

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR EM PRODUÇÃO ANIMAL

Simone Cristina Méo Niciura

Pesquisadora em Genética Molecular Animal, Embrapa Pecuária Sudeste,
Rodovia Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP
simone@cnpse.embrapa.br

Introdução

Como definição, temos que a biologia molecular é o ramo da ciência que estuda a biologia ao nível das moléculas, ou seja, lida com a formação, com a estrutura e com a função dos ácidos nucléicos: DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico) e das proteínas. Os ácidos nucléicos constituem o material genético e as proteínas, os produtos de expressão.

A fita de DNA é “empacotada” por proteínas (histonas) no interior do núcleo de células eucarióticas de maneira a formar os cromossomos. O número de cromossomos é variável entre as espécies, os humanos possuem 22 pares de cromossomos autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais (dois X, nas fêmeas, e um X e um Y, nos machos), totalizando 46 cromossomos. Nos animais, há 64 cromossomos em cavalos, 60 em bovinos e caprinos, 54 em ovinos e 38 em suínos.

O DNA é constituído por duas fitas enoveladas entre si de maneira a formar uma dupla hélice. Essas duas fitas são anti-paralelas, ou seja, correm em direções opostas: a fita posicionada na direção 5' → 3' se anela à fita posicionada na direção 3' → 5'. Cada uma dessas fitas é constituída por vários nucleotídeos ligados uns aos outros no sentido 5' → 3'. Os nucleotídeos são formados por açúcar (ribose, no RNA, e desoxirribose, no DNA), grupo fosfato e uma das quatro bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), no DNA, ou uracila (U), no RNA. As bases A e G, moléculas de anel duplo, são chamadas de purinas, e as bases C, T e U, moléculas de anel único, são as pirimidinas. O pareamento entre as fitas de DNA se dá por duas pontes de hidrogênio entre as bases A e T e por três pontes de hidrogênio entre as bases G e C. Como a base A de uma fita de DNA se liga à base T da outra fita, dizemos que essas bases são complementares, assim como G e C.

O DNA funciona como um computador que estoca e transmite informações. A transmissão da mensagem hereditária para a próxima geração de células é feita por

meio da replicação (produção de uma cópia idêntica) do DNA pela enzima DNA polimerase. A replicação do DNA é semi-conservativa e cada fita original dará origem a uma nova dupla fita.

A transmissão da informação necessária para a síntese de uma proteína (a expressão de um gene) é feita pelos processos de transcrição e tradução. A seqüência das bases nitrogenadas no DNA irá determinar a ordem de formação dos 20 possíveis aminoácidos que irão constituir as proteínas. Como só existem 4 nucleotídeos para formar 20 aminoácidos, a célula usa três nucleotídeos (um códon) para especificar cada aminoácido. A seqüência das bases nitrogenadas na molécula de DNA constitui o código genético, uma vez que ela fornece um código para o posicionamento correto dos aminoácidos em uma proteína (Tabela 1). Cada série de três nucleotídeos no DNA especifica um aminoácido na cadeia protéica, dá um sinal para o início da cadeia (ATG ou metionina, chamada de *START* códon) ou dá um sinal para o término da transcrição (*STOP* códon).

Tabela 1. Código genético.

Primeira Base	Segunda Base				Terceira Base
	T	C	A	G	
T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	<i>STOP</i>	<i>STOP</i>	A
	Leu	Ser	<i>STOP</i>	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	T
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (<i>START</i>)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	T
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

As bases são lidas da esquerda para a direita. A: adenina, G: guanina, C: citosina, T: timina (ou U: uracila, no RNA); Ala: alanina, Arg: arginina, Asp: asparagina, Asp: ácido aspártico, Cys: cisteína, Gln: glutamina, Glu: ácido glutâmico, Gly: glicina, His: histidina, Ile: isoleucina, Leu: leucina, Lys: lisina, Met: metionina, Phe: fenilalanina, Pro: prolina, Ser: serina, Thr: treonina, Trp: triptofano, Tyr: tirosina, Val: valina.

