

CPPSE  
AIM  
SEPARATAS

# Introdução à Análise de Marcadores Moleculares

PROCI-2001.00163

REG

2001

SP-2001.00163

Luciana Correia de Almeida Regitano



## Introdução

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco de atenção dos geneticistas passou a ser o gene, como unidade fundamental da variação biológica. Com o desenvolvimento da genética de populações, surge o conceito de utilização de genes individuais como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, como, por exemplo, o conteúdo de variabilidade, os padrões de migração, a seleção e a deriva genética. Além disso, a possibilidade de analisar a segregação de genes marcadores, para localizar e estimar o efeito de poligenes que controlam características de interesse para o melhoramento das espécies, fomentou ainda mais o estudo de marcadores.

Marcadores genéticos são características de herança mendeliana simples, que possibilitam a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, permitindo que a segregação do gene marcador seja acompanhada. A análise de segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador.

Inicialmente, as características disponíveis para esse tipo de análise eram as mutações que produziam alterações morfológicas, como o nanismo, a ausência de asas em *Drosophila* e a ausência de pêlos em camundongos. Entretanto, tais muta-

ções são pouco frequentes nas populações naturais, em que a maior parte da variação genética é de caráter contínuo (Tanksley, 1993). Além disso, macromutações, como as citadas acima, freqüentemente comprometem a adaptação do indivíduo, o que reduz sua utilidade em estudos de comparação entre populações.

As primeiras contribuições ao estudo de marcadores genéticos em animais foram as descobertas dos polimorfismos de antígenos eritrocitários (Stormont & Cumley, 1943). A análise de marcadores foi ampliada com o desenvolvimento de técnicas de eletroforese de proteínas, associadas a métodos de coloração histoquímica, que permitiram que a variação genética das proteínas passasse a ser estudada (Smithies, 1955). Esses marcadores têm sido intensamente utilizados para investigar a estrutura das populações, elucidando questões como fluxo gênico em populações naturais, dispersão e filogenia. Apesar disso, apenas parte da variação genética de uma espécie pode ser observada, aquela resultante de mutações que ocorrem em regiões codificadoras do genoma e causam alteração detectável do produto gênico.

Essa limitação foi superada com o desenvolvimento das técnicas de análise de DNA e o conseqüente desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares, que serão discutidos neste capítulo.

## Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

A caracterização do polimorfismo de DNA tornou-se possível com a descoberta das endonucleases de restrição da Classe II, capazes de cortar a molécula de DNA em sítios específicos, denominados sítios de restrição. O número de cortes efetuados por determinada enzima de restrição é função do número de sítios de restrição presentes ao longo da molécula de DNA. A ocorrência de variação individual no número e no tamanho dos fragmentos formados pela digestão do DNA com uma enzima de restrição foi demonstrada por Grodzicker et al. (1974), em adenovírus. Essa variação é o resultado de mutações de ponto, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinada enzima, podendo também resultar de eventos de inserção ou de deleção entre dois sítios de restrição adjacentes. Essa variação foi denominada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP, sigla derivada do termo inglês *restriction fragment length polymorphism*.

O método desenvolvido para adenovírus não produziu resultados satisfatórios em eucariotos superiores. Em virtude do tamanho do genoma dessas espécies, o número de fragmentos resultantes da digestão com enzimas de restrição é muito grande. Conseqüentemente, tentativas de separar esses fragmentos

por eletroforese em gel produziram um rastro ao invés de bandas discretas. A solução para esse problema surgiu com o desenvolvimento da técnica de *Southern blot* (Southern, 1975), na qual os fragmentos separados por eletroforese são transferidos para um suporte sólido, usualmente uma membrana de nitrocelulose ou náilon, imobilizados e desnaturados. Explorando a tendência da molécula de DNA de formar fitas duplas complementares, utiliza-se a seqüência de fita simples de DNA como sonda. A sonda é marcada com um isótopo radioativo, como o  $^{32}\text{P}$ , ou, mais recentemente, com moléculas antigênicas que são detectadas por anticorpos associados a enzimas que catalisam reações cromogênicas ou quimiluminescentes. Como resultado, apenas os fragmentos complementares à seqüência da sonda são revelados (Fig. 1).

