

Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal

Luciana Correia de Almeida Regitano

Marcador genético

- Característica hereditária
- Padrão fenotípico individual pode ser experimentalmente determinado;
- Permite acompanhar a segregação do loco responsável pelo caráter;
- Polimórfico

Aplicações

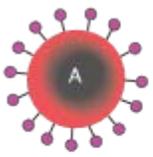
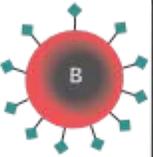
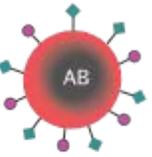
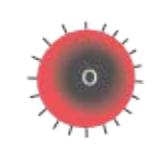
- Inferir sobre o comportamento dos genes em populações
- Construção de mapas do genoma
- Associar regiões do genoma com características fenotípicas quantitativas ou qualitativas

Marcadores morfológicos



- **Número limitado**
- **Muitos são deletérios**

Antígenos de superfície celular e proteínas

| | Group A | Group B | Group AB | Group O |
|---------------------|---|---|---|--|
| Red blood cell type |  |  |  |  |
| Antibodies present |  Anti-B |  Anti-A | None |  Anti-A and Anti-B |
| Antigens present | A antigen | B antigen | A and B antigens | No antigens |



Quantidade razoável de informação

Restrita à parte expressa do genoma (~ 1%)

Marcador molecular

- Variações na seqüência de um determinado segmento (loco) de DNA
- Não necessariamente corresponde à um gene

Tipos de variações no genoma

Poucas alteram o fenótipo!



substituição

ATAACGCGCAAT CACACACACACTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTTAGTGTGTGTGTGACTGACTTAATACATCGACCT

ATAACGCGCAA TCCTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTTAGGACTGACTTAATACATCGACCT

In/Del

VNTR

ATAACGTGCAAT CACACACACACACACTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCACGTTAGTGTGTGTGTGTGTGACTGACTTAATACATCGACCT

ATAACGCGCAACTCCTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTTGAGGACTGACTTAATACATCGACCT

Vários tipos de marcadores moleculares

- RFLP, RAPD, AFLP, minissatélites, microsatélites, SSCP, SNPs

Algumas mutações alteram sítios de restrição



EcoRI



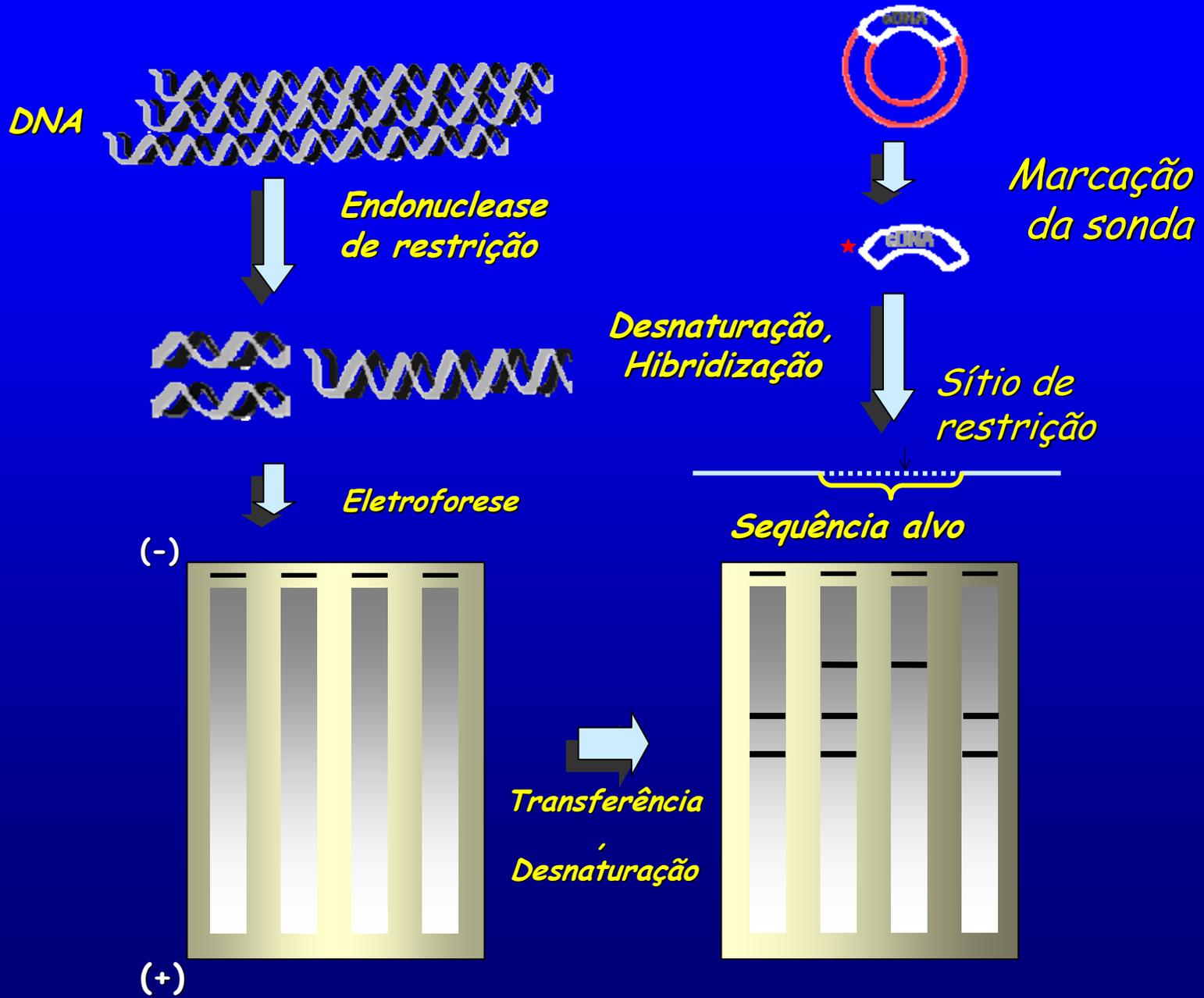
ATAACGCGCAATCACACACACACTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTTAGTGTGTGTGTGACTGACTTAAATACATCGACCT

