- número de registro;
- raça;
- nome da pessoa que coletou a amostra;
- data e local da coleta;
- nome do proprietário do animal.

e) Repita as operações nos outros animais selecionados

f) Envie as amostras para o laboratório especializado, para análise

5.2.2 COLETE AMOSTRAS DE SANGUE

Na coleta de amostras de sangue devem ser utilizados materiais descartáveis, que evitam contaminação e alterações nos resultados. Podem ser usados tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e papéis absorventes chamados FTA Cards.

a) Colete amostras de sangue com tubo a vácuo (tampa roxa) e anticoagulante EDTA

As amostras de sangue são comumente coletadas utilizando tubos de coleta a vácuo (tampa roxa) contendo o anticoagulante EDTA.

■ **Reúna o material**

- adaptador para aplicação;
- agulhas 25 mm x 0,8 mm (21G1);
- álcool a 70%;
- algodão;
- caixa isotérmica;
- caneta;
- luvas cirúrgicas;
- peia ou corda;
- rótulos para identificação das amostras;
- tubos para coleta de 4,5 mL com tampa roxa e contendo EDTA.

■ **Contenha o animal selecionado**

Precaução: Ao conter o animal, o operador deve, primeiramente, amarrar as patas traseiras, para evitar coices.

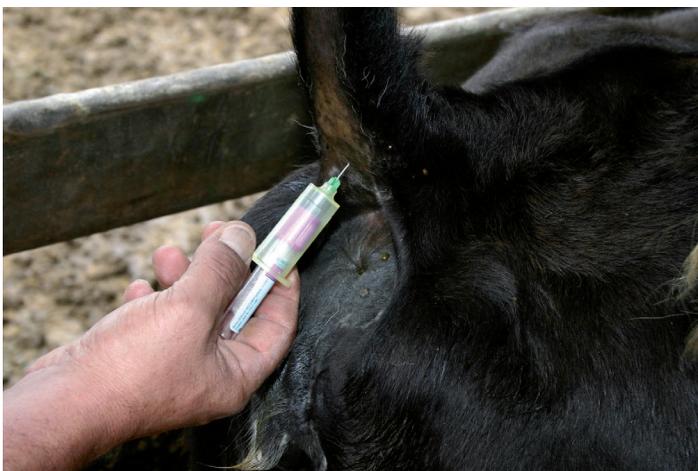
■ **Introduza a agulha do adaptador no local escolhido**



■ Encaixe o tubo no adaptador de aplicação



■ Faça a sucção do sangue até encher o tubo



■ Retire o tubo

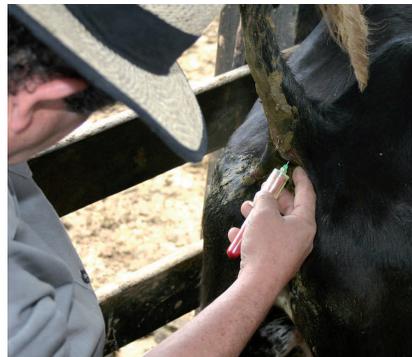
Após a coleta, inverta o tubo gentilmente algumas vezes, para homogeneizar o sangue com o anticoagulante.



Atenção: Os tubos não devem ser chacoalhados, para que não ocorra hemólise, o que, dificulta o processo de extração de DNA da amostra.

■ Retire a agulha

A agulha deve ser retirada e descartada em local apropriado, junto com material perfurocortante, seringas e frascos de medicamentos, seguindo a legislação.



Atenção: Os materiais utilizados nesta operação devem ser descartados, e apenas o adaptador poderá ser utilizado em outras coletas.

■ Identifique a amostra

A identificação das amostras é de suma importância para a correta análise. Os rótulos devem conter um código de barras ou numeração especial, que devem ser baseados em dados contidos em planilhas ou computadores com as seguintes informações:

- nome do animal;
- sexo;
- número de registro;
- raça;
- nome da pessoa que coletou a amostra;
- data e local da coleta;
- nome do proprietário do animal.



■ Mantenha o tubo na geladeira, na posição vertical, até o envio ao laboratório

Atenção: 1 – Os tubos não podem ficar expostos ao sol, pois o calor compromete a eficiência do anticoagulante.

2 – Devem ser armazenados na geladeira na posição vertical até o envio ao laboratório, tendo o cuidado de se regular adequadamente a temperatura (4 °C a 10 °C), pois o congelamento do sangue compromete a análise da amostra.

■ Repita as operações nos outros animais selecionados

■ **Envie as amostras em caixas isotérmicas para o laboratório**

As amostras devem ser mantidas à temperatura de aproximadamente 4 °C.

b) **Colete amostras de sangue em papéis absorventes chamados FTA Cards**

Alguns laboratórios preferem a coleta de sangue em papéis absorventes chamados FTA Cards, porque são mais fáceis de enviar pelo correio. Os laboratórios que preferem este tipo de coleta enviam FTA Cards juntamente com os procedimentos.

Este papel absorvente foi especialmente desenvolvido para a coleta de sangue para análises de DNA, pois contém conservantes que preservam a sua integridade para posterior processamento no laboratório. Deve ser seguido o mesmo procedimento de coleta para amostras de sangue.

5.2.3 COLETE AMOSTRAS DE SÊMEN

Na impossibilidade de coleta de amostras de pelo e sangue para animais que já não se encontram em poder do produtor, amostras de sêmen podem ser enviadas como fonte de material genético para os testes de DNA. Uma única palheta de sêmen é suficiente para envio ao laboratório. A palheta de sêmen deve ser descongelada e enviada diretamente pelo correio; para isto, sugere-se protegê-la com a utilização de um pedaço de papelão acima e abaixo da palheta ou inseri-la em uma caneta de plástico com a carga removida. Dessa maneira, evita-se a sua quebra e, conseqüentemente, que o material genético se perca durante o envio pelo correio. Outra alternativa é a aplicação do sêmen no papel FTA Card e seu envio pelo correio.