As sondas utilizadas para a obtenção de marcadores RFLP podem ser originadas de regiões codificadoras ou não. O emprego de sonda de DNA complementar ao RNA mensageiro (cDNA) é o mais comum e apresenta a vantagem de não conter seqüências repetitivas. Sondas anônimas, obtidas a partir de fragmentos de DNA genômico ao acaso, possibilitam a rápida obtenção de novos marcadores, além de permitirem a análise de regiões não codificadoras do genoma. Porém, em virtude da abundância de DNA repetitivo no genoma dos eucariotos, quando o objetivo é a obtenção de



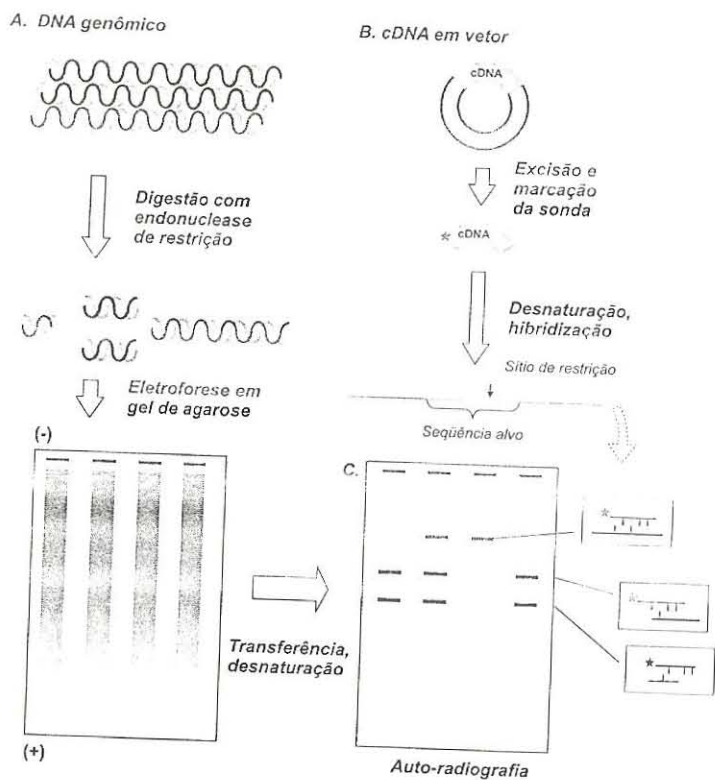


Fig. 1. Análise de RFLP pela técnica de *Southern blot*. A. Preparação do DNA a ser investigado: O DNA genômico é digerido com endonucleases de restrição e os fragmentos separados em função do tamanho por meio de eletroforese. Os fragmentos são transferidos para um suporte sólido e desnaturados por tratamento alcalino. B. Preparação da sonda: O DNA complementar, obtido por transcrição reversa de um RNA mensageiro, é clonado em um vetor, que permite sua multiplicação em bactérias. O cDNA é retirado do vetor por digestão com endonuclease de restrição, marcado com  $^{32}\text{P}$  e desnaturado. C. Hibridização e revelação dos fragmentos complementares à sonda.

marcadores unilocais, essas sondas devem ser submetidas a um processo de seleção, de forma a garantir que apenas aquelas que representam seqüências de cópia única sejam empregadas.

Um aspecto importante dos marcadores RFLP é a prevalência de

dialélismo. Muitos dos locos marcadores descritos são dialélicos, quer originados de mutações de ponto ou de mutações estruturais. Marcadores dialélicos são bastante limitados para o mapeamento genético, em função do número de cruzamentos informativos, que é função do número de

progenitores segregando para o marcador (heterozigotos) e do número de progênies nas quais podemos atribuir um dos alelos ao progenitor. Essa relação pode ser quantificada pelo valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC), definido por Botstein et al. (1980) como:

$$PIC = \left(1 - \sum_{i=1}^{n-1} p_i^2\right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Nessa equação, o primeiro membro corresponde à proporção de indivíduos heterozigotos na população, presupondo-se equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa proporção é também definida como diversidade gênica (Weir, 1996). Dessa diversidade se subtrai a proporção esperada de progênies não informativas, isto é, aquelas em que não é possível diferenciar o alelo paterno do materno. Um exemplo seria o acasalamento de dois indivíduos heterozigotos idênticos ( $A_1A_2 \times A_1A_2$ ): em aproximadamente metade de suas progênies, as progênies heterozigotas, o alelo  $A_1$  poderia ter origem tanto paterna quanto materna. O mesmo raciocínio seria válido para a análise da origem do alelo  $A_2$ .