ATAACGCGCAA.TCCTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTT.AGGACTGACTTAAATACATCGACCT

~~ATAACGTGCAATCACACACACACACTGACTGATTTATGTAGCTGGA
TATTGCACGTTAGTGTGTGTGTGTGTGACTGACTAAATACATCGACCT~~

ATAACGCGCAACTCCTGACTGAATTATGTAGCTGGA
TATTGCGCGTTGAGGACTGACTTAAATACATCGACCT

RFLP



PCR (Saiki et al, 1985)

```
GTCATAGCATTATTATTATTATT CAGGACTA
                                GTCCTGAT
```

Lower Primer

Upper Primer

```
GTCATAGC
CAGTATCGTAATAATAATAATAAGTCCTGAT
```

The primers can then anneal to their complementary sequences

```
GTCATAGCATTATTATTATTATT CAGGACTA
                                TAATAATAATAATAAGTCCTGAT
```

```
GTCATAGCATTATTATTATTATT
CAGTATCGTAATAATAATAATAAGTCCTGAT
```

Extension of the primers using *Taq* polymerase amplifies the target sequence

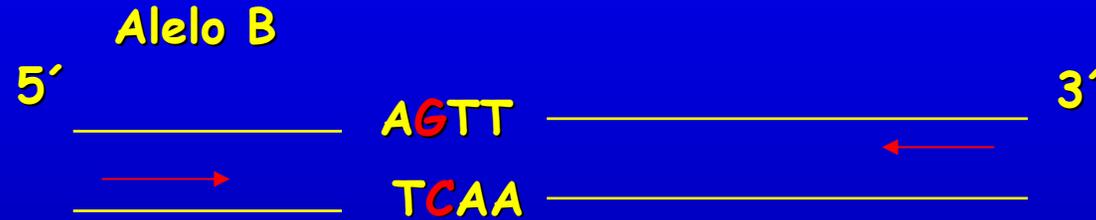
```
ATGATGCGTAAATAATAATAAGTCCTGAT
GTCATAGCATTATTATTATTATT CAGGACTA
```

Several million copies of DNA can be made in just a few hours

Pronta visualização do DNA
Inúmeras aplicações



PCR-RFLP



Endonuclease de Restrição
Separação eletroforética
Visualização

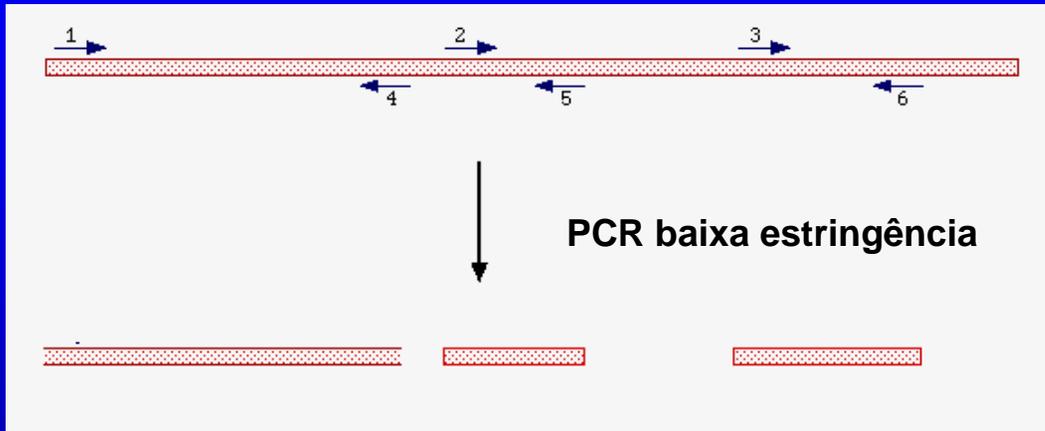
Codominante

Poucos alelos (2 a 3)