Palhetas de sêmen

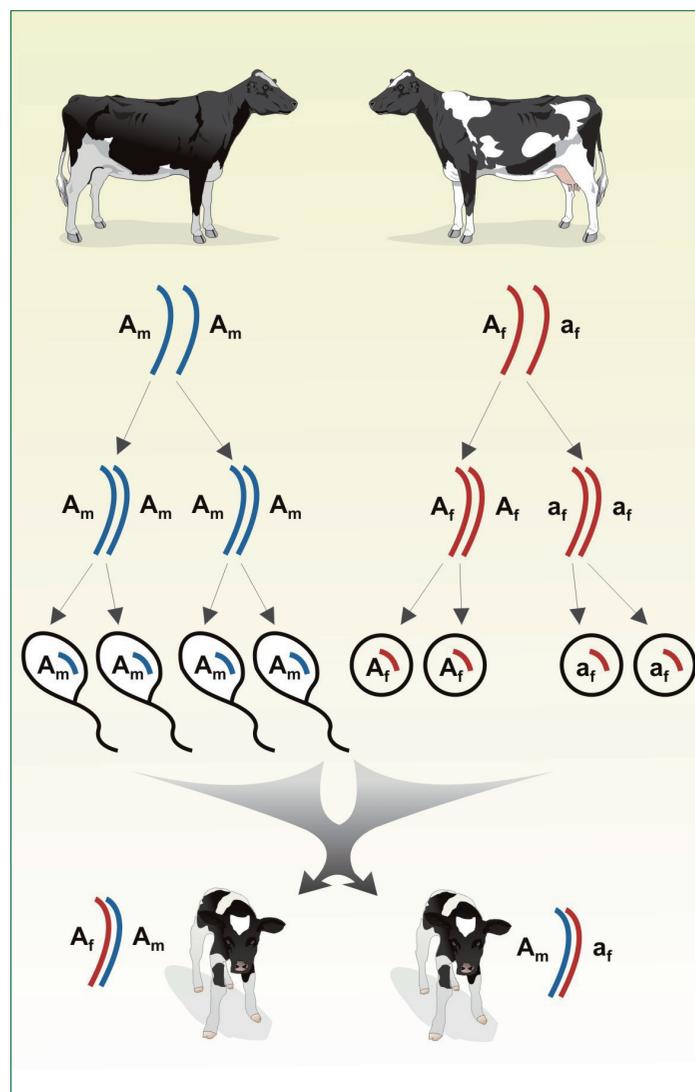
5.3 INTERPRETE UM EXAME DE IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

Os setores de Registro Genealógico, presentes nas associações de criadores, são responsáveis pelas emissões dos pedigrees de cada animal registrado, de modo que a pureza das raças seja documentada. Com o advento de novas técnicas, como a transferência de embriões e a inseminação artificial, tornou-se necessária a genotipagem dos touros doadores de sêmen, das doadoras de embriões e das respectivas progênes, de modo a confirmar a sua identidade genética e, também, a sua genealogia.

5.3.1 INTERPRETE UM EXAME DE PATERNIDADE

A interpretação do resultado de um exame de paternidade segue a primeira Lei de Mendel, da genética clássica, que prediz que durante a reprodução sexual os membros de cada um dos pares de alelos separam-se em diferentes células reprodutivas ou gametas nos parentais feminino e masculino e depois se fundem na progênie durante a fecundação (Figura 8).

Figura 8 – Esquema da primeira Lei de Mendel mostrando a segregação dos alelos nos parentais



Este conceito implica que para cada par de alelo herdado um é originado da mãe e outro do pai. Desse modo, em um exame de paternidade típico, onde o trio é examinado, é verificado se o filho (F) compartilha um dos alelos com a mãe (M) e outro com o suposto pai (SP). Caso F compartilhe 50% dos seus alelos com M e 50% com SP, este é incluído, e procede-se então aos cálculos genéticos que irão dizer qual é a probabilidade de o indivíduo examinado ser o pai biológico quando comparado com outro indivíduo ao acaso na população. Caso F não compartilhe 50% dos seus alelos com SP, este então é excluído da paternidade. O mesmo princípio também é utilizado para resolver casos onde a maternidade é questionada. Há casos em que um dos pais está ausente, sendo somente estudado o duo. Neste caso, o princípio de que F tem de compartilhar 50% dos seus alelos com um dos parentais também é mantido.

5.3.2 COMPREENDA OS TIPOS DE EXAME DE PATERNIDADE

Atualmente existem dois tipos principais de exames de paternidade: um baseado na molécula de DNA e outro na tipagem de proteínas presentes em células do sangue (tipagem sanguínea). Estes dois tipos de exames são utilizados pelas associações de criadores para fins de registro, entretanto a maioria está migrando para o exame de DNA, que é mais preciso. Portanto, aos poucos, a tipagem sanguínea para fins de identificação genética para resolução de dúvidas de parentesco e registro genealógico está sendo menos utilizada.

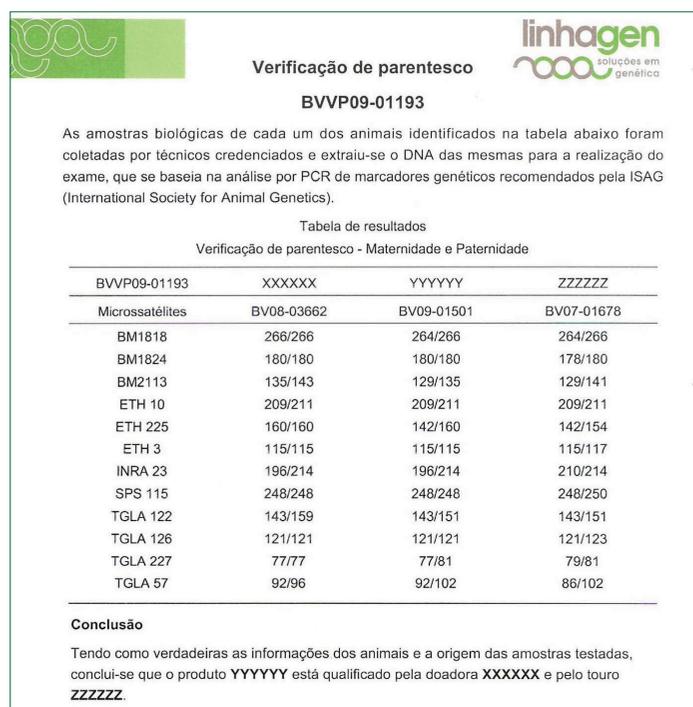
No entanto, os dois exames (DNA e tipagem) são muito seguros e confiáveis; eles se baseiam no princípio da exclusão genética, em que os resultados do indivíduo em teste são comparados com os seus supostos progenitores. O exame de DNA é um teste genético de maior precisão, permitindo alcançar um índice de 99,9% de inclusão, mesmo com indivíduos aparentados. A maior vantagem do teste de DNA em relação à tipagem sanguínea é que ele pode ser realizado com outras amostras biológicas, como sêmen, pelos e ossos, permitindo a verificação de parentesco mesmo em indivíduos que já morreram.

a) Entenda o teste de paternidade pelo DNA

Em um típico exame de paternidade são coletadas amostras biológicas (pelo, sêmen ou sangue) do trio Touro (Suposto Pai – SP), Vaca (Mãe – M) e Bezerro (Filho – F). O DNA é extraído das amostras por meio de técnicas moleculares, e regiões específicas do genoma são genotipadas. Para bovinos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) estabelece que, para fins de identificação genética dos animais ou exames de paternidade, devem ser genotipadas no mínimo nove regiões (TGLA126, TGLA122, BM1824, ETH10, TGLA227, BM2113, SPS115, INRA23, ETH225). Após a genotipagem é feita a comparação do genótipo de F com M e SP para cada uma das regiões, e o laudo é emitido (Figuras 9 e 10). São dois os possíveis resultados: inclusão e exclusão. O resultado de inclusão indica que a vaca (ou doadora) e o touro estão

qualificados como pais do produto (bezerro). O resultado de exclusão indica que a vaca ou o touro não estão qualificados como pais do produto.