O DNA permanece no núcleo enquanto as proteínas são sintetizadas em organelas (ribossomos) localizadas no citoplasma das células. Esse transporte da mensagem do núcleo para o citoplasma é realizado pelo RNA mensageiro (mRNA). O mRNA é uma cópia do DNA de um gene em especial, que atravessa a membrana nuclear e alcança os ribossomos. Então, se considerarmos o DNA como um computador, o mRNA funcionaria como um disquete ou um CD-ROM. A transcrição do mRNA pela enzima RNA polimerase II tem início em um sítio específico do gene: o sítio promotor, que só existe em uma das fitas de DNA (na fita *sense*), enquanto a outra fita permanece sem função (fita *nonsense*).

As diferenças do RNA em comparação ao DNA são: presença de um átomo extra de oxigênio no açúcar (ribose); presença da base uracila (U) que difere da timina (T) pela ausência de um carbono e de três átomos de hidrogênio associados; e estrutura de fita simples. O mRNA possui uma seqüência de nucleotídeos igual à seqüência dos éxons da fita codificante do DNA do qual ele foi copiado, exceto pela presença de bases U ao invés de T. Durante a transcrição e o processamento, o mRNA passa por algumas modificações: adição de um nucleotídeo incomum, chamado de 7-metilguanossina, em sua extremidade, formando um *cap* que é essencial para a ligação ao ribossomo e que protege contra a degradação; adição de mais de 20 nucleotídeos adenina em seqüência (poliadenilação), formando a cauda poli A no final da molécula de mRNA; e eliminação das seqüências não-codificantes do DNA (íntrons).

Além do mRNA, existem dois outros tipos de RNA: o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA). O tRNA transporta os aminoácidos até os ribossomos e possui um anticódon que orienta o pareamento dos códons do mRNA para a formação da proteína. O rRNA, junto com outras proteínas, constitui o ribossomo e auxilia no alinhamento do tRNA ao mRNA.

Dessa maneira, seqüências diferentes de bases no DNA especificam seqüências diferentes de bases no mRNA (transcrição), e as seqüências de bases no mRNA especificam a seqüência de aminoácidos nas proteínas (tradução). Esse caminho da informação desde o DNA até a síntese protéica é conhecido como dogma central da biologia molecular (Figura 1).

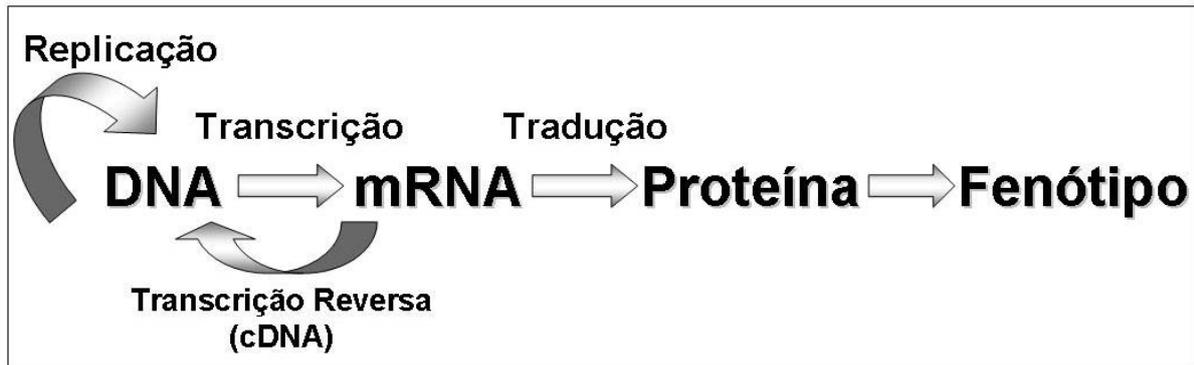


Figura 1. Dogma central da biologia molecular.

Ferramentas de Biologia Molecular

O conhecimento da biologia molecular permite a manipulação do DNA, por meio de técnicas de DNA recombinante, e leva ao isolamento, à identificação e à modificação seletiva de genes específicos. Uma vez que material genético está contido no interior das células, para a realização da maioria dos procedimentos de biologia molecular, o DNA e o RNA devem ser extraídos (ruptura das membranas celulares) e purificados (remoção de outros componentes, como proteínas e restos celulares). Para o DNA, vários protocolos estão disponíveis, como fenol e clorofórmio ou utilização de altas concentrações de sais (*salting-out*). Para o RNA, utilizam-se protocolos com fenol e clorofórmio associados a isotiocianato de guanidina ou colóide de lítio. Além dessas técnicas, existem kits comerciais que são específicos tanto para DNA e RNA, quanto para o tipo de tecido e para a quantidade de material disponível. Vale salientar que o trabalho com RNA requer muito mais cuidados, pois ele é mais instável que o DNA e é facilmente destruído pelas RNases (enzimas que degradam RNA) presentes nos tecidos.