RAPD - Random amplified polymorphic DNA

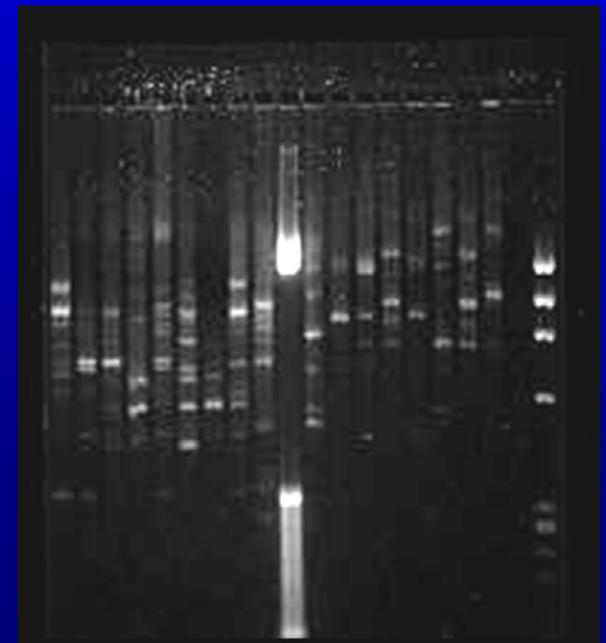
Primers aleatórios 10 mer



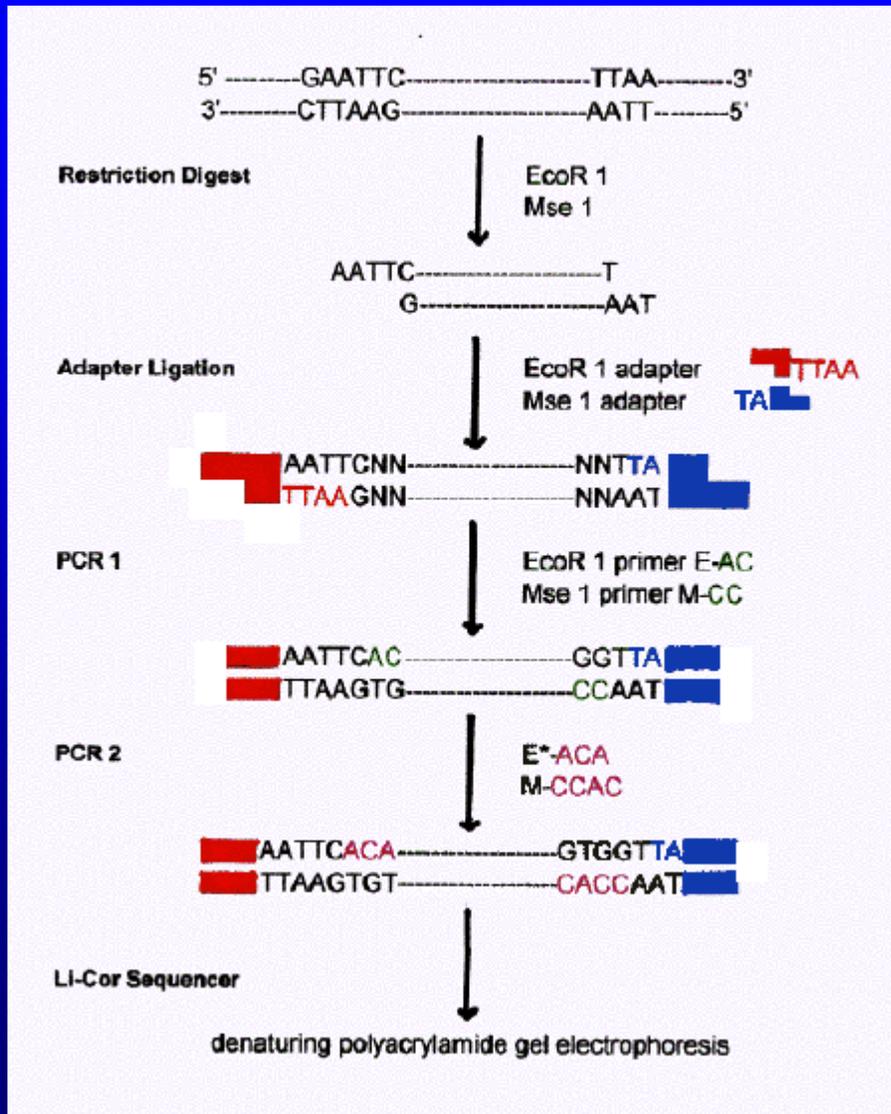
Dispensa conhecimento da seqüência

Dominante

Reprodutibilidade ruim



AFLP - Amplified fragment length polymorphism



Dipensa conhecimento da seqüência

Dominante

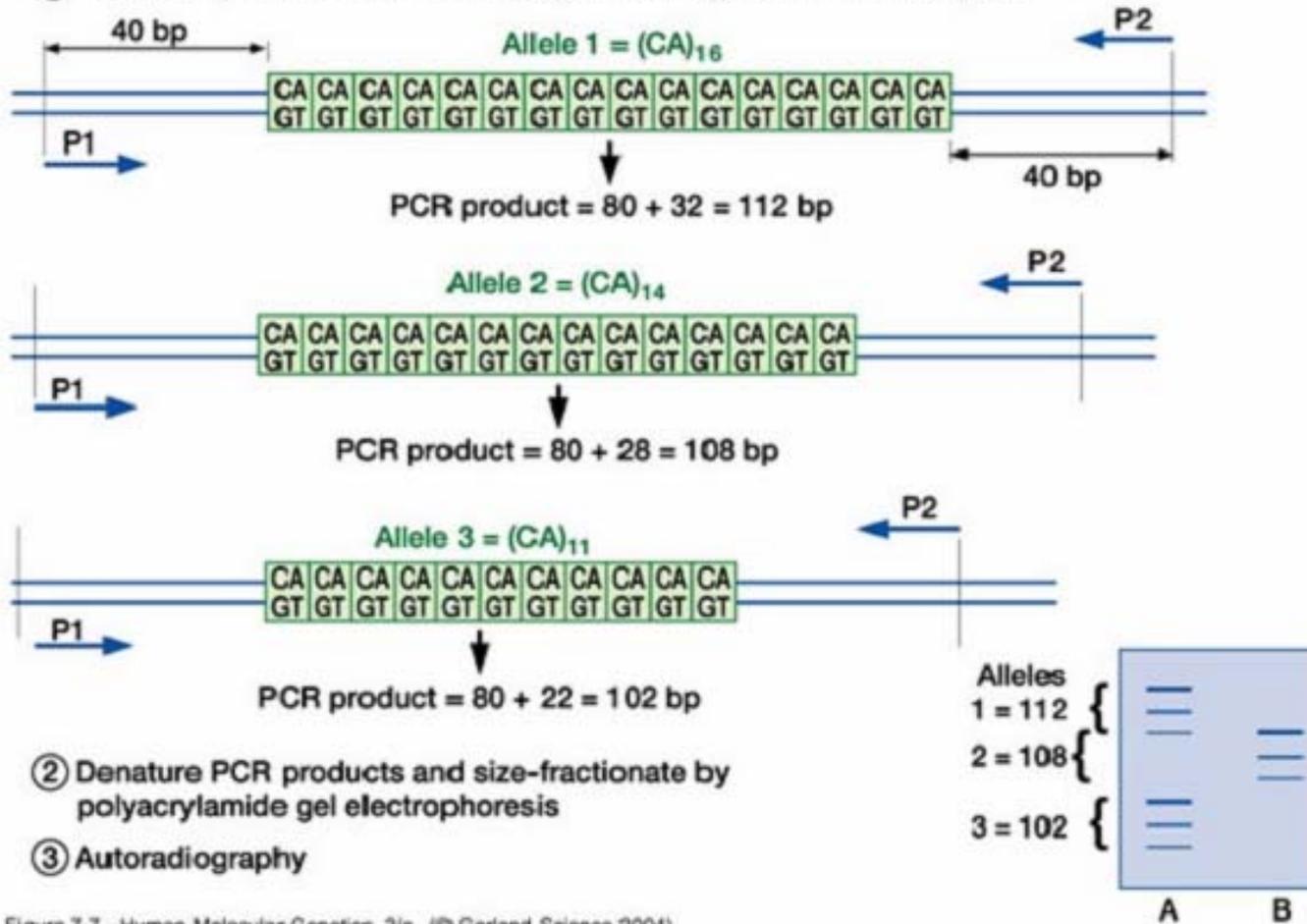
Reprodutibilidade boa

Microsatélites (SSR, VNTR)

- Repetições de 1 a 5 nucleotídeos
- Abundantes (mamíferos $\sim 10^5 CA_n$)
- Definidos por seqüências de cópia única
- Freqüentes nas proximidades de seqüências codificadoras