Figura 9 – Exemplo de laudo de teste de paternidade pela análise de DNA em bovinos cujo resultado é de inclusão



linhagem soluções em genética

Verificação de parentesco

BVVP09-01193

As amostras biológicas de cada um dos animais identificados na tabela abaixo foram coletadas por técnicos credenciados e extraiu-se o DNA das mesmas para a realização do exame, que se baseia na análise por PCR de marcadores genéticos recomendados pela ISAG (International Society for Animal Genetics).

Tabela de resultados

Verificação de parentesco - Maternidade e Paternidade

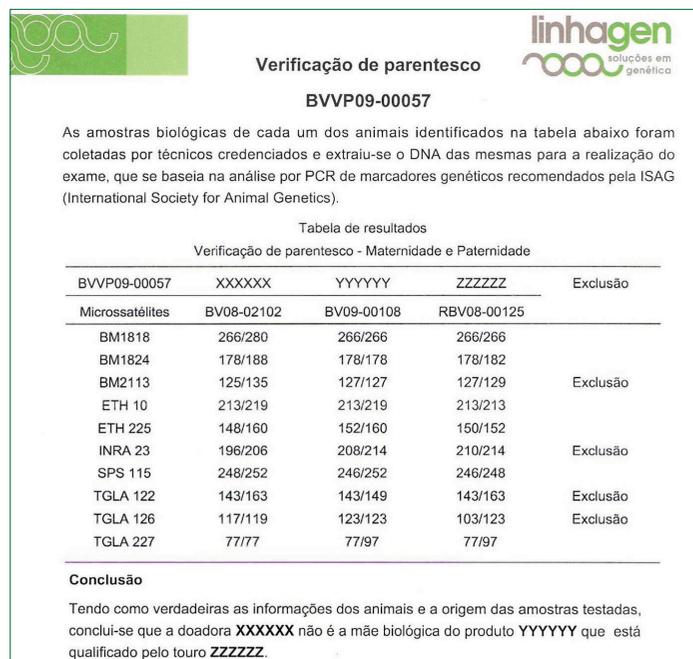
BVVP09-01193	XXXXXX	YYYYYY	ZZZZZZ
Microsatélites	BV08-03662	BV09-01501	BV07-01678
BM1818	266/266	264/266	264/266
BM1824	180/180	180/180	178/180
BM2113	135/143	129/135	129/141
ETH 10	209/211	209/211	209/211
ETH 225	160/160	142/160	142/154
ETH 3	115/115	115/115	115/117
INRA 23	196/214	196/214	210/214
SPS 115	248/248	248/248	248/250
TGLA 122	143/159	143/151	143/151
TGLA 126	121/121	121/121	121/123
TGLA 227	77/77	77/81	79/81
TGLA 57	92/96	92/102	86/102

Conclusão

Tendo como verdadeiras as informações dos animais e a origem das amostras testadas, conclui-se que o produto YYYYYY está qualificado pela doadora XXXXXX e pelo touro ZZZZZZ.

Laudo gentilmente cedido pela empresa Linhagem Produtos e Serviços em Biotecnologia Ltda.

Figura 10 – Exemplo de laudo de teste de paternidade pela análise de DNA em bovinos cujo resultado é de exclusão



linhagem soluções em genética

Verificação de parentesco

BVVP09-00057

As amostras biológicas de cada um dos animais identificados na tabela abaixo foram coletadas por técnicos credenciados e extraiu-se o DNA das mesmas para a realização do exame, que se baseia na análise por PCR de marcadores genéticos recomendados pela ISAG (International Society for Animal Genetics).

Tabela de resultados

Verificação de parentesco - Maternidade e Paternidade

BVVP09-00057	XXXXXX	YYYYYY	ZZZZZZ	Exclusão
Microsatélites	BV08-02102	BV09-00108	RBV08-00125	
BM1818	266/280	266/266	266/266	
BM1824	178/188	178/178	178/182	
BM2113	125/135	127/127	127/129	Exclusão
ETH 10	213/219	213/219	213/213	
ETH 225	148/160	152/160	150/152	
INRA 23	196/206	208/214	210/214	Exclusão
SPS 115	248/252	246/252	246/248	
TGLA 122	143/163	143/149	143/163	Exclusão
TGLA 126	117/119	123/123	103/123	Exclusão
TGLA 227	77/77	77/97	77/97	

Conclusão

Tendo como verdadeiras as informações dos animais e a origem das amostras testadas, conclui-se que a doadora XXXXXX não é a mãe biológica do produto YYYYYY que está qualificado pelo touro ZZZZZZ.

Laudo gentilmente cedido pela empresa Linhagem Produtos e Serviços em Biotecnologia Ltda.

b) Entenda o teste de paternidade por grupos sanguíneos

A tipagem sanguínea é feita a partir da coleta de uma amostra de sangue do animal. O exame mais comum é o sorológico, que consiste na identificação dos grupos sanguíneos utilizando técnicas imunogenéticas. Quando a amostra chega ao laboratório, passa por uma série de reações de aglutinação com anticorpos específicos para identificação dos fatores sanguíneos e/ou análise de variantes protéicas presentes nas hemácias.

Em bovinos são reconhecidos 11 sistemas de grupos sanguíneos, como mostrado na Tabela 1. A análise do resultado é feita de modo similar ao exame de DNA.

Tabela 1 – Grupos sanguíneos em bovinos

Sistema	Fator
A	A1; A2, D1; D2; D; Z'
B	B1; B2; G1; G2; G3; I1; I2; K; O1; O2; O3; OX; P1; P2; Q; T1; T2; Y1; Y2; A'; B'; D'1; D'2; E'1; E'2; E'3; E'4; F'1; F'2; G'; I'1; I'2; J'1; J'2; K'; O'1; O'2; P'1; P'2; Q'; Y'; A"; B"; D"; F"; G"; I"; J"; K"; O"
C	C1; C2; E; R1; R2; W; X0; X1; X2; C'; L'; X'; C"1; C"2
F	F1; F2; V1; V2; N'; V'
J	J; OC
L	L
M	M1; M2; M'
S	S1; S2; U1; U2; H'; U'1; U'2; H"; S"; U"
Z	Z1; Z2
R'	S'; R'
T'	T'

5.3.3 ENTENDA A FINALIDADE DE UM EXAME DE IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

Em bovinos, as informações dos exames de identificação genética podem ser utilizadas nas fichas zootécnicas, no transplante de embriões, na verificação de paternidade e maternidade para fins de registro genealógico, na identificação de gêmeos idênticos, nos programas de inseminação artificial e nos estudos de associações entre os genes e características de importância econômica.

5.4 ENTENDA COMO OS MARCADORES MOLECULARES PODEM AUXILIAR NA SELEÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE SUPERIORES

Os recentes avanços no campo da biotecnologia permitiram a incorporação das informações de marcadores moleculares nos programas de seleção e acasalamento em gado de leite. O conhecimento das informações sobre o genótipo de animais tem grande importância estratégica e valor econômico, pois permite identificar os animais de maior potencial de produção de leite, gordura e proteína e portadores de alelos para doenças hereditárias. De posse dessas informações, o produtor pode orientar acasalamentos, a escolha de sêmen e a aplicação da seleção assistida por marcadores moleculares para a melhoria genética do seu rebanho.

