

GENÉTICA MOLECULAR COMO INDICAÇÃO PRECOCE OU UMA FERRAMENTA DA GENÉTICA QUANTITATIVA.

Luciana Correia de Almeida Regitano - Pesquisadora
Embrapa - CPPSE

1. Introdução

Progressos excepcionais foram experimentados no campo da genética molecular nos 10 últimos anos. Antes deste período, poucos projetos científicos nessa área eram voltados para animais domésticos. Além disso, as razões que norteavam tais estudos eram as mais diversas, geralmente não relacionadas à produção animal, como por exemplo o desenvolvimento de modelos para estudo de doenças hereditárias em humanos, produção de proteínas para a indústria farmacológica, estudos de evolução e filogenia das espécies.

Grande parte desse progresso, mais particularmente aquele verificado nos últimos 5 anos, ocorreu na área da pesquisa genômica e pode ser atribuída aos desenvolvimentos metodológicos e científicos alcançados pelo projeto genoma humano.

Projetos de mapeamento genômico em animais domésticos aliados ao mapeamento comparativo deverão fornecer as bases para a manipulação do genoma dos animais de acordo com as necessidades e exigências do mercado. Em bovinos, aproximadamente 400 genes encontram-se mapeados em grupos sintênicos, sendo todos os grupos atribuídos a cromossomos. Mapas de ligação compostos por cerca de 1.600 marcadores posicionados a intervalos médios inferiores a 2,5 centimorgans (Barendse et al., 1997; Kappes et al., 1997) permitem a localização de genes envolvidos na herança de caracteres de importância econômica (ETLs), tanto qualitativos quanto quantitativos. Apesar do evidente progresso alcançado na tecnologia genômica e da identificação de várias regiões cromossômicas responsáveis pela herança de algumas características já ser uma realidade, a questão do mapeamento de ETLs é complexa. A natureza poligênica da grande maioria dos caracteres de interesse econômico dificulta a identificação de marcadores ligados à ETLs com efeitos que justifiquem sua aplicação no melhoramento animal. Porém, considerando a velocidade do desenvolvimento desta tecnologia, é possível vislumbrar a futura identificação e clonagem dos ETLs em si. Além disso, a aplicação de marcadores moleculares no diagnóstico de doenças hereditárias, na identificação individual e de paternidade vem deixando sua contribuição como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento.

2. Aplicação dos marcadores genéticos no mapeamento de QTLs

O melhoramento genético animal tem sido conduzido sob os princípios da genética quantitativa, alcançando ganhos significativos em todas as espécies. Uma linhagem de frango de corte de 1991 chega a ser três vezes mais pesada do que um linhagem de 1957 sob a mesma dieta e à mesma idade (Haley, 1995). A taxa de crescimento da produção anual de leite por vaca tem aumentado nos últimos anos na América do Norte. Os valores de DEP de fêmeas nascidas em 1986 foram aproximadamente 135 kg superiores aos das fêmeas nascidas em 1985 (Wiggans, 1991).

A existência de genes principais, que contribuem com grande parte da variação fenotípica de um caráter quantitativo, tem sido demonstrada. Alguns exemplos são o gene da hipertrofia muscular



(*mh*) em bovinos (Nott & Rollins, 1979), a mutação no receptor da Ryanodina dos suínos (MacLeenan & Phillips, 1992) e o gene de fertilidade (*Fec*) dos ovinos (Lanneluc *et al.*, 1994). Essa situação, entretanto, pode ser considerada como exceção uma vez que a maioria dos caracteres quantitativos deve ser controlada por um grande número de genes, cada um com pequeno efeito sobre o caráter (Massey & Georges, 1992).