Microsatellites

① Use PCR primers P1, P2 to amplify alleles in genomic DNA samples



② Denature PCR products and size-fractionate by polyacrylamide gel electrophoresis

③ Autoradiography

Figure 7-7 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

Características

- Polialélicos (≥ 20)
- Distribuição regular

Porém:

- Taxa de mutação elevada
- Estimativa de tamanho de alelo variável entre equipamentos

SNPs

(Single Nucleotide Polymorphism)

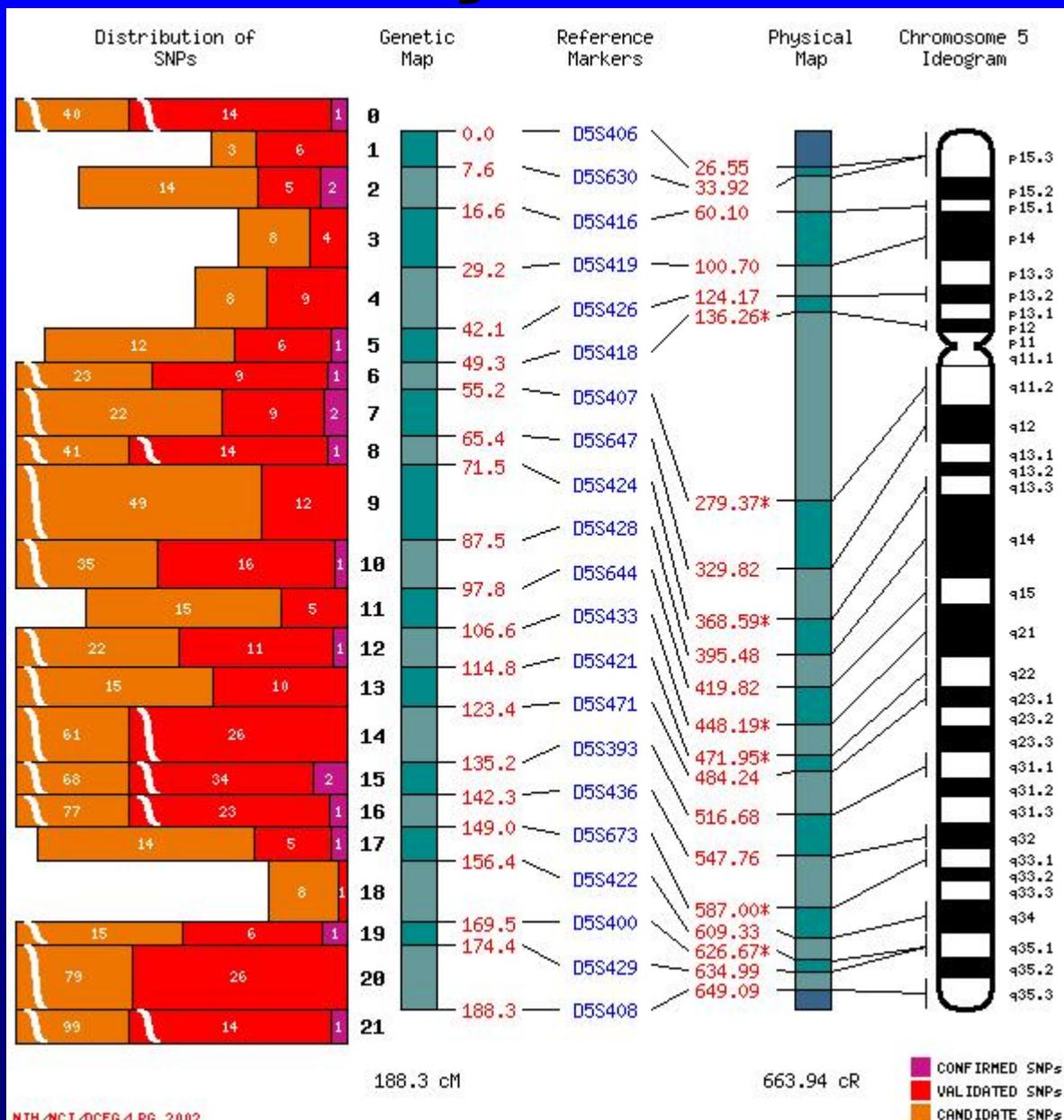
- Frequência: 1/100 a 300 bases;
- Dialélicos

Transversões ($A \Leftrightarrow C$ ou T ; $G \Leftrightarrow C$ ou T)

Transições ($A \Leftrightarrow G$ ou $C^* \Leftrightarrow T$)

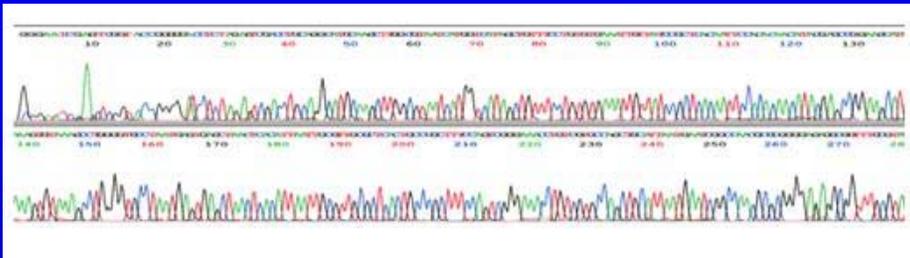
*desaminação $C^{\text{met}} \Rightarrow T$