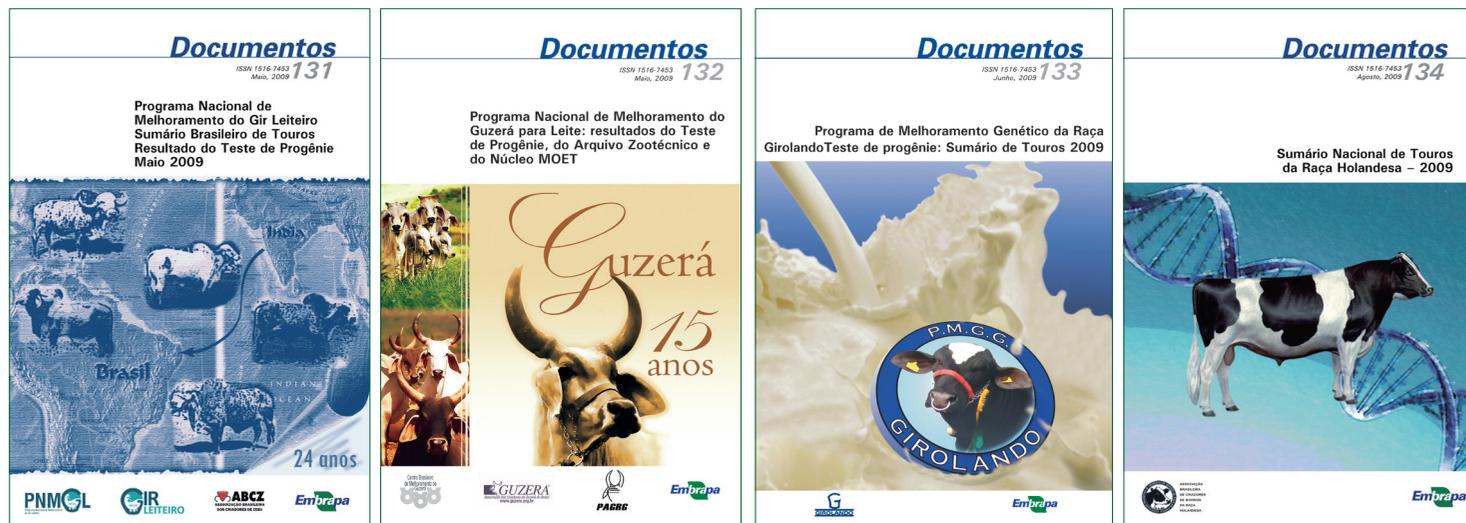
5.4.1 ENTENDA O USO DOS MARCADORES MOLECULARES

Entre os animais de um determinado rebanho existem pequenas alterações naturais na sequência do DNA, sendo que cada animal possui um padrão específico dessas variações. Estas alterações naturais funcionam como marcadores moleculares para formas alternativas (alelos) de genes que podem possuir efeitos positivos ou negativos numa determinada característica de interesse. A seleção de animais que possuem alelos favoráveis para os genes controlando as características em questão, baseada na avaliação direta de seu DNA, é denominada de Seleção Assistida por Marcadores (SAM). A SAM utiliza-se das informações de regiões específicas dos cromossomos, nas quais se localizam os genes que afetam as características de interesse, e objetiva identificar indivíduos com combinações genéticas superiores.

Marcadores moleculares de DNA possuem várias características que os tornam atraentes para a utilização na seleção de animais geneticamente superiores. Logo após o nascimento, animais de ambos os sexos podem ser analisados com marcadores moleculares. Com a identificação de marcadores ligados a características de interesse econômico, touros jovens podem ser selecionados logo após o nascimento com base no genótipo que eles carregam para os marcadores selecionados. Dessa maneira, animais com alto potencial genético podem ser mantidos no programa e aqueles com baixo potencial genético podem ser descartados, evitando os custos necessários para a manutenção do animal por vários anos. Mesmo considerando as vantagens que a SAM possibilita, é interessante considerar também as informações obtidas com as metodologias convencionais utilizadas nos programas de melhoramento das raças, visando maximizar o ganho genético.

A SAM é bastante interessante em programas de melhoramento que visam características de produção, bem como resistência a doenças. O desenvolvimento da doença compromete a expressão dos caracteres relacionados com a

Figura 11 – Sumários de touros referentes aos programas de melhoramento das raças Gir, Guzerá, Girolando e Holandesa



produção, portanto, a seleção para a resistência a doenças influencia na seleção para a produção. A seleção para a resistência a doenças pode ser realizada com marcadores moleculares, evitando expor o animal à doença e garantindo que ele alcance seu potencial produtivo máximo.

A SAM apresenta inúmeras vantagens quando comparada às outras técnicas de seleção genética tradicionais, como o aumento do ganho genético por geração, por aumentar a precisão da seleção; não é limitada pelo sexo; permite a seleção de animais jovens, diminuindo então o intervalo de geração – entre outras vantagens.

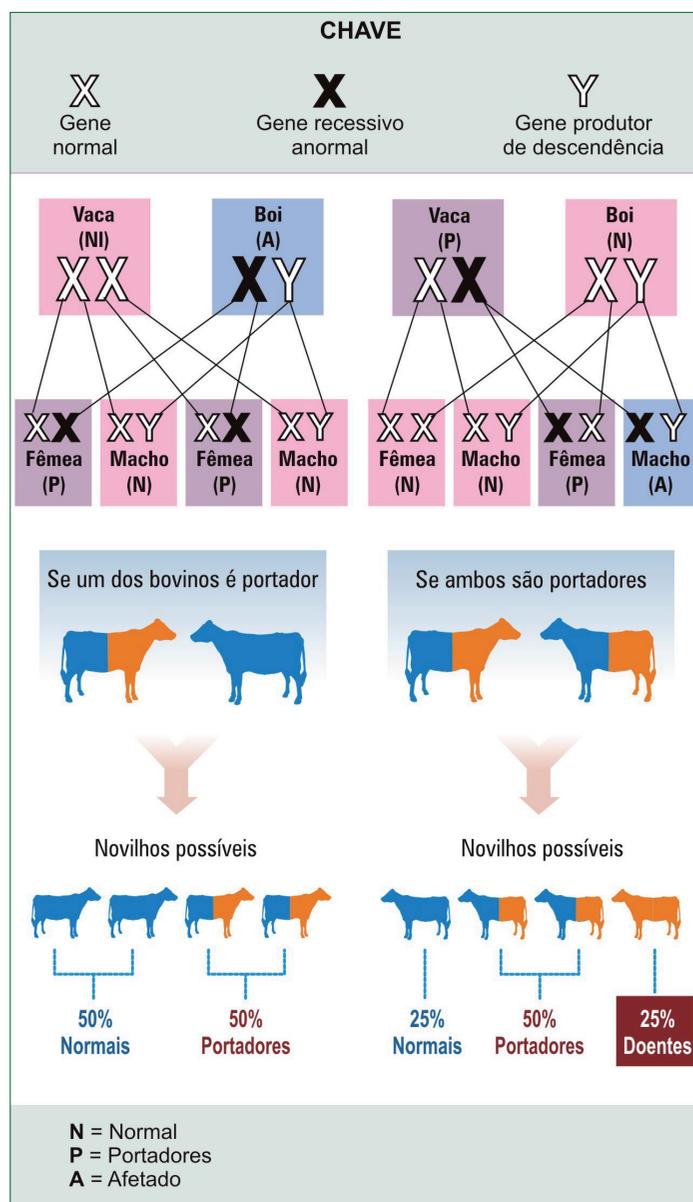
Os sumários de touros referentes aos programas de melhoramento das raças Gir, Guzerá, Girolando e Holandesa, coordenados pela Embrapa Gado de Leite e as respectivas associações das raças, trazem informações moleculares para diversos genes aqui descritos (vide Figura 11).