Outras desvantagens dos marcadores RFLP são: presença de alelos raros, fazendo com que muitas populações apresentem padrão monomórfico, e grau de dificuldade técnica. Como foi mencionado, a técnica depende do desenvolvimento e da seleção de sondas a partir de bibliotecas genômicas ou de cDNA. Uma

vez identificadas as combinações de sonda e endonuclease de restrição que revelam polimorfismos, o processo de análise por *Southern blot* demora em torno de cinco dias, dependendo do sistema de detecção utilizado. Apesar dessas limitações, em 1990 mais de 120 locos haviam sido mapeados em bovinos (Kennedy et al., 1990).

### A técnica de PCR

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica foi desenvolvida por Mullis, em 1983 (Mullis, 1990), mas sua importância só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação da PCR em diagnóstico de doenças (Saiki et al., 1985).

A técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos, complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Esses oligonucleotídeos, denominados "iniciadores" ou *primers*, funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada *primer*. Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por



elevação da temperatura para 92°C a 95°C; anelamento dos *primers* por redução da temperatura até o ponto ideal para a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de *primer* e a fita molde; e extensão da síntese da nova fita de DNA. Uma vez que a replicação do DNA é semiconservativa, ou seja, a DNA polimerase uti-

liza um molde de fita simples de DNA para sintetizar uma fita complementar, sem o qual a adição de nucleotídeos é interrompida, as fitas recém-sintetizadas passam a funcionar como molde para o próximo ciclo. Ao final de vários ciclos obtém-se acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelos *primers* (Fig. 2).

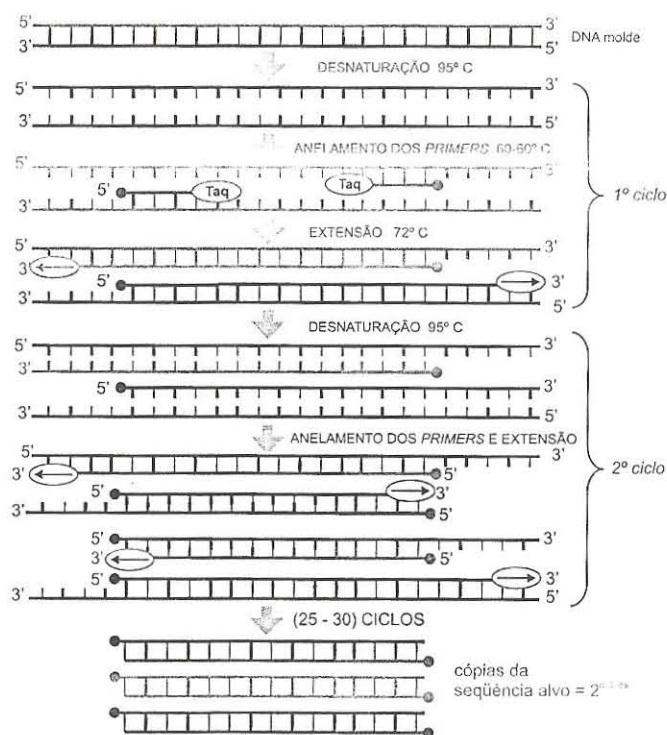


Fig. 2. Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A reação é iniciada com a desnaturação da molécula de DNA molde pelo aquecimento a 95°C. A redução da temperatura para 50-60°C permite o estabelecimento de pontes de hidrogênio entre os *primers* e as fitas de DNA molde (fase de anelamento). A enzima *Taq* DNA polimerase inicia a adição de nucleotídeos complementares à fita molde a partir das extremidades 3' dos *primers*. Essa síntese ocorre entre 70°C e 80°C (fase de extensão). Os ciclos de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão da síntese se repetem por 25 a 30 vezes, resultando no acúmulo de cópias da sequência de DNA delimitada pelos *primers* (sequência alvo) proporcional ao número de ciclos.