Distribuição de SNPs

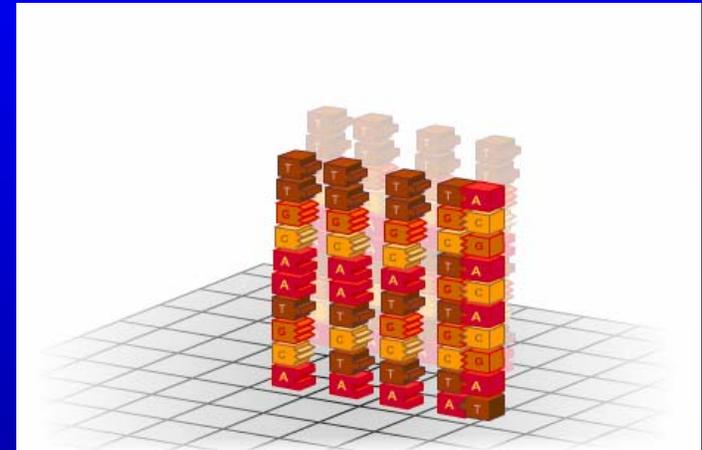


Genotipagem

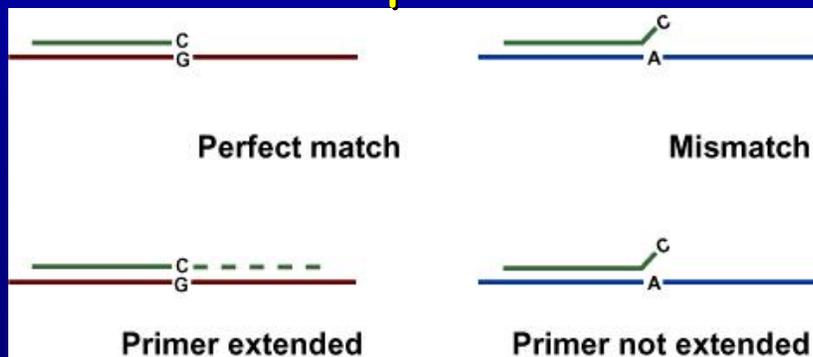
Sequenciamento



Arrays



Primer alelo específico



- RFLP
- SSCP
- MALDI-TOF
- Taqman
- ...

Em síntese:

Origem da variação

| Marcador | Substituição | Indel | VNTR | Conteúdo de informação |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| RF | ✓ | ✓ | - | 2 alelos/codom. |
| PCR | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₂ | 2 alelos/codom. |
| RA | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₄ | 2 alelos/dom. |
| AF | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₄ | 2 alelos/dom. |
| Micros | Uninformative meiosis | Informative meiosis | | 2 alelos/codom. |
| SNP | ✓ | ✓ | - | 2 alelos/codom. |

*Indels dentro da região amplificada são detectadas

Relações entre populações

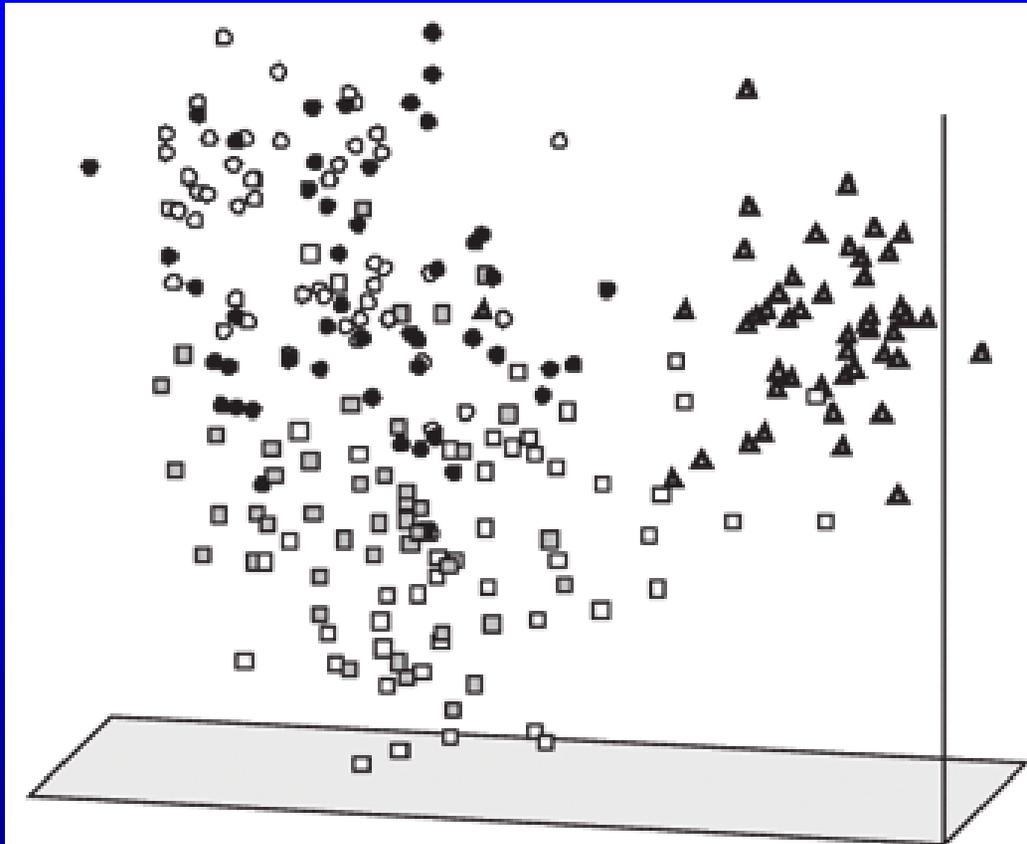


Figure 2. Principal component plot of the 238 individuals of Santa Inês (●); Bergamasca (○); Rabo Largo (■) ; Morada Nova (□) and Somali (▲) sheep populations by Jacard's coefficient.

Mapeamento de QTLs

Caracteres quantitativos

- A grande maioria dos caracteres de interesse econômico são quantitativos: muitos genes com contribuição igual e aditiva

(QTL - Quantitative Trait loci)

- Cada gene ou conjunto de genes adjacentes (ligados em um mesmo cromossomo) que influenciam um caráter quantitativo.