5.4.2 ENTENDA A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DOENÇAS HEREDITÁRIAS

Com o avanço do conhecimento técnico-científico, principalmente o relativo ao estudo do genoma de animais domésticos e da espécie humana, várias doenças genéticas têm sido identificadas em diversas espécies, como cães, cavalos e bovinos. Com o objetivo de manter uma raça com baixa frequência de alelos indesejáveis, é necessário entender as principais doenças genéticas em bovinos leiteiros e, desse modo, tomar decisões quanto ao melhoramento genético do rebanho e, mais particularmente, às estratégias de acasalamento.

As doenças genéticas identificadas até o momento, geralmente se manifestam quando o indivíduo afetado apresenta os dois alelos para a característica em questão; a utilidade do teste para estas doenças está na identificação de animais portadores (heterozigotos). Animais portadores, quando cruzados entre si, apresentam uma probabilidade de, em sua progênie, apresentar 25% dos animais afetados, como pode ser visto na Figura 12.

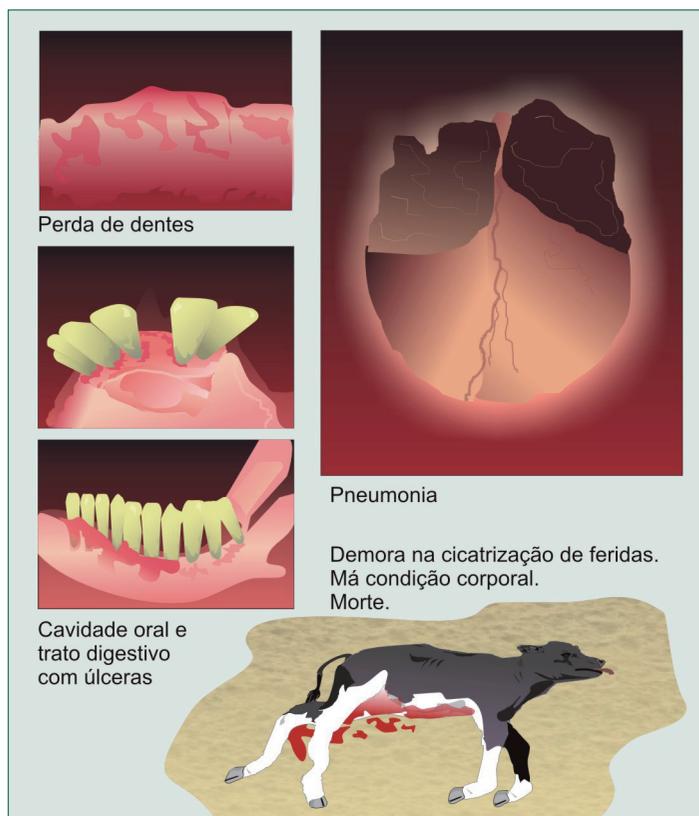
Figura 12 – Probabilidade de herança de um alelo recessivo



▼ DEFICIÊNCIA DE ADESÃO LEUCOCITÁRIA BOVINA (BLAD)

A Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina (BLAD – do inglês *Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*) é uma doença hereditária mais comum na raça Holandesa. Esta doença é causada por uma mutação recessiva letal no gene CD18. Animais homocigotos para esta mutação apresentam crescimento retardado, perda de dentes, comprometimento do sistema imune e morrem ainda novos, geralmente de pneumonia. Animais heterocigotos (portadores do alelo recessivo) apresentam desenvolvimento normal e podem transmitir a mutação para a progênie; caso animais portadores cruzem entre si, a probabilidade de nascer um animal afetado pela doença é de 25%. Orienta-se que animais portadores do alelo BLAD devem ser acasalados com outros não portadores.

Figura 13 – Patobiologia da BLAD



Fonte: Nagahata, 2004

▼ DEFICIÊNCIA DA URIDINA MONOFOSFATO SINTASE (DUMPS)

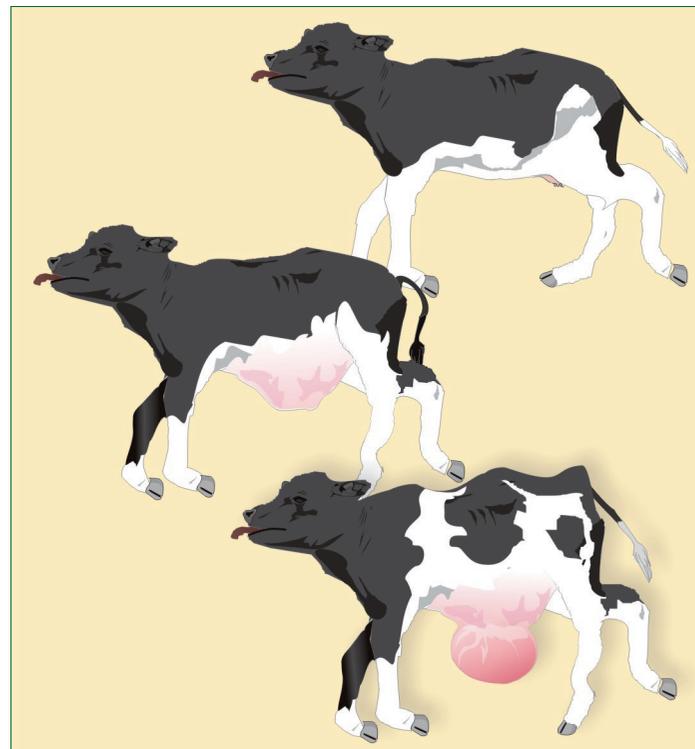
Outra doença hereditária recessiva importante é a Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase (DUMPS – do inglês *Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase*). Esta doença é caracterizada por uma mutação no gene UMPS (Uridina Monofosfato Sintase) que resulta em uma total deficiência da enzima funcional. Esta enzima é responsável pela conversão do ácido orótico para uridina monofosfato (UMP), fazendo parte de uma via essencial de síntese das pirimidinas que são formadoras dos nucleotídeos no DNA. Como durante o desenvolvimento embrionário são requeridas grandes

quantidades de pirimidinas para a síntese de ácidos nucleicos, embriões homocigotos para o alelo mutante morrem por volta do 40º dia. Vacas portadoras do alelo DUMPS possuem uma alta taxa de retorno, já que, quando cruzadas com animais também portadores, algumas das prenhezês podem resultar em abortos naturais precoces. Animais heterocigotos possuem um fenótipo normal, entretanto apresentam apenas metade da atividade normal da enzima; vacas heterocigotas possuem um elevado nível de ácido orótico na urina e no leite durante a lactação. Assim como para a BLAD, a identificação dos animais portadores pode ser feita por meio de técnicas de genética molecular; portanto, identificar esses animais na população deve ser uma estratégia para permitir a diminuição da frequência do alelo mutante no rebanho.

