

MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EM ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LEITE

Luciana Correia de Almeida Regitano¹

1. Introdução

Progressos excepcionais foram experimentados no campo da genética molecular nos últimos anos. 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 de referência 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 à intervalos médios inferiores a 2,5 centimorgans 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 visualizar a futura identificação e clonagem dos ETLs em si. Além disso, a aplicação de marcadores moleculares no diagnóstico de doenças hereditárias, na identificação individual 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 uma linhagem de 1957 sob a mesma dieta e à mesma idade (Hay, 1995). A taxa de crescimento da produção anual de leite por vaca tem aumentado nos últimos anos na América do Norte. Os valores de diferença esperada na progênie (DEP), de fêmeas nascidas em 1986 foram aproximadamente 135 kg superiores aos das fêmeas nascidas em 1985 (Wiggans, 1991).

¹ Pesquisadora em Genética Molecular e Biotecnologia. Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP. Endereço Eletrônico: luciana@cnpse.embrapa.br

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 (MacLennan & Phillips, 1992) e o gene de fertilidade (*Fec*) dos ovinos (Lanneau et al., 1994). Essa situação, entre tanto, pode ser considerada com exceção uma vez que a maioria dos caracteres quantitativos de ve 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 (Geidemann, 1975). O sucesso dessa estratégia depende primariamente da construção de mapas de ligação de alta resolução, 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 exibem 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 reatados. 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. QTLs para produção total de gordura e de proteína nos cromossomos 1 e 6 foram também identificados por Nadesalingam et al. (2001).

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 *Taq* no gene do hormônio de crescimento foi associado às 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 filhote 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 filhote por leitegada (Short et al, 1997).

3. Detecção 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, Osborn da Ivanhoe. Com 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 contém 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 na proteína correspondente. A mutação pode ser detectada pela digestão de DNA amplificado com diferentes enzimas de restrição. A digestão com a enzima **Taq I** 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 **Taq I**. 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 penetração completa.

O interesse pelo estudo desse gene foi despertado pelo aumento da frequência da mutação em rebanhos melhorados, que poderia ser resultado de uma vantagem seletiva dos indivíduos portadores da mutação. Essa teoria foi reforçada por Hoesche & 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, com o consequência da seleção para produção, o aumento na frequência do gene coloque em risco a sobrevivência da raça.

Um marcador de DNA microsatélite foi mapeado muito próximo ao gene responsável pela doença (Georges et al, 1993). Esse marcador de verã permitir a identificação de indivíduos portadores, sem a necessidade de teste de progênie. Além disso, esse marcador de verã 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 Citruinemia também já podem ser diagnosticadas pela análise do DNA. Uma revisão de tãlada sobre esse assunto é encontrada em Buikamp & Eppstein (1996).

4. Considerações Finais

Os primeiros esforços no sentido de identificar genes que controãm características de interesse econômico em animais foram imitados 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. Sãlento 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. Entre tanto, sua utilização em programas de melhoramento dependerã ainda de uma sãrie de fatores, entre os quais a viabilidade econômica.

A identificação dos genes responsáveis pela variaãõ atribuãda ao QTL é um dos passos mais importantes, uma vez que, trabalhando-se diretamente com a variaãõ no gene causaã não dependemos da fase de lgaãõ entre o marcador e o QTL. Resultados dessa natureza estãõ comeãando a ser alcanãados. Bott et al (2003) descreveram a identificação de uma mutaãõ no gene do receptor do hormônio de crescimento, que explicava grande parte da variaãõ genética atribuãda à um QTL no cromossomo 20.

Os conhecimentos acumulãdos na área da genética molecular vem-se em grande parte ao desenvolvimento científico corrente dos projetos de mapeamento do genoma humano. A utilização dessas informações por meio de mapeamento comparativo e homologia de seqüências têm contribuãdo, e de verã ser fundamental para o futuro desenvolvimento dos projetos na área animal.

5. Referências Bibliográficas

ANDERSSON-EKLUND, L. D. 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**, v.21, p.361-76, 1990.

ANDERSSON-EKLUND, L. D. B.; RENDEL, J. Linkage between amylose-1 locus and a major gene for milk fat content in cattle. **Animal Genetics**, v.24, p.101-3, 1993.

ASHTON, G. C. β -globin polymorphism and economic factors in dairy cattle. **J. Agric. Sci.**, v.54, p. 321-328, 1960.