Uma vez que as moléculas de DNA e de RNA são muito pequenas para a visualização ou apresentam-se em poucas cópias nos tecidos, estratégias são adotadas para aumentar sua quantidade e facilitar sua avaliação. A técnica de biologia molecular mais comumente utilizada para a amplificação do DNA é a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que constitui um método de obtenção de múltiplas cópias de uma seqüência-alvo de DNA. A PCR, desenvolvida na década de 1980 por Karry Mullis, busca mimetizar os eventos que ocorrem durante a replicação do DNA nas células e, para isso, utiliza uma enzima DNA polimerase termo-estável (Taq DNA polimerase). Além da polimerase,

a reação requer um DNA-alvo, os quatro desoxinucleotídeos ou dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a seqüência de DNA a ser amplificada. A PCR é realizada num equipamento denominado termociclador e ocorre em três fases, repetidas por diversas vezes (30 a 40 ciclos): desnaturação (92-95°C por 15-60 segundos), anelamento dos *primers* (55-65°C, variável de acordo com o *primer* e com a seqüência do DNA-alvo, por 15-60 segundos) e extensão pela Taq DNA polimerase (72-75°C por 15-60 segundos). Como a amplificação é exponencial, a cada ciclo de PCR a quantidade de DNA inicial dobra.

Os estudos com RNA detectam e mensuram o mRNA presente nas células e nos tecidos, de maneira a permitir a avaliação da expressão gênica. Para a amplificação do RNA, antes da PCR, o mRNA precisa ser convertido em DNA complementar (cDNA), por meio da transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription-PCR*). Essa técnica utiliza o RNA total como molde para uma enzima transcriptase reversa e requer a utilização dos dNTPs, de um inibidor de RNases e de um oligonucleotídeo iniciador. O oligonucleotídeo iniciador pode ser o *primer* oligo dT (oligonucleotídeo formado por bases T, que se liga à cauda poli A do mRNA), os *primers* hexâmeros randômicos (oligonucleotídeos com combinação aleatória de 6 bases) ou o *primer* gene-específico (complementar ao gene-alvo). A RT-PCR é constituída das seguintes etapas: aquecimento inicial a 65-70°C por 5 minutos para anelamento do *primer*, adição da transcriptase reversa e incubação a 42°C por 50-60 minutos para extensão do cDNA e inativação da enzima por incubação a 70°C por 15 minutos. Após a conversão, o cDNA é utilizado diretamente na PCR para a avaliação da expressão gênica por PCR semi-quantitativa, na qual um gene-alvo é comparado a um gene controle endógeno que possui expressão constitutiva, isto é, expressão semelhante entre tecidos e fases do desenvolvimento. Para a quantificação da expressão de um gene é necessária a realização da PCR em tempo-real, em um termociclador específico, equipado com detector de fluorescência e acoplado a um computador. Nesse procedimento, a detecção dos produtos é realizada simultaneamente à amplificação, por meio da utilização de sondas fluorescentes ou de corantes de DNA, como o *SYBR Green*. Esse método é mais confiável que a RT-PCR semi-quantitativa para avaliação da expressão gênica. Além disso, por ser bastante sensível, permite a quantificação de amostras que contêm pouco mRNA.

Em situações em que a quantidade de DNA ou RNA ainda é limitante para a aplicação da PCR, por exemplo, em biópsias de embriões ou para a detecção de patógenos, outras técnicas de biologia molecular precisam ser aplicadas. Dentre elas, a realização de *Nested-PCR*, que consiste na amplificação do DNA-alvo em duas etapas, de maneira a aumentar a especificidade da reação. Na primeira PCR, são usados *primers* externos que flanqueiam o DNA-alvo; na segunda reação, o produto de amplificação da primeira reação é utilizado como DNA-alvo para *primers* internos. Outra estratégia é a pré-amplificação do DNA pela utilização de oligonucleotídeos degenerados específicos (*Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR* ou DOP-PCR) ou inespecíficos (*Primer Extension Preamplification* ou PEP), em reação com anelamento a baixas temperaturas. Para o RNA, as estratégias de pré-amplificação, realizadas após a transcrição reversa, podem ser lineares, como a transcrição *in vitro* baseada em T7, ou exponenciais, pela amplificação baseada em PCR, como SMART-PCR e amplificação de RNA por continuação terminal (TC).