▼ MALFORMAÇÃO DO COMPLEXO VERTEBRAL (CVM)

Malformação do Complexo Vertebral (CVM – do inglês *Complex Vertebral Malformation*) é uma doença genética mais comum em bovinos da raça Holandesa e que resulta no nascimento de bezerros anormais. Assim como a DUMPS e a BLAD, animais que são portadores dos dois alelos da doença são afetados e touros portadores dos alelos para essas doenças devem ser identificados por testes genéticos, e o criador decide, após os resultados, se deve ou não utilizá-los nos processos de acasalamento. Animais afetados nascem com anomalias na coluna vertebral, principalmente nas vértebras cervicais e torácicas. Esta doença provoca altas taxas de aborto devido à malformação, e vacas podem ter suas características reprodutivas afetadas (Figura 14).

Figura 14 – Variações fenotípicas de três bezerros com CVM



Fonte: Agerholm et al., 2001.

▼ CITRULINEMIA

A citrulinemia é uma doença genética recessiva mais frequente em bovinos da raça Holandesa. Os bezerros afetados parecem normais logo após o nascimento, entretanto, no segundo dia de vida, tornam-se deprimidos e não se alimentam normalmente. Entre o terceiro e o quinto dias de vida, a doença progride rapidamente, e o animal morre. Esta doença é consequência da deficiência de uma enzima do ciclo da ureia que leva ao acúmulo de amônia no cérebro. Touros portadores devem ser identificados por testes genéticos, e o seu acasalamento com vacas portadoras tem probabilidade de produzir uma descendência de 25% de animais afetados. A detecção dos animais portadores no rebanho ajuda na redução das perdas econômicas acarretadas pelo nascimento de bezerros afetados.

▼ SÍNDROME DE WEAVER

A síndrome de Weaver ou mieloencefalopatia degenerativa é uma doença genética recessiva descrita pela primeira vez em bovinos da raça Pardo-Suíça. Esta doença manifesta-se, principalmente em bezerros de seis meses a oito meses de idade. Os animais apresentam ataxia, fraqueza progressiva dos membros posteriores, dificuldade de se manter em pé e movimentos descoordenados. Além disso, o estado de consciência apresenta-se normal. Assim como as outras doenças listadas acima, deve-se ter cuidado no acasalamento dos touros portadores desse alelo. Porém, vacas que são heterozigotas apresentam maior produção de gordura e leite, já que foi estabelecido que o gene para a síndrome de Weaver localiza-se próximo a alguns genes para características quantitativas para a produção. Para saber se o animal (touro ou vaca) é portador do alelo recessivo é necessário enviar amostras de material genético para um laboratório especializado em fazer a identificação. Também já foi identificado um bezerro da raça Gir com esta síndrome (Oliveira et al., 2008).

▼ SINDACTILISMO

A sindactilia, *mulefoot* ou pé de mula é uma desordem genética encontrada em muitas raças de bovinos. Ela se caracteriza pela fusão das unhas em um ou mais cascos, e as patas dianteiras são, geralmente, mais afetadas que as posteriores. Isso afeta a capacidade do animal de se locomover e manter-se em pé.

Assim como as outras doenças acima descritas, ela se comporta como uma característica monogênica recessiva, com penetrância incompleta ou variável, dependendo da raça. A maior parte dos relatos é com gado holandês, mas também há casos relatados em Simental, Angus e outras raças. Recentemente foi identificado um marcador no gene LRP4, que está fortemente associado com a anomalia em gado holandês, e outro no mesmo gene em Angus. Um teste genético para todas as raças ainda não está disponível, já que há evidências de que diferentes mutações podem ocasionar este fenótipo em diferentes raças.

5.4.3 ENTENDA A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO

O melhoramento convencional em bovinos já vem sendo efetuado há décadas, porém, o desenvolvimento de novas tecnologias tem revolucionado o setor agropecuário. Os avanços nas técnicas reprodutivas (inseminação artificial, fertilização *in vitro*, clonagem etc.) foram fundamentais para os programas de melhoramento. Mais recentemente, o desenvolvimento de marcadores moleculares e a sua implementação no processo de Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM) possibilitaram aumentar o ganho genético dos programas de melhoramento, pois permitem aumentar a precisão e a intensidade na seleção e diminuir o intervalo de gerações.

A grande maioria dos marcadores moleculares desenvolvidos até o momento foi descrita em raças taurinas. É importante ressaltar que existem grandes diferenças entre as raças taurinas e zebuínas, não apenas em sua caracterização racial, mas também no seu genoma. Assim, se um marcador molecular foi identificado por “marcar” uma determinada característica em uma raça, este mesmo marcador pode não “marcar” esta mesma característica em outra. Portanto, os marcadores moleculares precisam ser validados em cada raça antes de serem utilizados como ferramenta auxiliar na seleção de animais.