BARENDSE, W.; ARMSTRONG, M.; KOSSAREK, L. M.; SHALOM, A.; KIRKPATRICK, B. W.; RYAN, A. M.; CLAYTON, D. 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.; VAMAN, D.; KEMP, S. J.; SUGIMOTO, Y.; ARMSTRONG, J. L.; WILLIAMS, J. L.; SUN, H. S.; EGGEN, A.; AGABA, M.; ALEYASIN, S. A.; BAND, M.; BISHOP, M. D.; BUITKAMP, J.; BYRNE, K.; COLLINS, F.; COOPER, L.; COPPETERS, W.; DENYS, B.; DRINKWATER, R. D.; EASTERDAY, K.; ELDUQUE, C.; ENNIS, S.; ERHARDT, G.; FERRETTI, L.; FLAVIN, N.; GAO, Q.; GEORGES, M.; GURUNG, R.; HARZILUS, 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.; LEVEZEL, H.; LEWIN, H. A.; LEYHE, B.; LILL, L.; BURRILL, 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.; THEVEN, U.; URQUHART, B. G. D.; VAGE, D. I.; VAN DE WEGHE, A.; VARVO, S.; VELMALA, R.; VILKKI, J.; WEKARD, 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.

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.

BLOTT, S.; KIM, J.; MOISD, S.; SCHMIDT-KUHNITZEL, A. Molecular Dissection of a Quantitative Trait Locus: A Phenylalanine-to-Tyrosine Substitution in the Transmembrane Domain of the Bovine Growth Hormone Receptor is Associated With a Major Effect on Milk Yield and Composition. **Genetics**, v.163, p. 253-266, 2003.

BUITKAMP, J. ; EPPLEN, J. T. Modern diagnostic research and DNA diagnostics in domestic animals in the light of classical breeding. **Electrophoresis**, v.17, p.1-11, 1996.

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. **Journal of Dairy Science** v.79, p.1446-53, 1996.

GEIDERMAN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v.46, p.319-330, 1975.

GEORGES, M. ;NIELSEN, D. ;MACKINNON, M. ;MISHRA, A. ;OKMOTO, R. ;PASQUINO, A. T. ;SARGEANT, L. S. ;SORENSEN, A. ;STEELE, M. R. ;ZHAO, X. ;WOMACK, J. E. ;HOESCHLE, L. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, v.139, p. 907-920, 1995.

HALLEY, C. S. Livestock QTLs – bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, v.11, p. 488-492, 1995.

HOESCHLE, L. ;MEINERT, T. R. Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.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**, v.7, n.3, p.235-49, 1997.

LANNEUC, R. D. ;DRINKWATER, R. D. ;ELSEN, J. M. ;HETZEL, D. J. S. ;NGUYEN, T. C. ;PIPER, L. R. ;THOMONIER, J. Genetic markers for the Booroola fecundity (Fec) gene in sheep. **Mammalian Genome**, v.5, p. 26-33, 1994.

LEE, B. K. ;LIN, G. F. ;CROOKER, B. A. ;MURTAUGH, M. P. ;HANSEN, L. B. ;CHESTER-JONES, H. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. **Domest Anim Endocrinol** v.13, p.373-81, 1996.

MACENNAN, D. H. ;PHILLIPS, M. S. Malignant hyperthermia. **Science**, v.8, p.789-94, 1992.

MCLEAN, D. M. ;GRAHAM, E. R. ;PONZONI, R. W. ;MCKENZIE, H. A Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **Journal Dairy Research**, v.51, n.4, p.531-46, 1984.

MASSEY, J. M. ;GEORGES, M. Genmark's approach to marker-assisted selection. **Animal Biotechnology**, v.3, p. 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 the Hereford cattle. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Quebec, Canada. **Proceedings...** Quebec: Organizing Committee, 1994. v.21, p. 221-224.

NADESLINGAM, J. ;PLANTE, Y. ;GIBSON, J. P. Detection of QTL for milk production on Chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. **Mammalian Genome**, v.12, p. 27-31, 2001.

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**, v.43, p.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**, v.25, p. 259-264, 1994.

SHORT, T. H. ; ROTHCHILD, M. F. ;SOUTHWOOD, O. I. ;MCCLAREN, D. G. ;DEVRES, 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**, v.75, p.3138-42, 1997.

SHUSTER, D. E. ;KEHLI Jr., M. E. ;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**, v.89, p.9225-9, 1992.

TAYLOR, J. F. ;COUTINHO, L. L. ;HERRING, K. L. ;GALLAGHER Jr., D. S. ; 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 GH 1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v.29, n.3, p.194-201, 1998.

THODAY, J. M. Location of polygenes. **Nature**, v.191, p.368-370, 1961.

WELLER, J. I. ;KASHI, Y. ;SOELLER, M. Power of "daughter" and "granddaughter" designs for genetic mapping of quantitative traits in dairy cattle using genetic markers. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2525-2537, 1990.

WIGGANS, G. R. National genetic improvement programs for dairy cattle in the United States. **Journal of Animal Science**, v.69, n.9, p.3853-60, 1991.