É possível amplificar vários fragmentos de DNA em uma única reação por meio da técnica de PCR multiplex, que consiste na utilização de uma mistura de múltiplos pares de *primers* na mesma PCR.

Os produtos amplificados por PCR podem ser avaliados por eletroforese ou por seqüenciamento. A eletroforese (carreamento de moléculas por corrente elétrica), também utilizada para avaliação dos produtos de RT-PCR, consiste na separação dos fragmentos de DNA pelo tamanho. Para isso, o DNA é depositado em um gel suporte feito de agarose ou de poli(acrilamida), que, na presença de um tampão, é submetido à corrente elétrica. Como o DNA possui carga negativa, devido aos grupos fosfatos, os fragmentos são atraídos em direção ao pólo positivo, no entanto, a velocidade de migração depende da resistência oferecida pelo gel, de maneira que os fragmentos menores migram mais rapidamente que os fragmentos maiores. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA separados pelo tamanho podem ser visualizados por coloração com brometo de etídeo (em gel de agarose) ou com prata (em gel de poli(acrilamida)).

Diferente da eletroforese, o seqüenciamento permite identificar tanto o tamanho quanto a seqüência dos nucleotídeos de um fragmento de DNA. O seqüenciamento pode ser feito por métodos enzimáticos ou químicos. O método de seqüenciamento enzimático mais conhecido é denominado de terminação da cadeia por nucleotídeo didesoxi. Esse método, desenvolvido por Sanger e colaboradores

em 1978, consiste no término da síntese da cadeia complementar ao DNA-alvo em quatro reações de PCR separadas, cada uma contendo um 2',3'-didesoxinucleotídeo (ddNTP) marcado por fluorescência e uma mistura dos quatro desoxinucleotídeos (dNTPs) não-marcados. Assim, cada reação, interrompida quando o ddNTP é incorporado à cadeia, gera fragmentos de DNA que terminaram em sítios específicos A, C, G ou T. Esses fragmentos marcados são, então, separados por eletroforese em capilar ou em gel de poliacrilamida e podem ser identificados no equipamento de seqüenciamento automático. Esse é o método mais amplamente utilizado para o seqüenciamento em larga escala. O método químico, desenvolvido por Maxam e Gilbert em 1977, consiste na clivagem direta do DNA marcado em uma ou duas bases específicas, usando reagentes químicos. Por exemplo, o dimetilsulfato e o tetróxido de ósmio clivam a base G; os ácidos clivam bases purinas (G e A); a hidrazina cliva bases pirimidinas (T e C); a hidrazina com sais cliva C; e o NaOH cliva A. Essas reações específicas para cada base, em condições controladas, geram fragmentos que podem ser avaliados a fim de que a seqüência de nucleotídeos seja determinada.

As diferenças entre indivíduos ocorrem devido a variações nas seqüências de seus nucleotídeos, conhecidas como polimorfismos. A detecção dos polimorfismos permite a determinação do genótipo (genotipagem) de um animal e pode ser feita por técnicas como seqüenciamento gênico, PCR seguida de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP, do inglês *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*), polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP, do inglês *Single-Strand Conformation Polymorphism*) ou discriminação alélica.

O PCR-RFLP consiste na amplificação de uma seqüência de DNA por PCR e digestão do produto amplificado com uma enzima de restrição (endonuclease de restrição) que reconhece e cliva uma seqüência específica de bases em uma molécula de DNA. Os polimorfismos eliminam ou criam sítios de restrição para a enzima e, assim, podem ser identificados após eletroforese por meio das diferenças no tamanho dos fragmentos gerados pela digestão. O RAPD baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA por *primer* arbitrário e permite distinguir seqüências complementares de não complementares devido a algum polimorfismo. O SSCP é usado para a identificação de modificações que afetam a seqüência de nucleotídeos

(e não o tamanho) e levam à alteração no padrão de migração dos fragmentos em eletroforese, após desnaturação das fitas de DNA. A discriminação alélica consiste na utilização, na PCR ou na PCR em tempo-real, de *primers* ou sondas específicos para a região que contém o polimorfismo.