A extensão da síntese da nova fita de DNA era originalmente catalisada pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I que, por ser inativada à temperatura de desnaturação do DNA, exigia adição de enzima a cada novo ciclo de PCR.

A utilização de uma DNA polimerase isolada da bactéria *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase), capaz de catalisar a síntese de DNA na faixa de temperatura de 70°C a 80°C e de se manter estável entre 94°C e 95°C, permitiu a automação da técnica de PCR (Gelfand, 1989).

Uma das etapas fundamentais da técnica é o desenvolvimento de um par de *primers* adequado para a região que se pretende amplificar. Essa etapa requer conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos, pelo menos das extremidades do gene ou do segmento de DNA a ser amplificado. Esse pré-requisito vem se tornando menos restritivo com o desenvolvimento de métodos automatizados de sequenciamento e com o crescente desenvolvimento de programas de sequenciamento do genoma de diversas espécies. Em virtude da conservação evolutiva dos genomas, quando a informação não é disponível para a espécie foco do trabalho, é possível utilizar informações de espécies relacionadas, optando-se pelo desenvolvimento de *primers* para as sequências de nucleotídeos mais conservados entre duas ou mais espécies.

Em geral, cada *primer* contém de 20 a 30 nucleotídeos. Não deve con-

ter estruturas secundárias complexas, principalmente na extremidade 3', a partir da qual se dá a extensão da fita complementar. A complementaridade entre os dois *primers* também deve ser evitada, pois resulta na formação de dímeros que reduzem o rendimento da PCR (Saiki, 1989).

A temperatura de anelamento depende do tamanho e da sequência dos oligonucleotídeos utilizados. Como regra geral, *primers* mais longos e com maior conteúdo de guanina (G) e citosina (C) apresentam anelamento mais estável. O ideal é utilizar *primers* com conteúdo GC semelhante ao da sequência a ser amplificada, com distribuição homogênea de purinas e pirimidinas, evitando a presença de *stretches* (repetições sucessivas) de polipurinas ou polipirimidinas, cujas estruturas secundárias podem comprometer grandemente o resultado. O delineamento de *primers* é, portanto, um procedimento complexo e, dada sua importância para o sucesso da técnica, recomenda-se a utilização de softwares adequados. Alguns programas disponíveis são o OLIGO™ Versão 4.1 (National Biosciences, Inc.) e o *Primer Designer* Versão 2.0 (Scientific & Education Software).

Outras variáveis críticas da reação são a concentração de  $Mg^{2+}$ , desoxinucleotídeos (dNTP) e de DNA molde. Como regra geral, o excesso de  $Mg^{2+}$  resulta em acúmulo de produtos de amplificação inespecíficos e sua falta na redução do rendimento



da PCR. Essa concentração é dependente da concentração dos desoxinucleotídeos (dNTP), uma vez que esses se ligam ao  $Mg^{2+}$ , tornando-o indisponível no meio. Concentrações de 1,5 mM de  $MgCl_2$  são geralmente adequadas em presença de 200  $\mu M$  de cada dNTP (Saiki, 1989), mas podem ser manipuladas de acordo com a necessidade. A concentração de cada um dos dNTPs pode variar de 50 a 200  $\mu M$ , acima disso a incorporação errônea de nucleotídeos é favorecida. A quantidade de DNA molde depende do tamanho do genoma e da finalidade do ensaio. Rotineiramente, utilizam-se 100 ng de DNA, suficientes para conter de  $10^2$  a  $10^5$  cópias do genoma dos mamíferos, mas é possível obter amplificação a partir do DNA contido em uma única célula. Quando a quantidade de DNA molde disponível é muito pequena, como, por exemplo, na análise de biópsias de embriões ou de espermatozoides individuais, é possível utilizar *primers aninhados*, ou seja, em um primeiro ciclo de PCR amplifica-se um segmento maior e esse produto é submetido a um segundo ciclo com um par de *primers* internos à seqüência amplificada. Esse processo aumenta a capacidade de visualização dos produtos de amplificação, dispensando a posterior detecção por *Southern blot*.