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

O desenvolvimento de marcadores para alcançar esse objetivo tem se valido basicamente de duas estratégias. A primeira utiliza marcadores aleatórios para a construção de mapas genéticos saturados. Esses marcadores são então avaliados em estudos de correlação com características de interesse econômico e utilizados na identificação de locos que afetam caracteres quantitativos ou QTLs (Geldermann, 1975). O sucesso dessa estratégia depende primariamente da construção de mapas de ligação detalhados, com marcadores dispostos a intervalos inferiores a 20 cM. A construção de tais mapas tornou-se possível com a utilização de marcadores altamente polimórficos, particularmente aqueles que exploram o polimorfismo de sequências repetitivas de DNA. Em bovinos, mapas genéticos publicados por Bishop *et al.* (1994), Barendse *et al.* (1994), Barendse *et al.* (1997) e Kappes *et al.* (1997) fornecem marcadores suficientes para uma cobertura superior a 95% do genoma a uma distância média inferior a 2,5 cM. Os primeiros resultados do emprego desses marcadores em análises de intervalo têm sido relatados. Ron *et al.* (1994) identificaram um QTL no cromossomo 21 dos bovinos com um efeito de 0,2 desvios-padrões fenotípicos para produção de leite e 0,16 desvios-padrões para proteína total. Georges *et al.* (1995), encontraram fortes evidências da presença de QTLs para características de produção de leite nos cromossomos 1, 6, 9, 10 e 20 dos bovinos. Os efeitos dos diferentes QTLs contribuíram com 11 a 52% da variância total dentro de famílias de meios-irmãos.

O sucesso desses experimentos pode também ser atribuído ao desenvolvimento de métodos estatísticos e delineamentos genéticos adequados (Weller *et al.*, 1990). Em bovinos de leite, a disponibilidade de grandes famílias de touros também tem contribuído para um maior avanço no mapeamento de QTLs para características de produção de leite.

Além dessas famílias, cruzamentos direcionados, coordenados pelo USDA, CSIRO e pela Universidade Texas A&M têm sido utilizados para a produção de famílias de referência de bovinos. Informações sobre esses projetos podem ser obtidas na internet acessando as páginas <http://sol.marc.usda.gov/>, <http://spinal.tag.csiro.au/>, <http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase>.

A segunda estratégia de identificação de QTLs consiste na detecção de polimorfismo em genes que estão diretamente relacionados com a característica de produção, denominados genes candidatos. Por exemplo, a variação genética nos locos que controlam fatores de crescimento tem sido associada à diferenças no desenvolvimento ponderal, em características de qualidade da carne e de produção de leite dos bovinos. Na raça Hereford, Moody *et al.* (1994) verificaram efeitos significativos e positivos da substituição de alelos do gene IGF-I na DEP para peso ao nascimento, peso à desmama e a um ano de idade. O polimorfismo *TaqI* no gene do hormônio de crescimento foi associado à características de produção e qualidade da carne (Taylor *et al.*, 1998).

Outro bom exemplo da estratégia de utilização de genes candidatos é encontrado em suínos. Estudos do tamanho da leitegada em suínos da raça Meishan demonstraram o acréscimo de mais de 1 leitão por leitegada associado a um polimorfismo do receptor do estrogênio. A ocorrência deste polimorfismo em linhagens comerciais foi posteriormente verificada e seu efeito nessas linhagens foi de aproximadamente 0,5 leitão por leitegada (Short *et al.*, 1997).

O panorama atual da investigação de QTLs para características de produção de leite pode ser visualizado na Tabela 1. É possível observar que em alguns cromossomos, como por exemplo, Bta 1, Bta 6 e Bta 11, evidências da presença de QTLs foram obtidas em diferentes populações e em diferentes condições experimentais, o que aumenta a consistência desses resultados.