A avaliação genética em larga escala pode ser realizada por meio da técnica de microarranjo. O microarranjo (*microarray* ou chip de DNA) consiste numa lâmina de vidro contendo muitas sondas de DNA. As sondas são moléculas de DNA de fita simples, com cerca de 20 bases, de seqüência conhecida e que irão se ligar (hibridizar) a um DNA-alvo que apresente seqüência complementar. O microarranjo permite que o DNA de uma amostra, marcado com fluorescência, seja analisado simultaneamente para centenas de genes. Para bovinos, há microarranjos comercialmente disponíveis para a avaliação de expressão gênica (*GeneChip® Bovine Genome Array*, para 23.000 transcritos) e para a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*; *GeneChip® Bovine Mapping 10K SNP*, para quase 10.000 SNPs).

Aplicação de Biologia Molecular na Produção Animal

Avanços recentes na biologia molecular fornecem ferramentas para a promoção do melhoramento genético animal. Em bovinos, as principais aplicações das técnicas de biologia molecular são para:

- Seleção assistida por marcadores moleculares (MAS, do inglês *Marker-Assisted Selection*). Programas tradicionais de melhoramento genético têm buscado a seleção de animais para características de interesse comercial. No entanto, ao se basearem, principalmente, em testes de progênie, os resultados desses projetos demoram a ser alcançados. Por outro lado, com o advento das técnicas de biologia molecular, vários testes tornaram possível a classificação dos animais em momentos precoces do desenvolvimento, antes da idade reprodutiva e da produção de descendentes e inclusive durante a fase embrionária. Assim, esses testes permitiram o estabelecimento de critérios para a identificação e a seleção mais rápidas dos animais portadores de características de interesse comercial, de maneira a diminuir o intervalo entre gerações, acelerar o progresso genético e reduzir os custos de produção.

A principal dificuldade da MAS é que a maioria das características quantitativas (que incluem, por exemplo, características produtivas, reprodutivas e de resistência a doenças) é determinada por muitos genes, cada um deles com um pequeno efeito. Entretanto, quando um desses genes possui maior importância no controle de determinado fenótipo, é possível identificar a região cromossômica (ou QTL, do inglês, *Quantitative Trait Loci*) associada a essa característica.

Os QTLs são obtidos por meio da avaliação da segregação de marcadores moleculares em populações experimentalmente delineadas. Os marcadores moleculares servem como marcos no genoma e, geralmente, não são genes e, portanto, não produzem efeito biológico. Os marcadores são seqüências de DNA identificáveis, encontradas em localizações específicas do genoma e transmitidas para os descendentes. Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, como RFLP, RAPD, microssatélites (seqüências simples de DNA repetitivo) e SNPs. Na produção animal, os microssatélites têm sido os marcadores moleculares de maior importância para a determinação de QTLs.

Em bovinos, já foram descritos 630 QTLs que afetam 89 características. A localização cromossômica de QTLs que influenciam significativamente algumas características de interesse econômico, em bovinos, está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Localização de QTLs para características de importância econômica em bovinos.

Característica	Cromossomo Bovino
Ganho de peso médio diário	2, 6, 14, 19 e 21
Espessura de gordura subcutânea (acabamento)	5, 6, 14, 19, 21 e 23
Área de músculo longíssimo (contra-filé)	2, 4, 5 e 6
Escore de marmorização (gordura intramuscular)	2, 3, 4, 5, 6, 13, 14 e 23
Maciez da carne	15 e 29
Produção de leite	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 27 e 29
Conformação do úbere	14 e 20
Contagem de células somáticas (mastite)	2, 4, 5, 7, 9, 10, 18, 21, 22, 23 e 27
Fecundidade	10 e 18
Concentração de hormônio folículo estimulante (FSH)	5
Taxa de ovulação	5, 10 e 19
Taxa de partos gemelares	5 e 7
Temperamento	29
Resistência à encefalopatia espongiforme bovina (BSE ou “doença da vaca louca”)	1, 6, 13, 17 e 19