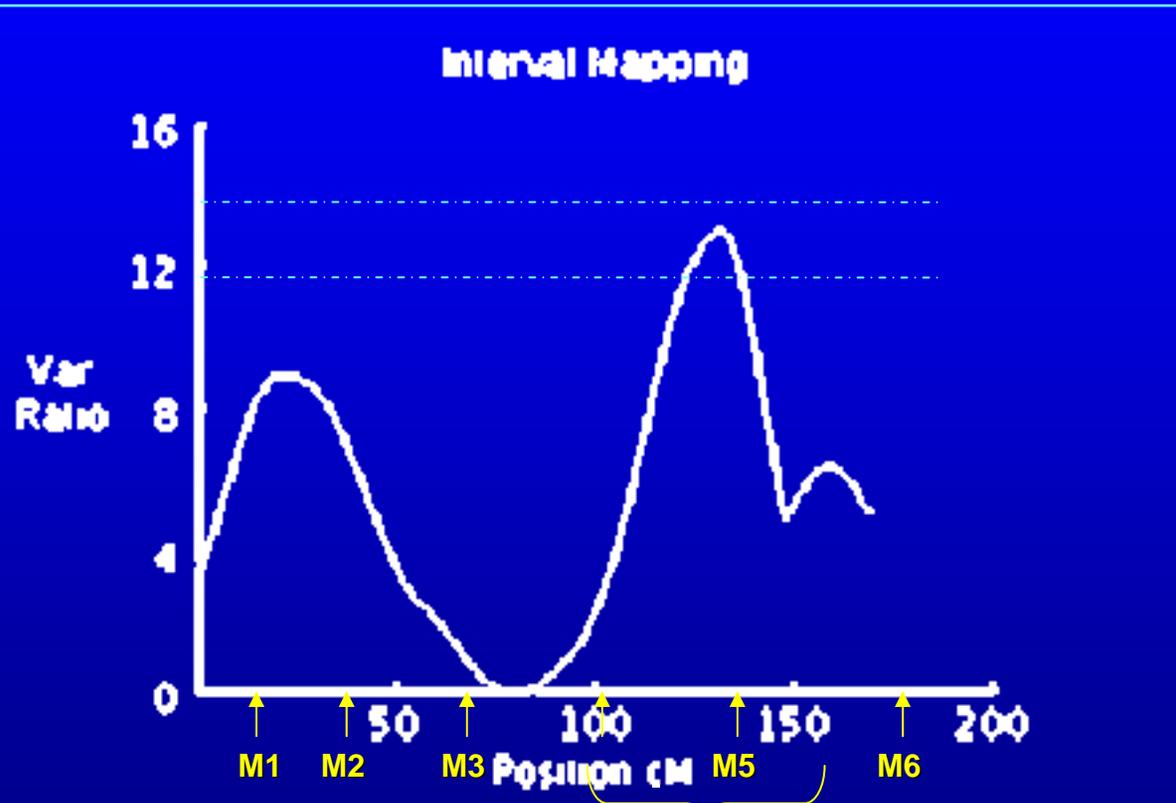


**Como identificar esses QTLs
em um genoma com milhares
de genes?**

Varredura do genoma

- ⇒ Construção de mapas das posições dos marcadores nos cromossomos
- ⇒ Varredura de cada intervalo entre dois marcadores em grandes populações segregantes

Exemplo de análise de intervalo:



Centenas de genes!



*+ meioses
+ marcadores*

+

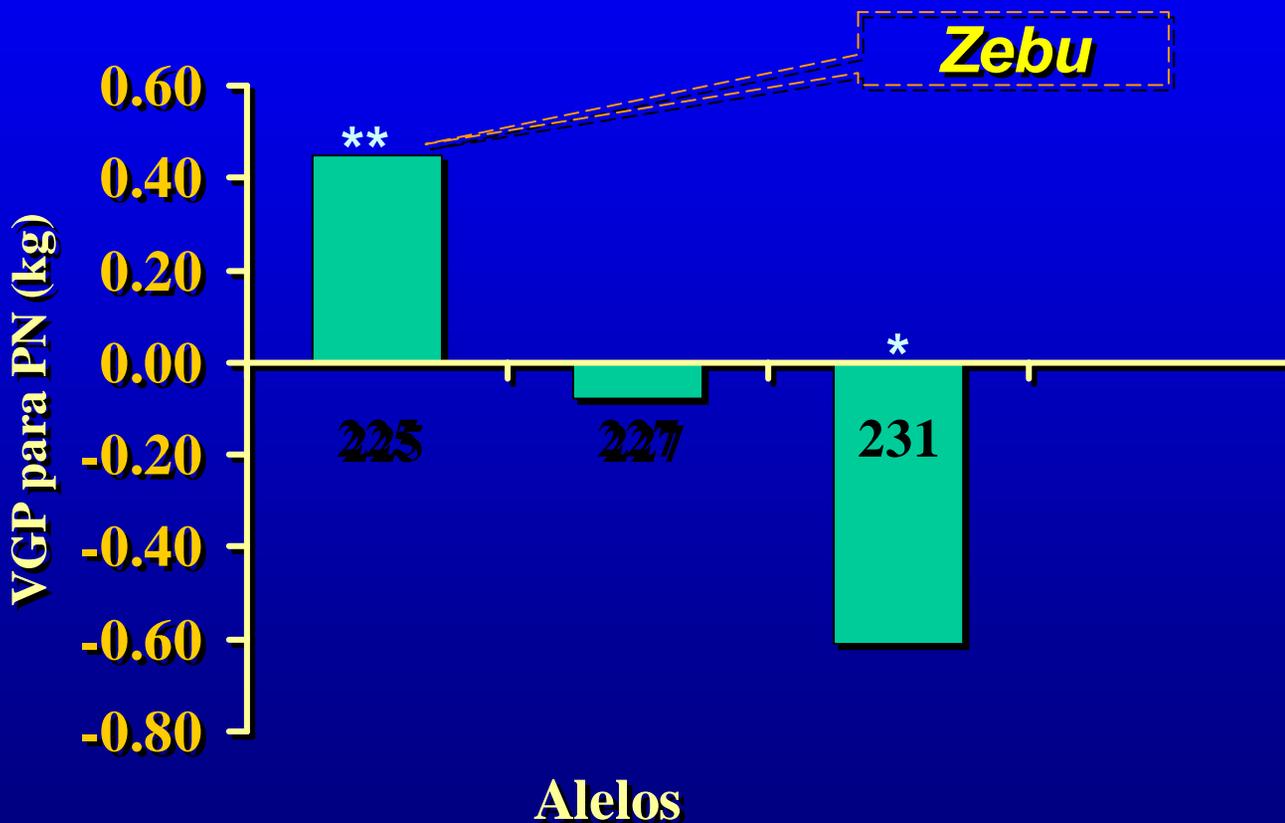


QTN

Gene Candidato

⇒ Busca associação entre o valor fenotípico e variações de seqüência em genes (Gene Candidato) ou próximo a genes que participam do processo biológico em questão.

Associação entre o gene IGF-1 e Valor Genético Predito para peso ao nascimento de Canchim



* como desvios do alelo de 229 bp

Perspectivas

Genotipagem em larga escala.....40.000
marcadores em uma análise

Visão multilocal do genótipo.....