3. *Deteção de doenças:*

Shuster et al. (1992) identificaram uma doença hereditária em bovinos que causa deficiência na adesão de leucócitos (BLAD). A doença só ocorre em animais homozigotos recessivos, nos quais a redução na expressão de beta-2 integrina resulta em leucócitos anormais que não conseguem penetrar nos tecidos para destruir os agentes patogênicos. Animais homozigotos para esta doença raramente sobrevivem, causando perdas significativas para produtores. A frequência do gene causador desta doença foi determinada no rebanho de gado Holandês norte americano e é de 15% entre os touros e de 6% entre as vacas. Todos os animais portadores desta doença são relacionados com um único touro, Osborndale Ivanhoe. Como este touro apresenta boas características de produção, o seu sêmen tem sido utilizado em vários países, inclusive o Brasil. Calcula-se que esta doença cause perdas em torno de US\$ 5 milhões por ano nos Estados Unidos. O diagnóstico pode ser realizado utilizando a técnica de PCR nas condições descritas por Shuster et al. (1992). Um fragmento de DNA de 58 pares de bases, que contem o nucleotídeo 383 do gene que codifica a proteína CD18 em bovinos, é amplificado. É nesta posição que ocorre a substituição de uma adenina por guanina em animais portadores da doença. Esta substituição causa uma mudança no codon e resulta na substituição de um ácido aspártico por uma glicina no DNA dos animais mutantes. A mutação pode ser detectada pela digestão DNA amplificado com diferentes enzimas de restrição. A digestão do fragmento amplificado com a enzima *TaqI* resulta em fragmentos de 26 e 32 pares de bases em animais normais. Em animais com a doença (BLAD), o DNA não é digerido por *TaqI*. Por outro lado, em animais portadores da doença, fragmentos de 58, 32 e 26 pares de bases são observados. Atualmente as empresas de inseminação artificial nos Estados Unidos testam rotineiramente seus reprodutores para esta doença.

Outra doença hereditária de grande interesse, denominada Weaver, é encontrada quase que exclusivamente em bovinos da raça Suíça Parda e caracteriza-se por paresia progressiva dos membros pélvicos e ataxia. A doença foi atribuída a um único gene recessivo de penetrância completa.

O interesse pelo estudo desse gene foi despertado pelo aumento da frequência da mutação em rebanhos melhorados, que poderia ser resultante de uma vantagem seletiva dos indivíduos portadores da mutação. Essa teoria foi reforçada por Hoeschele & Meinert (1990) ao descreverem uma associação entre a doença e produção de leite. A diferença estimada entre indivíduos portadores e não portadores foi de 690 kg de leite e 26,2 kg de gordura. A magnitude do efeito sobre a produção sugere que a mutação deve estar próxima a um gene com grande efeito na produção de leite. Dessa forma, a identificação de indivíduos portadores é essencial para evitar que, como consequência da seleção para produção, o aumento na frequência do gene coloque em risco a sobrevivência da raça.

Um marcador de DNA microssatélite foi mapeado muito próximo ao gene responsável pela doença (Georges et al., 1993). Esse marcador deverá permitir a identificação de indivíduos portadores, sem a necessidade de teste de progênie. Além disso, esse marcador deverá contribuir para o mapeamento da região cromossômica responsável pelo acréscimo na produção de leite, que poderá ser realizado mesmo em raças que não apresentam a doença Weaver.

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

revisão detalhada sobre esse assunto é encontrada em Buitkamp & Epplen (1996).

4. Considerações Finais

Os primeiros esforços no sentido de identificar genes que controlam características de interesse econômico em animais foram limitados pela falta de marcadores genéticos informativos. Com o desenvolvimento da genética molecular, bons resultados vêm sendo obtidos, demonstrando a existência de QTLs para diferentes características nos diversos cromossomos dos bovinos. Saliento aqui que sequer comentei sobre genoma mitocondrial, para o qual já existem evidências de associação com ETLs. No atual estado de conhecimento sobre o genoma bovino, a descoberta de muitos outros QTLs é eminente. Entretanto, sua utilização em programas de melhoramento dependerá ainda de uma série de fatores, entre os quais a viabilidade econômica.