O impacto da técnica de PCR na análise de marcadores de DNA deve-se principalmente à sua simplicidade e sensibilidade. O princípio de

amplificação de DNA *in vitro* tem sido utilizado para o desenvolvimento de técnicas de seqüenciamento e clonagem e para o desenvolvimento de novos tipos de marcadores, como os RAPDs (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso), AFLPs (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados) e microsatélites. Além disso, muitos dos polimorfismos de restrição descritos pelo método de Southern têm sido transformados em marcadores baseados em PCR específica.

Para a análise de RFLP utilizando PCR, as extremidades da sonda que revelou o polimorfismo são seqüenciadas, e as informações são utilizadas para a síntese de *primers* complementares (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Quando a posição do sítio polimórfico é conhecida, por exemplo, dentro de um gene bem caracterizado, os *primers* podem ser desenvolvidos a partir de seqüências publicadas ou catalogadas em bases de dados, como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região que contém os sítios polimórficos de restrição é amplificada e os fragmentos produzidos pela digestão dos produtos de amplificação podem ser então analisados em géis de agarose. O PCR-RFLP tem sido aplicado no diagnóstico de doenças hereditárias em animais, como discutido no capítulo 1.

### **Microsatélites**

Os genomas dos eucariotos abrigam grande quantidade de DNA

repetitivo, classificado de acordo com o número de nucleotídeos e a complexidade da seqüência que compõe as repetições. As diferentes classes são também caracterizadas por comportamento típico quanto à distribuição no genoma e quanto ao mecanismo envolvido em suas origens (Jobse et al., 1995).

A variabilidade de seqüências repetitivas foi demonstrada por Bell et al. (1982), e posteriormente utilizada para a produção de perfis característicos de cada indivíduo pela técnica de *DNA fingerprinting* (Jeffreys et al., 1985). Essa técnica é de grande utilidade na identificação de indivíduos ou linhagens e em testes de paternidade. Entretanto, a aplicação em estudos de população pode ser dificultada pela elevada variação intrapopulacional, não sendo possível estabelecer um perfil característico de uma população, principalmente naquelas que possuem uma base genética ampla. Além disso, sua natureza multilocal não permite admitir, sem detalhada análise de segregação, que fragmentos de mesma taxa de migração sejam alelos idênticos de um mesmo loco (Bruford et al., 1992).

Avanço importante na obtenção de marcadores hipervariáveis unilocais veio da utilização de uma classe de DNA repetitivo, as seqüências microsatélites ou SSR (simple sequence repeats). Os microsatélites são caracterizados por repetições em tandem de um mono, di, tri ou tetranucleotídeo, localizadas den-

tro de regiões de seqüência única. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada loco é provavelmente resultante de erros no deslocamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA.

Os microsatélites poli(G) e poli(A) são os mais simples, enquanto que poli(GT) são os mais frequentes, aparecendo em aproximadamente 5 a  $10 \times 10^4$  locos individuais no genoma dos mamíferos (Soller, 1990). Muitos outros microsatélites foram identificados até o momento e é possível que qualquer seqüência de poucos nucleotídeos possa representar um microsatélite no genoma de eucariotos.

Os microsatélites podem ser amplificados de maneira específica pela técnica de PCR, utilizando *primers* que contém parte da seqüência flanqueadora. A amplificação resulta em produtos de diferentes tamanhos, em função do número de cópias da seqüência repetitiva delimitada pelos *primers*. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos locos microsatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente. Há necessidade, portanto, de separar os produtos de PCR por eletroforese em gel de



poliacrilamida de alta definição (Fig. 3). A identificação dos produtos pode se valer de três estratégias: a) utilização de um dos *primers* marcados com isótopo radioativo. Essa marcação pode ser feita pela adição de [ $\gamma^{32}$ P]ATP catalisada pela enzima T4 polinucleotideoquinase; b) marcação de um dos *primers* com fluoresceína e leitura em seqüenciador automático; e c) coloração do gel por impregnação com prata.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites pode ser feito pela análise de seqüências contidas em bancos de dados, localizando-se aquelas que contêm SSRs e delineando-se *primers* para a região que