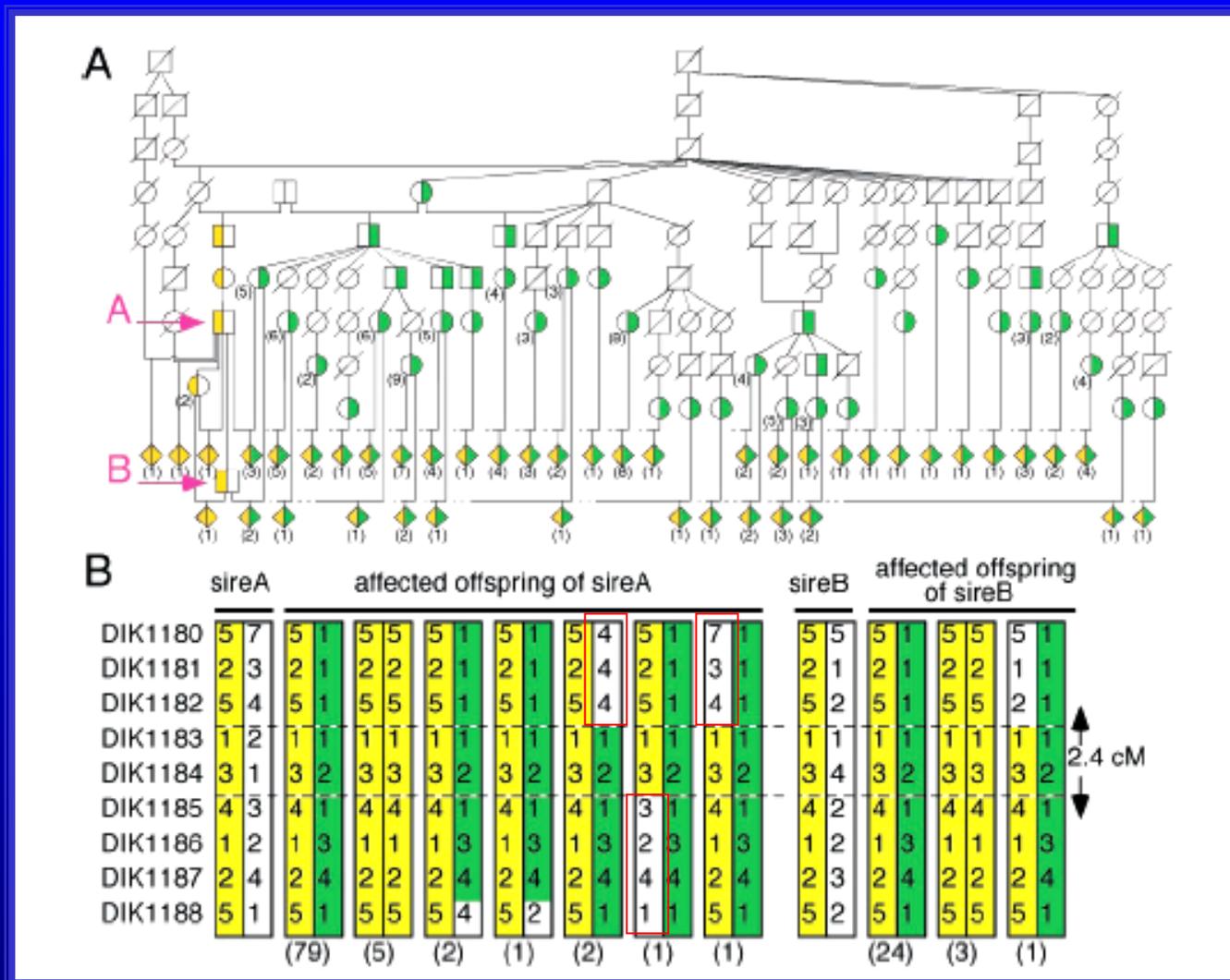
Seleção de combinações genômicas

MAS – fatores a considerar

- Marcador direto x indireto (LD)
- % da δ^2a explicada pelo marcador (deriva no restante do genoma)
- Interação com o ambiente;
- Epistasia

Diagnóstico de doenças

Exemplo de mapeamento de uma doença hereditária



Recombinantes afetados

OMIA

Summary of OMIA:

| | Dog | Cow | Cat | Pig | Horse | Sheep | Chicken | Goat | Rabbit | Norway Rat | Japanese Quail | Other | TOTAL |
|---|-----|-----|-----|-----|-------|-------|---------|------|--------|------------|----------------|-------|-------|
| Total Phenes | 481 | 369 | 277 | 214 | 189 | 187 | 177 | 70 | 48 | 37 | 35 | 456 | 2540 |
| Single-locus phenes | 121 | 66 | 45 | 34 | 31 | 68 | 70 | 10 | 12 | 4 | 21 | 58 | 540 |
| Phenes characterised at the molecular level | 58 | 36 | 16 | 13 | 13 | 15 | 18 | 7 | 3 | 2 | 3 | 21 | 205 |
| Potential models for human disease | 220 | 121 | 133 | 70 | 95 | 67 | 36 | 25 | 29 | 15 | 13 | 184 | 1008 |
| Potential model in other animals (ex human) | 279 | 228 | 213 | 149 | 133 | 131 | 69 | 59 | 38 | 27 | 15 | 394 | 1735 |

Last Submission: 2007-06-06

Impacto do diagnóstico molecular

- BLAD - Morte neonatal

1988 - desenvolvimento do diagnóstico

molecular: 150 touros Holandeses portadores

nos EUA

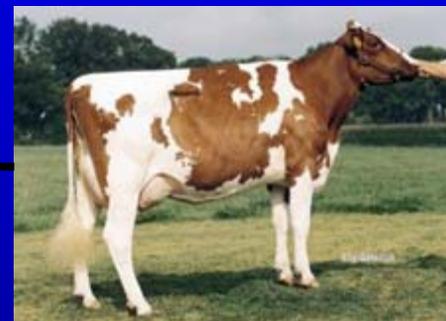
1992 - 5 touros portadores (3,3 %)

Investigação de Paternidade



//

M1 - 210 / 212
M2 - 154 / 154
M3 - 123 / 127
M4 - 222 / 224



M1 - 210 / 212
M2 - 154 / 158
M3 - 123 / 127
M4 - 220 / 226



M1 - 210 / 210
M2 - 156 / 158
M3 - 121 / 127
M4 - 220 / 220

ISAG- Mínimo de 9 marcadores

Importância

- Bovinos: 15 a 30% de erro (animais registrados)
- Informações exatas de pedigree:
 - Estimativa correta do valor genético dos animais = maior ganho genético;
 - Controle da endogamia (conservação de recursos genéticos)

Considerações Finais

- A disponibilidade de marcadores não é mais problema;
- Escolha do marcador depende do objetivo do estudo;
- Integração com outras estratégias (genoma funcional, proteoma, metaboloma)

Equipe

Embrapa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"





Obrigada!

luciana@cnpse.embrapa.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto



Mapas do genoma de animais de interesse econômico: estratégias atuais para construção e utilização.