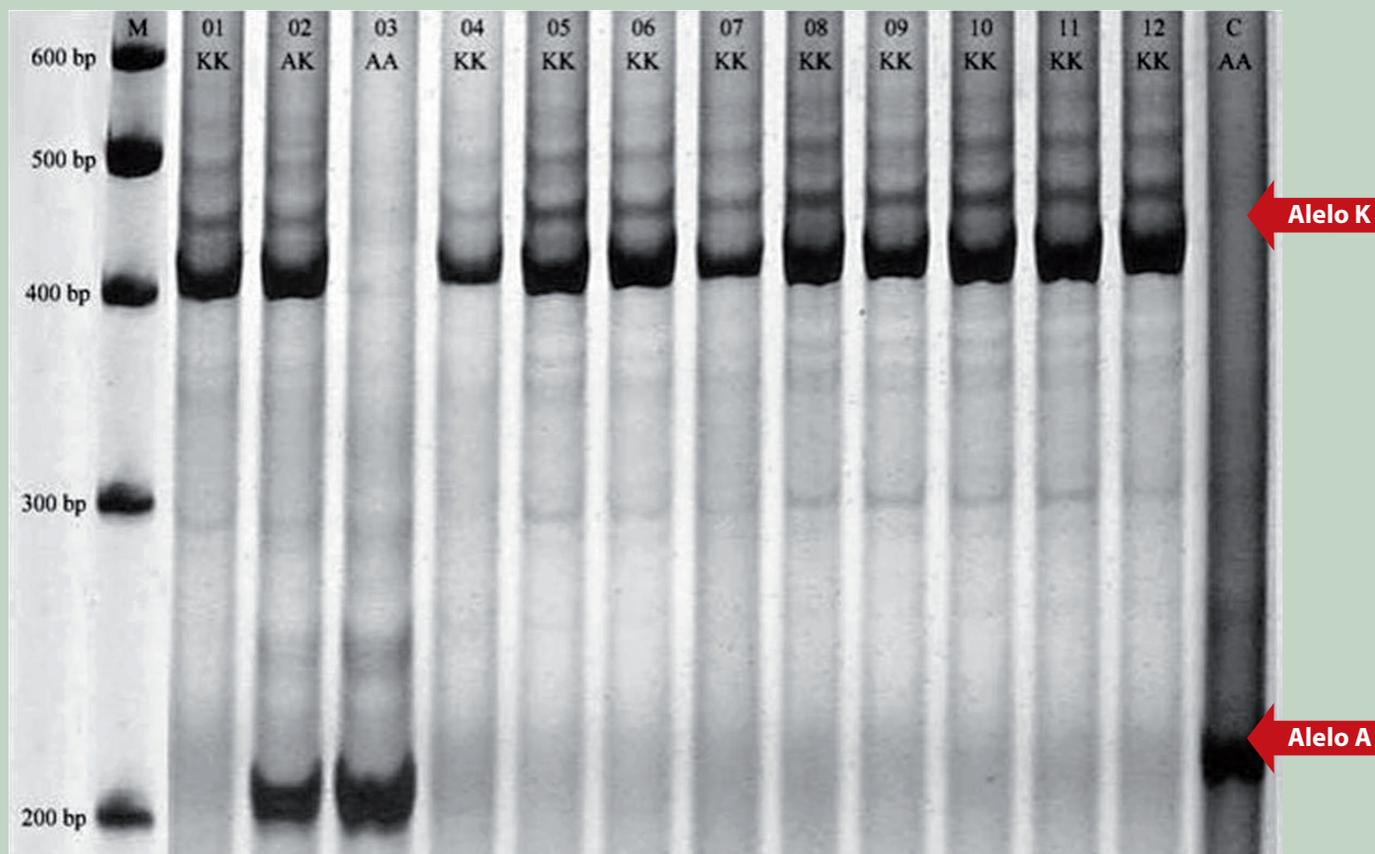
▼ DGAT1

O DGAT1 (diacilglicerol O-aciltransferase 1) é um gene que está envolvido nos processos do metabolismo celular de diacilglicerol, tais como absorção de gordura no intestino, síntese de lipoproteínas, formação de tecido adiposo e lactação, e que, portanto, afeta o conteúdo de gordura do leite. Na sequência deste gene, foi identificado um marcador molecular chamado K232A. Este marcador tem dois alelos: o alelo K e o A. Em raças taurinas leiteiras, os animais possuidores do alelo K, quando comparados com animais portadores do alelo A, apresentam maior teor de gordura no leite, maior concentração de sólidos e uma menor produção de leite como um todo. Se o objetivo do produtor for produção de manteiga ou queijos gordos, então é desejável que sejam selecionados animais possuidores do alelo K, visando à formação de um rebanho com alta frequência desse alelo. Do mesmo modo, se o objetivo do produtor for produção total de leite, então é desejável que sejam selecionados animais possuidores do alelo A.

É importante enfatizar que estes efeitos foram encontrados em raças taurinas e precisam ser validados em raças zebuínas. Um fato complicador para a validação desses resultados em raças zebuínas é o de que o marcador K232A apresenta pouquíssima variação nessas raças. A frequência do alelo A fica em torno de 1% a 2% em animais das raças Guzera e Nelore e em torno de 6% em animais da raça Gir.

Devido à grande importância desse gene na produção e teor de gordura do leite, outros marcadores na sequência do gene DGAT1 estão sendo pesquisados nas raças zebuínas.

Figura 15 - Análise do marcador K232A do gene DGAT1



A banda de DNA na posição 200 bp indica a presença do alelo A e a banda de DNA na posição 400 bp indica a presença do alelo K.

▼ PROTEÍNAS DO QUEIJO (KAPPA-CASEÍNA E BETA-LACTOGLOBULINA)

Os avanços na área de genética molecular possibilitam novas abordagens para o melhoramento animal. Utilizando genotipagem baseada em DNA, novas variantes genéticas para as proteínas do leite foram identificadas e os mecanismos de regulação da expressão dos genes das lactoproteínas foram descobertos. As principais proteínas do leite são as caseínas, albuminas e globulinas. As caseínas são as proteínas que, por ação do coalho ou dos ácidos, produzem uma massa coagulada que, depois de prensada, salgada e amadurecida, é transformada em queijo.

As proteínas mais diretamente envolvidas na formação do queijo são as caseínas e as globulinas. Existem quatro formas de caseínas: *alfa-S1*, *alfa-S2*, *beta* e *kappa*. Estudos moleculares identificaram seis alelos para *kappa*-caseína (A, B, C, E, F e G), sendo que vários trabalhos na literatura reportam que o alelo B está associado a uma maior capacidade de coagulação do leite, resultando em um aumento do rendimento de queijo. A *beta*-lactoglobulina é uma proteína encontrada no soro do leite que está também envolvida na coagulação. Os alelos mais comumente encontrados nos rebanhos leiteiros são A e B, sendo que o alelo B está associado com maiores teores de

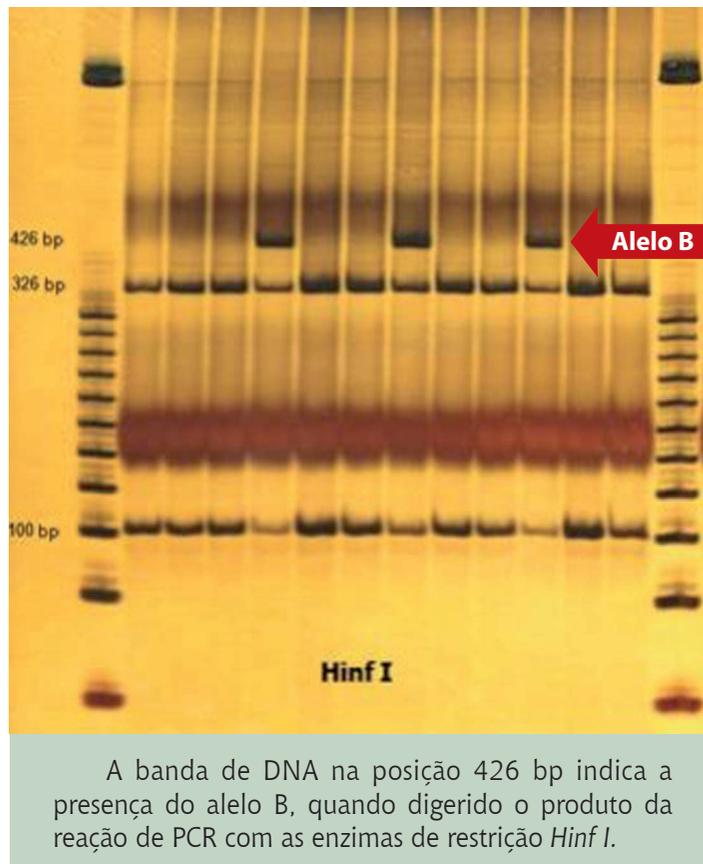
caseínas no leite e, portanto, maior rendimento na produção de queijo.