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

5. Referências

- Andersson-Eklund L, Danell B, Rendel J Associations between blood groups, blood protein polymorphisms and breeding values for production traits in Swedish Red and White Dairy bulls. **Animal Genetics**, 21:361-76, 1990.
- Andersson-Eklund L, Rendel J Linkage between amylase-I locus and a major gene for milk fat content in cattle. **Animal Genetics**, 24:101-3, 1993
- Barendse W., Armitage S. M., Kossarek L. M., Shalom A., Kirkpatrick B. W., Ryan A. M., Clayton D, Li L., Neiberg H. L., Zhang N., Grosse W. M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A. J., Fries R., McGraw R. A., Moore S. S., Georges M., Soller J. E., Womack J. E., Hetzel, D. J. S. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, 6: 227-244, 1994.
- Barendse, W., Vaiman, D., Kemp, S.J., Sugimoto, Y., Armitage, J.L., Williams, J.L., Sun, H.S., Eggen, A., Agaba, M., Alevasin, S.A., Band, M., Bishop, M.D., Buitkamp, J., Byrne, K., Collins, F., Cooper, L., Copettiers, W., Denys, B., Drinkwater, R.D., Easterday, K., Elduque, C., Emis, S., Erhardt, G., Ferretti, L., Flavin, N., Gao, Q., Georges, M., Guring, R., Harzilius, B., Hawkins, G., Hetzel, J., Hirano, T., Hulme, D., Jorgensen, C., Kessler, M., Kirkpatrick, B.W., Kontfortov, B., Kostia, S., Kuhn, C., Lenstra, J.A., Levezel, H., Lewin, H.A., Leyhe, B., Lil, L., Burriel, I.M., McGraw, R.A., Miller, J.R., Moody, D.E., Moore, S.S., Nakane, S., Nijman, L.J., Olsaker, I., Pomp, D., Rando, A., Ron, M., Shalom, A., Teale, A.J., Thieven, U., Urquhart, B.G.D., Vage, D.I., Van De Weghe, A., Varvio, S., Velmala, R., Vilkki, J., Weikard, R., Woodside, C., Womack, J.E., Zanotti, M., Zaragoza, P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, 8:21-28, 1997.
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S.L.F., Hawkins, G. A., Toldo, S. S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., Beattie, C. W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136: 619-639, 1994.
- Buitkamp, J. & Epplen, J.T. Modern diagnostic research and DNA diagnostics in domestic animals in the light of classical breeding. **Electrophoresis**, 17: 1-11, 1996.
- Cowan, C.M. et al. **Theoretical and Applied Genetics**, 79: 577-582, 1990.
- Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny A, Portetelle D, Renaville R. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **J Dairy Sci**, 79:1446-53, 1996
- Geldermann, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, 46: 319-330, 1975.
- Georges, M.; Nielsen, D.; Mackinnon, M.; Mishra, A.; Okimoto, R.; Pasquino, A.T.; Sargeant, L.S.; Sorensen, A.; Steele, M.R.; Zhao, X.; Womack, J.E.; Hoeschele, I. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, 139: 907-920, 1995.
- Halley, C. S. Livestock QTLs – bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, 11: 488 – 492, 1995.

- Hoeschele I., Meinert T.R. Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. **J Dairy Sci** **73**: 2503-15, 1990.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P., Lopez-Corrales N.L., Beattie, C.W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, **7(3)**:235-49, 1997
- Lanneluc, R.D.; Drinkwater, R.D.; Elsen, J.M.; Hetzel, D.J.S.; Nguyen, T.C.; Piper, L.R.; Thimonier, J. Genetic markers for the Booroola fecundity (*Fec*) gene in sheep. **Mammalian Genome**, **5**: 26-33, 1994.
- Lee BK, Lin GF, Crooker BA, Murtaugh MP, Hansen LB, Chester-Jones H Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. **Domest Anim Endocrinol**, **13**:373-81, 1996.
- MacLennan D.H., Phillips M.S. Malignant hyperthermia. **Science**, **8**: 789-94, 1992
- McLean DM, Graham ER, Ponzoni RW, McKenzie HA Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **J Dairy Res.**, **51(4)**:531-46, 1984.
- Massey, J.M. & Georges, M. Genmark's approach to marker-assisted selection. **Animal Bio-technology**, **3**: 95-109, 1992.
- Moody, D.E., Pomp, D., Newman, S., McNeil, M.D. Characterization of DNA polymorphisms and their association with growth and maternal traits in line 1 Hereford cattle. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5, Guelph, Canada, August 1994. **Proceedings**, Guelph: Organizing Committee, 1994. **21**, 221-224.
- Nott, C.F.G. & Rollins, W., Effect of the *mh* gene for muscular hypertrophy on birth weight and growth to one year of age in beef cattle. **Growth**, **43**: 221, 1979.
- Ron, M.; Band, M.; Yanai, A.; Weller, J. I. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. **Animal Genetics**, **25**: 259-264, 1994.
- Short T.H., Rothschild M.F., Southwood O.L., McLaren D.G., de Vries A., van der Steen H., Eckardt G.R., Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J., Plastow G.S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**; **75**:3138-42, 1997.
- Shuster D.E., Kehrl M.E. Jr, Ackermann M.R., Gilbert R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proc Natl Acad Sci USA**, **89**:9225-9, 1992.
- Taylor J.F., Coutinho L.L., Herring K.L., Gallagher D.S. Jr, Brenneman R.A., Burney N., Sanders J.O., Turner J.W., Smith S.B., Miller R.K., Savell J.W., Davis S.K. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, **29(3)**:194-201, 1998.
- Thoday, J.M. Location of polygenes. **Nature**, **191**: 368-370, 1961.
- Weller, J.I. ; Kashi, Y.; Soller, M. Power of "daughter" and "granddaughter" designs for genetic mapping of quantitative traits in dairy cattle using genetic markers. **Journal of Dairy Science**, **73**: 2525 - 2537, 1990.
- Wiggans, G.R. National genetic improvement programs for dairy cattle in the United States. **Journal of Animal Science**, **69 (9)**:3853-60, 1991.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos na identificação de QTLs para características de produção de leite.