Entretanto, uma vez que são as variações genéticas, em nível de nucleotídeos, que determinam as diferenças fisiológicas ou fenotípicas entre os indivíduos, a desvantagem do estudo de QTL é que ele não identifica o gene que afeta a característica, mas sim uma região cromossômica que pode conter vários genes. Assim, o estudo de SNPs em genes candidatos posicionais (escolhidos por sua localização em regiões em que já foram identificados QTLs) ou funcionais (cujas ações biológicas estão envolvidas no desenvolvimento ou na fisiologia da característica de interesse) pode ser uma estratégia interessante. Os SNPs são muito comuns no genoma bovino e contribuem significativamente para a variação genética, pois influenciam os níveis de expressão gênica ou a estrutura de proteínas. Os SNPs podem ser genotipados por várias técnicas, como seqüenciamento, PCR-RFLP ou discriminação alélica. Nos bovinos, já foram encontrados polimorfismos em genes importantes para a produção e para a qualidade do leite e da carne, como κ -caseína, β -lactoglobulina, hormônio do crescimento, prolactina, calpastatina, calpaína, leptina, diacilglicerol transferase-1 e tireoglobulina. Existem testes comerciais disponíveis para a avaliação desses polimorfismos, como o GeneSTAR® Tenderness e o Igenity *TenderGENE*™ que detectam polimorfismos nos genes calpaína e calpastatina, relacionados à maciez da carne; e o GeneSTAR® Quality Grade para tireoglobulina e mais 3 SNPs relacionados ao escore de marmorização.

Vale salientar que a implementação da seleção assistida por marcadores deve ser feita com cautela, uma vez que a seleção para um marcador pode promover efeitos negativos em outras características.

- Rastreabilidade. Segundo os padrões internacionais, rastreabilidade é definida como a habilidade de descrever a história, a aplicação, os processos ou os eventos e a localização de um produto, a uma determinada organização, por meios de registros e de identificação. A rastreabilidade tem se tornado uma exigência econômica, sanitária, social e política para a comercialização de produtos de origem animal. Assim, sistemas de identificação animal baseados em DNA permitem o acurado acompanhamento de um animal durante toda a cadeia produtiva, do nascimento ao consumo do produto final.

- Conservação de recursos genéticos. A biologia molecular tem sido utilizada para a caracterização de recursos genéticos animais visando à identificação da origem e da formação de raças bovinas, à conservação da variabilidade genética existente entre as raças e à preservação de espécies em risco extinção.

- Detecção de mutações. Os testes de biologia molecular têm sido realizados para a detecção de mutações que levam a patologias, como a deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD), a malformação vertebral complexa (CVM), a citrulinemia e a sindactilia, e permitem a eliminação precoce de animais portadores de doenças. Além disso, a genotipagem possibilita a identificação da mutação do gene da miostatina responsável pelo fenótipo de aumento de massa muscular, denominado de “musculatura dupla”, nas raças bovinas Belgian Blue e Piemontês.

- Detecção de patógenos. A biologia molecular pode ser utilizada para o controle sanitário de rebanhos, a fim de promover o diagnóstico precoce e evitar a disseminação de doenças. Em bovinos, permite o diagnóstico de patógenos, como *Plasmodium*, *Tritrichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Trypanosoma spp.*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. Em embriões e em doses de sêmen, a avaliação da contaminação por vírus, como o vírus da diarréia bovina (BVDV), o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV) e o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), também pode ser feita por biologia molecular.

- Teste de paternidade. A acurada identificação do parentesco é de extrema importância para o registro animal e para a aplicação de biotecnologias com embriões, como fecundação *in vitro* e transferência de embriões, em nível nacional e internacional. Assim, técnicas de biologia molecular permitem assegurar que um determinado indivíduo é realmente descendente dos supostos pais.

- Sexagem de embriões. A sexagem foi a primeira técnica comercial de seleção de embriões e envolve a utilização da PCR para a co-amplificação de uma seqüência autossômica (amplificada em machos e em fêmeas) e de um fragmento gênico específico do cromossomo Y (amplificado só em machos). Por meio dessa técnica, a partir de um pequeno fragmento obtido por biópsia, é possível identificar e selecionar embriões machos (XY) e fêmeas (XX) com acurácia de até 98%. Na produção

animal, o diagnóstico precoce do sexo do conceito, por meio da sexagem, permite a seleção da progênie para o sexo desejado e orienta os esquemas de acasalamento levando ao maior aproveitamento do potencial de machos e de fêmeas de elevado mérito genético.