Dessa forma, animais que possuam em sua constituição genética o alelo B para *kappa*-caseína irão produzir um leite com maior capacidade de coagulação. Da mesma maneira, animais que possuam o alelo B para *beta*-lactoglobulina irão produzir um leite com maior teor de caseínas. Os efeitos desses genes são aditivos; portanto, animais que possuam o alelo B para ambos os genes produzirão um leite com um rendimento na produção de queijo ainda maior.



O alelo B ajuda na coagulação do leite proporcionando maior rendimento na produção de queijos

Figura 16- Análise do gene da *kappa*-caseína



5.4.4 ENTENDA A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VARIAÇÃO NA COLORAÇÃO DA PELAGEM

A cor da pelagem de animais domésticos exibe grande variação, diferentemente de populações naturais. Ao longo dos anos, os criadores têm procurado selecionar os mais variados tipos de pelagem, o que se torna, muitas vezes, uma marca registrada da raça.



Touros da raça Holandesa com pelagem vermelha e branca e preta e branca

A pelagem vermelha e preta é a mais comum em bovinos, isto é, mais claramente vista nas raças Angus, Hereford, Limousine e Holandesa. Em outras raças há interações entre vários genes, o que resulta em uma ampla variedade de cores. O gene responsável pelo fenótipo preto/vermelho é o receptor de melanocortina 1 (MC1R). Este gene tem três alelos mais comuns o E^d , E^+ e “e”. O alelo E^d é dominante e determina pelagem preta, o alelo “e” é recessivo, e, portanto, animais homocigotos para este alelo possuem a pelagem vermelha. O alelo E^+ tem efeito neutro e animais com genótipo E^d/E^+ têm a pelagem preta e com E^+/e têm a pelagem vermelha. Porém animais E^+/E^+ podem apresentar pelagem variada, já que o par E^+ permite a expressão de outros genes envolvidos na síntese de pigmentos, como o gene Agouti.

5.4.5 ENTENDA A SELEÇÃO GENÔMICA

A seleção para fenótipos desejáveis tem sido praticada em bovinos desde sua domesticação, ocorrida há, aproximadamente, 7.500 a 10.000 anos. Até o início do século passado, entretanto, tal seleção era feita com base na avaliação visual. A partir de 1930, começaram a ser estabelecidos os métodos científicos, estatísticos e computacionais para avaliação genética de animais domésticos. Dessa forma, o melhoramento tradicional, baseado na teoria da genética quantitativa, tem assegurado ganho genético contínuo na maioria das características de interesse econômico. Assim, a maior parte do progresso genético obtido tem sido decorrente da seleção baseada no fenótipo do animal ou na estimativa do valor genético aditivo derivado do fenótipo. Essa seleção é realizada sem o conhecimento do número e do efeito dos genes que atuam nas características de interesse.

Conforme descrito nos itens 5.1 e 5.3, as pesquisas em melhoramento genético nas duas últimas décadas têm sido direcionadas também no sentido de incorporar as informações de marcadores moleculares que estejam associados à substancial variação genética de algumas características ao processo de

seleção, e, assim, com uso da SAM, reduzir o intervalo de gerações e diminuir o custo dos testes de progênie por meio da maior confiabilidade na seleção dos animais.

Até recentemente, o número de marcadores de DNA identificados no genoma de bovinos era limitado e o custo de genotipagem era alto, o que restringia os experimentos delineados para o mapeamento de características quantitativas. Mesmo com o uso de mapas de ligação esparsos, baseados em alguns microssatélites, avanços foram obtidos na identificação de locos e de regiões cromossômicas que continham locos associados a características de importância econômica em animais domésticos.

Uma alternativa ao mapeamento de limitado número de Locos de Caracteres Quantitativos (*Quantitative Trait Loci – QTL*) com marcadores é mapeá-los todos, o que pode ser feito dividindo-se todo o genoma em pequenos segmentos cromossômicos, definidos por marcadores adjacentes, e mapeá-los. Esse método foi denominado seleção genômica, que explora a pequena distância entre o marcador e o QTL sob a pressuposição de que os efeitos dos segmentos cromossômicos serão os mesmos em toda a população. Desta forma, a densidade de marcadores deve ser suficientemente alta, para assegurar que todos os QTLs estejam próximos aos marcadores. Resumidamente, a seleção genômica é a predição do desempenho da progênie de um animal com base em seu DNA. Os marcadores de DNA de um determinado animal são comparados aos resultados dos efeitos dos marcadores obtidos a partir da análise de milhares de touros e de vacas com desempenho conhecido para diversas características de interesse. Isso permite a estimação dos valores genéticos genômicos do animal com base nas associações entre os marcadores de DNA e os registros de produção de leite, por exemplo.

a) Entenda o conceito de avaliação genética genômica

A avaliação genética genômica inclui a informação obtida a partir dos marcadores de DNA testados para um determinado indivíduo. A avaliação também considera as informações de *pedigree* e pode, também, incluir a informação da progênie.

b) Entenda como usar o índice de seleção genômica

Embora possa parecer misterioso, a seleção genômica é, na verdade, muito simples. Por exemplo, no passado, para que um touro jovem fosse selecionado para entrar em teste de progênie, a única informação disponível era a média dos valores genéticos de seus pais, e não havia modo para determinar se o desempenho de um animal seria melhor ou pior do que a média dos seus pais. Desse modo, seriam necessários cerca de sete anos para que, com base nos desempenhos de sua progênie, esse animal fosse avaliado. Atualmente, em virtude da relação existente entre os marcadores moleculares e os genes relacionados às características de importância econômica, é possível estimar com segurança o provável desempenho de um animal logo após o seu nascimento.

Pesquisas desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture – USDA*) revelaram que, combinando-se as informações moleculares com as provenientes da média dos pais, pode-se obter o valor genômico para um animal com confiabilidade até duas vezes superior à obtida ao se considerar somente a informação da média dos pais, onde a confiabilidade é, geralmente, ao redor de 30% a 40%. É importante ressaltar que, para a obtenção desses altos valores, são necessárias as informações genotípicas e fenotípicas de milhares de animais.

Para uma novilha, o aumento na confiabilidade de seu valor genômico é o equivalente a medir várias de suas lactações e as de suas filhas. Para um touro jovem, o aumento na confiabilidade seria comparado à inclusão das lactações de 12 filhas. Ressalte-se que, para touros com mais de 80 filhas, o ganho em confiabilidade seria muito pequeno.

Em janeiro de 2009, foram publicadas pelo USDA as primeiras avaliações genômicas em gado de leite para as raças Holandesa e Jersey, disponíveis nas páginas das respectivas associações de criadores na internet:

<http://www.holsteinusa.com>

<http://www.usjersey.com>.