flanqueia a repetição. Essa estratégia é limitada pela quantidade de informações catalogadas nos bancos de dados. Outra estratégia bastante empregada é a seleção de fragmentos contidos em uma biblioteca genômica. A seleção dos clones que contêm microssatélites é realizada pela hibridação das colônias que constituem a biblioteca com um oligonucleotídeo sintético marcado, composto pela repetição que se procura, por exemplo (dG-dT)<sub>15</sub> ou (dA-dA-dT)<sub>10</sub>, para localizar as repetições de dinucleotídeos CA ou de trinucleotídeo TTA, respectivamente. Os clones positivos, isto é, aqueles que ficaram marcados após a hibridização, são isolados e seqüenciados para o

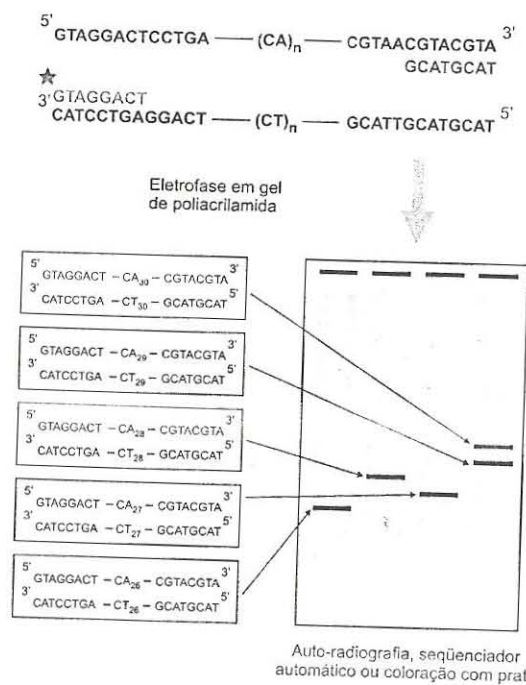


Fig. 3. Esquema da análise de marcadores microssatélites utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A. Detalhe da seqüência a ser amplificada. Os *primers* são indicados em vermelho, sendo o da esquerda marcado. B. Resultados após corrida em gel de poliacrilamida de alta resolução. A interpretação do padrão de bandas é apresentada à esquerda da figura.

desenvolvimento de *primers* complementares às seqüências flanqueadoras do SSR.

Uma vez que os oligonucleotídeos utilizados são complementares à seqüências de cópia única, obtêm-se marcadores unilocais, altamente polimórficos e de herança codominante. Esses atributos são de grande valor para a construção de mapas

genéticos. Na Tabela 1, apresentam-se alguns exemplos de valores estimados para os parâmetros conteúdo de informação polifórmica (PIC), probabilidade de exclusão de paternidade (PE), heterozigidade (H) e diversidade gênica (D) para marcadores microssatélites e RFLP em algumas populações de bovinos.

Tabela 1. Valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão (PE), heterozigidade (H) e diversidade gênica (D) para alguns marcadores em populações brasileiras de raças bovinas.

Marcadores		Canchim <sup>(1)</sup> (N=41)	Nelore <sup>(2)</sup> (N=180)	Nelore <sup>(3)</sup> (N=63)	Charolês <sup>(1)</sup> (N=36)	
RFLP	GH- <i>AluI</i>	PIC	0,371	0,000	0,000	0,313
		PE	0,151	0,000	0,000	0,175
		H	0,122	0,000	0,000	0,417
		D	0,329	0,000	0,000	0,389
	CSN3- <i>HinfI</i>	PIC	0,344	0,101	0,147	0,375
		PE	0,196	0,051	0,073	0,219
		H	0,463	0,111	0,175	0,528
		D	0,442	0,105	0,160	0,500
	LGB- <i>HaeIII</i>	PIC	0,365	0,298	0,366	0,373
		PE	0,211	0,165	0,176	0,217
H		0,463	0,244	0,397	0,583	
D		0,481	0,365	0,481	0,497	
MICROSSATÉLITE	CSFM50	PIC	0,712	0,640	0,696	0,596
		PE	0,475	0,466	0,508	0,437
		H	0,780	0,669	0,810	0,667
		D	0,734	0,661	0,642	0,647
TEXAN15	PIC	-	0,554	-	-	
	PE	-	0,389	-	-	
	H	-	0,577	-	-	
	D	-	0,589	-	-	
BM1224	PIC	0,878	0,685	0,642	0,730	
	PE	0,529	0,521	0,441	0,580	
	H	0,732	0,311	0,508	0,639	
	D	0,734	0,729	0,688	0,757	