Marcador/ Gene	Cromos.	Característica	Populações	Referência
TF (β -globulina)	Bta 1	Produção de leite	Friesian, Shorthorn, Ayresshire, Channel Island	Ashton, GC 1960
TF	Bta 1	Produção de leite, Produção de gordura	Friesian, Ayresshire, Guernsey, Shorthorn, Jersey	Jamieson & Robertson, 1967
TF	Bta 1	Produção de leite	Jersey, Guernsey	Ashton & Hewetson, 1969
TGLA49- TGLA57	Bta 1	Produção de leite, Produção de proteína	Holstein	Georges et al., 1995
AMY1	Bta 3	Produção de gordura	Sueca Vermelha e Branca	Andersson-Eklund et al., 1990 Andersson-Eklund & Rendel, 1993
TGLA263	Bta 3	% gordura	Holstein (EUA)	Ron et al., 1996
Weaver	Bta 4	Produção de leite, Produção de gordura	Pardo Suíço	Medjugorai et al., 1997
ILSTS97	Bta 6	Produção de leite	Holstein Friesian (Alemanha)	Kuhn et al., 1996
CSN2	Bta 6	% gordura	Jersey, Friesian	McLean et al., 1984
ALB	Bta 6	Produção de leite 1 ^a lactação	Holstein, Pardo Suíço X Harima	Mandal & Dattagupta 1985
C3H3-TGLA37	Bta 6	Produção de leite, % gordura, % proteína	Holstein	Georges et al., 1995

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos na identificação de QTLs para características de produção de leite (continuação).

Marcador/ Gene	Cromos.	Característica		Referência
TGLA37	Bta 6	Produção de leite, produção de gordura, Produção de proteína	Holstein (Alemanha)	Kuhn et al., 1996
TGLA427- TGLA73	Bta 9	Produção de gordura Produção de proteína	Holstein (EUA)	Georges et al., 1995
TGLA111- TGLA378	Bta 10	Produção de gordura	Holstein (EUA)	Georges et al., 1995
LGB	Bta 11	% gordura, Sólidos totais, Produção de proteína	Jersey, Friesian	McLean et al., 1984
Grupo sang. J	Bta 11	Produção de leite, gordura corrigida, Produção de gordura, Produção de proteína	Sueca Vermelha e Branca	Andersson-Eklund et al., 1990
Grupo sang. B	Bta 12	Gordura corrigida	Sueca Vermelha e Branca	Andersson-Eklund et al., 1990
CSSM66	Bta 14	% gordura, % gordura	Holstein (EUA), Holstein (Israel)	Ron et al., 1996
GH	Bta 19	Produção de gordura	Red Dani & Norw	Hoj et al., 1993
GH	Bta 19	Produção de proteína Produção de leite Produção de gordura	Holstein Friesian	Lee et al., 1996
TGLA153- TGLA126	Bta 20	% proteína	Holstein Friesian	Georges et al., 1995
M Blood Group	Bta 23	% gordura	Sueca Vermelha e Branca	Andersson-Eklund et al., 1990
PRL	Bta 23	Produção de leite	Holstein	Cowan et al., 1990