- Determinação da viabilidade embrionária. O potencial de desenvolvimento de um embrião pode ser determinado pela avaliação, por meio de RT-PCR e PCR em tempo-real, do padrão de expressão de genes essenciais para o desenvolvimento, como os relacionados ao estresse oxidativo e ao estresse térmico.

- Transferência gênica ou transgênese. A transgênese é a transferência e a incorporação permanente, que pode ser transmitida aos descendentes, de genes no genoma de um indivíduo a fim de modificar suas características físicas. Na produção animal, a transgênese é utilizada para aumentar a qualidade e a quantidade da produção, conferir resistência a doenças ou produzir proteínas de alto valor na glândula mamária ou em outros órgãos (os animais tornam-se biorreatores para produção de fatores, como insulina, hormônio de crescimento e fator VIII de coagulação). Entretanto, essa metodologia ainda é limitada devido a dificuldades técnicas.

LITERATURA CONSULTADA

ALCAMO, I. E. **DNA technology: the awesome skill**. 2^a. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2001. 348 p.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 223-243, 2007.

ANSWERS.COM health. Disponível em: < <http://www.answers.com/topic/molecular-biology?cat=health>>. Acesso em: 25 de junho de 2007.

BIELASNKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, p. 110-116, 2000.

BOONKUSOL, D.; GAL, A. B.; BODO, S.; GORHONY, B.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification

of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 700-708, 2006.

BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 23-34, 2001.

CALLADINE, C. R.; DREW, H. R.; LUISI, B. F.; TRAVERS, A. A. **Understanding DNA: the molecule & how it works**. 3^a. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 352 p.

CHRENEK, P.; BOULANGER, L.; HEYMAN, Y.; UHRIN, P.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; RENARD, J. P. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. **Theriogenology**, v. 55, p. 1071-1081, 2001.

CURSO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS À PRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2007, São Carlos. **Manual de Laboratório...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 71 p.

DEARLOVE, A. M. High throughput genotyping technologies. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 139-150, 2002.

EUN, H. M. **Enzymology primer for recombinant DNA technology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 1996. 702 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genéticas**. 3^a. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GEORGES, M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p. 131-162, 2007.

GUIMARÃES, E. P.; RUANE, J.; SCHERF, B. D.; SONNINO, A.; DARGIE, J. D. (eds.). **Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish**. Roma: FAO, 2007. 471 p.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 245-264, 2003.

HEATON, M. P.; HARHAY, G. P.; BENNETT, G. L.; STONE, R. T.; GROSSE, W. M.; CASAS, E.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L.; CHITKO-MCKOWN, C. G.; LAEGREID, W. W. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 272-281, 2002.

LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; KNEELAND, J.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 967-972, 2004.

NATIONAL animal genome research program: bioinformatics coordination program. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/bioinfo/>>. Acesso em: 14 de julho de 2007.

NYGAARD, V.; HOLDEN, M.; LOLAND, A.; LANGAAS, M.; MYKLEBOST, O.; HOVIG, E. Limitations of mRNA amplification from small-size cell samples. **BioMed Central Genomics**, v. 6, p. 147, 2005.

RASTREABILIDADE. Disponível em: <<http://www.fatec.com.br/rastreabilidade.html>>. Acesso em: 15 de julho de 2007.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (eds.) **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

REGITANO, L. C. A.; MÉO, S. C. (eds.) **I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 108 p.

THE bovine QTL viewer. Disponível em: <<http://bovineqtlv2.tamu.edu/index.html>>. Acesso em: 14 de julho de 2007.

VAN EENENNAAM, A. Marker assisted selection in beef cattle. Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2007.

VIRTA, J.; MARKOLA, J.; PEIPPO, J.; MARKKULA, M.; VILKKI, J. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. **Theriogenology**, v. 57, p. 2229-2236, 2002.

WIKIPEDIA a enciclopédia livre. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Biologia_molecular>. Acesso em: 25 de junho de 2007.

WOLF, E.; SCHERNTHANER, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; PRELLE, K.; STOJKOVIC, M.; BREM, G. Transgenic technology in farm animals – progress and perspectives. **Experimental Physiology**, v. 85, p. 615-625, 2000.

WU, X. L.; MACNEIL, M. D.; DE, S.; XIAO, Q. J.; MICHAL, J. J.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; WRIGHT JR, R. W.; JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. **Genetica**, v. 125, p. 103-113, 2005.