<sup>(1)</sup>Regitano, 1997; <sup>(2)</sup>Tambasco et al., 2000; <sup>(3)</sup>Rosa, 1997.



Distorções da segregação podem surgir em decorrência da "expansão" ou "contração" do microssatélite durante a meiose. A frequência desses eventos é da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  por loco, por gameta (Holmes, 1994). Entretanto, em presença de alterações do sistema de reparo, a taxa de mutação pode aumentar de cem a mil vezes. A instabilidade resultante tem sido associada ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Simpson, 1996) e de doenças hereditárias, como a síndrome do cromossomo X-frágil.

Considerando a frequência dessas seqüências e o tamanho médio do genoma de mamífero de  $3 \times 10^9$  pares de nucleotídeos, seria possível construir mapas genéticos dessas espécies com aproximadamente 10 mil locos microssatélites (Soller, 1990). Em bovinos, os mapas genéticos compostos por uma combinação de marcadores RFLP e locos microssatélite fornecem cobertura de aproximadamente 90% do genoma (Bishop et al., 1994; Barendse et al., 1994, 1997).

### Polimorfismos de um nucleotídeo (SNPs)

Os recentes avanços dos sistemas de seqüenciamento automatizado de ácidos nucléicos têm permitido que as seqüências que constituem os cromossomos em diferentes indivíduos sejam comparadas. Dessa forma, variações individuais, resultantes de mutações de ponto,

podem ser identificadas. Essas mutações podem ser substituições, deleções e adições de nucleotídeos que, uma vez caracterizadas, constituem os marcadores SNPs, sigla derivada do termo inglês *Single nucleotide polymorphisms*.

Os SNPs são marcadores atraentes para a análise genética por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma ou seqüência de interesse, como por exemplo, em exons de genes candidatos, podendo ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente. Outras características importantes são a maior estabilidade, quando comparados aos marcadores microssatélites, além da possibilidade de automação. Essa última é uma vantagem considerável em situações que exigem a análise de um grande número de indivíduos e de marcadores, como quando se utiliza marcadores aleatórios para *scans* completos de genomas para localização de QTLs.

Porém, a maioria dos marcadores SNPs são dialélicos, resultando, como discutido anteriormente, em pouca informação por loco. Do ponto de vista de mapeamento, cinco marcadores SNPs fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco microssatélite, de tal forma que os mapas de SNPs devem ter uma densidade maior do que os de microssatélites (Beuzen et al., 2000).

### Considerações finais

Marcadores genéticos são instrumentos importantes para os estudos de populações e para a compreensão dos mecanismos de herança. O desenvolvimento de metodologias de análise molecular tem permitido a análise do genoma e das variações existentes tanto em regiões que codificam produtos gênicos quanto naquelas cuja função permanece desconhecida, permitindo a rápida obtenção de mapas genéticos saturados para as mais diversas espécies, como foi discutido no capítulo 1.

Entre as contribuições metodológicas, a utilização da PCR para a análise desses marcadores representa importante redução no tempo despendido para a identificação dos genótipos, além de permitir a identificação do genótipo a partir de quantidades mínimas de material, como, por exemplo, biópsias de embriões e evidências forenses.

Recentes progressos têm sido alcançados em decorrência do grande estímulo ao programa Genoma Humano, cujo objetivo é mapear e seqüenciar todos os genes da espécie. O mapeamento comparativo deverá resultar em avanços significativos também em outras espécies de mamíferos, uma vez que a conservação de padrões cariotípicos, de seqüências codificadoras e da ordem de genes nos cromossomos têm sido descritas em muitas espécies (Womack & Moll, 1986).

### Referências bibliográficas

- 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*, v.6, p.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.; ALEYASIN, S.A.; BAND, M.; BISHOP, M.D.; BURKAMP, J.; BURTEL, K.; COLLINS, F.; COOPER, L.; COPETTIERS, W.; DENYS, B.; DRINKWATER, R.D.; EASTERDAY, K.; ELDUQUE, C.; ENNIS, S.; ERHARDT, G.; FERRETTI, L.; FLAVIN, N.; GAO, Q.; GEORGES, M.; GURUNG, R.; HARZILIUS, B.; HAWKINS, G.; HETZEL, J.; HIRANO, T.; HULME, D.; JORGENSEN, C.; KESSLER, M.; KIRKPATRICK, B.W.; KONFORTOV, B.; KOSTIA, S.; KUHN, C.; LENSTRA, J.A.; LEVEZIEL, H.; LEWIN, H.A.; LEYHE, B.; LIL, L.; BURRIEL, I.M.; MCGRAW, R.A.; MILLER, J.R.; MOODY, D.E.; MOORE, S.S.; NAKANE, S.; NIJMAN, I.J.; OLSAKER, I.; POMP, D.; RANDO, A.; RON, M.; SHALOM, A.; TEALE, A.J.; THIEVEN, U.; URQUHART, B.G.D.; VAGE, D.I.; WEGHE, A. van de; 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*, v.8, p.21-28, 1997.
- BELL, G.I.; SELBY, M.J.; RUTTER, W.J. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating units. *Nature*, v.295, p.31, 1982.
- BEUZEN, N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, v.160, p.42-52, 2000.



- 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*, v.136, p.619-639, 1994.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.
- BRUFORD, M.W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y.; BURKE, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOEZEL, A.R., ed. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1992. c.8, p.225-269.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220p.
- GELFAND, D.H. Taq DNA Polymerase. In: ERLICH, H.A., ed. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. UK: Macmillan Publishers, 1989. p.17-22.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, v.39, p.439-446, 1974.
- HOLMES, N.G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. *British Veterinary Journal*, v.150, p.411-421, 1994.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, v.316, p.76, 1985.
- JOBSE, C.; BUNTJER, J.B.; HAAGSMA, N.; BREUKELMAN, H.J.; BEINTEMA, J.J.; LENSTRA, J.A. Evolution and recombination of bovine DNA repeats. *Journal of Molecular Evolutions*, v.41, p.277-283, 1995.
- KENNEDY, B.W.; GIBBINS, A.M.V.; GIBSON, J.P.; SMITH, C. Coalescence of molecular and quantitative genetics for livestock improvement. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.2619-2627, 1990.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, v.262, p.36-42, 1990.
- REGITANO, L.C.A. Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim. Piracicaba, SP: ESALQ, 1997. 132p. Tese Doutorado.
- ROSA, A.J.M. Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares. Piracicaba, SP: ESALQ, 1997. 114p. Dissertação Mestrado.
- SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H.A., ed. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. UK: Macmillan Publishers, 1989. p.7-16.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SIMPSON, A.J.G. Mini review: microsatellite instability in human cancer. *Brazilian Journal of Genetics*, v.19, p.171-174, 1996.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, v.61, p.629-641, 1955.
- SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.2628-2646, 1990.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, London, v.98, p.503-517, 1975.
- STORMONT, C.; CUMLEY, R.W. Cellular antigens in cattle blood. *Journal Heredity*, v.34, p.35-41, 1943.
- TAMBASCO, D.D.; ALENCAR, M.M.; COUTINHO, L.L.; TAMBASCO, A.J.; TAMBASCO, M.D.; REGITANO, L.C.A. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microsatélites e genes candidatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, p.1044-1049, 2000.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, v.27, p.205-233, 1993.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17, p.6463-6471, 1989.
- WEIR, B.S. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WOMACK, J.E.; MOLL, Y.D. Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. *The Journal of Heredity*, v.77, p.2-7, 1986.