Doutoranda: Melissa Nunes Miziara

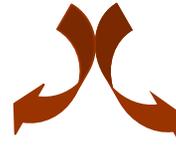


Melhoramento genético



espécies de interesse econômico

domesticação



seleção de fenótipos desejáveis

cruzamento de animais com características comercialmente importantes

informações



fatores responsáveis???



Como manipular???



melhoramento genético

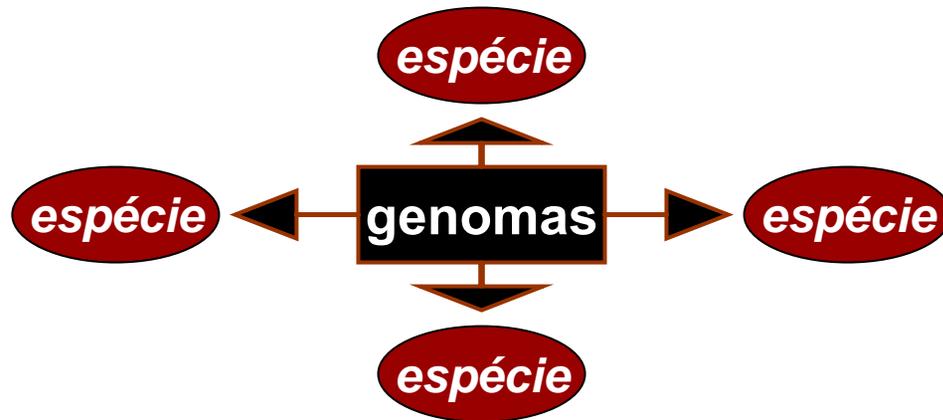


Ferramentas genéticas tradicionais

padrões de herança dos genes

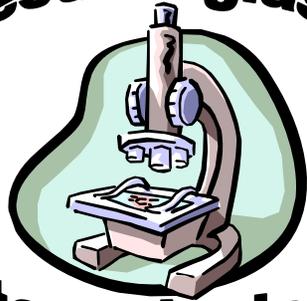
LIMITADAS

conhecimento



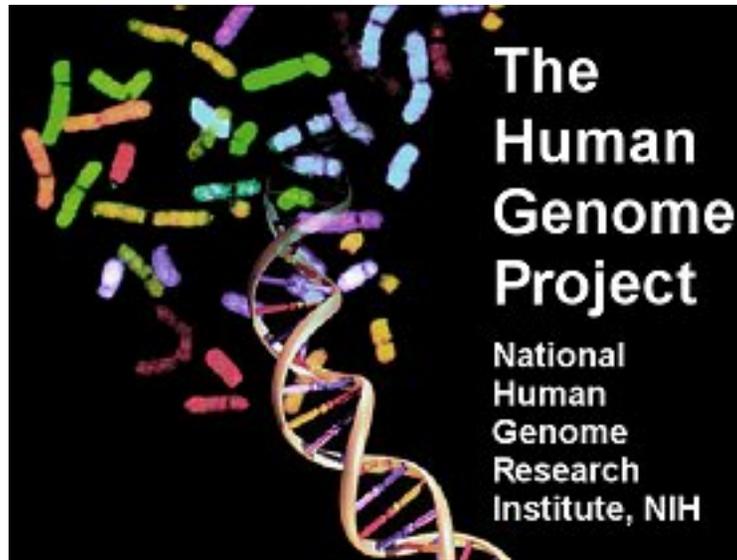
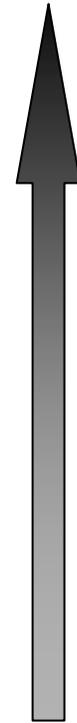


estratégias



tecnologias

Pesquisas
genéticas

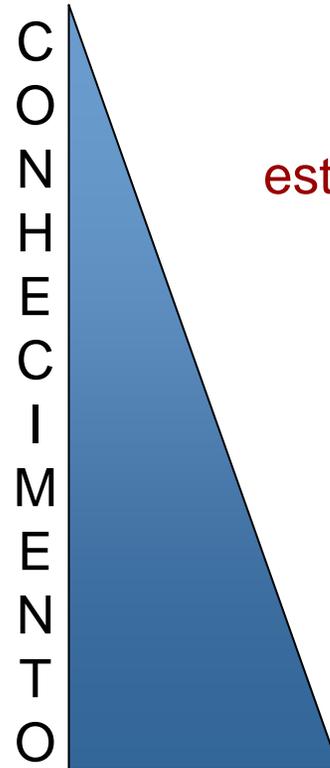




Genômica



Estratégias avançadas



estrutura

funcionamento

genomas inteiros



Genômica

Genômica estrutural

Genômica funcional

caracteriza a *natureza física* dos genomas

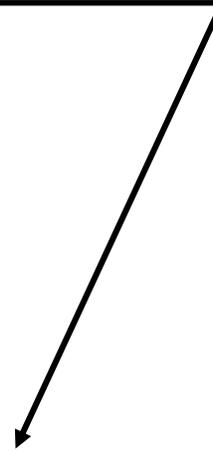
identificação/localização dos genes ao longo dos cromossomos



Genômica

Genômica estrutural

Genômica funcional



Expressão conjunta dos genes nos diferentes tecidos e organismos



**espécies
animais interesse econômico**

Genômica estrutural



Região específica

Mapeamento genômico

“indicação de um gene a um *locus* no cromossomo”

“posicionamento em relação a outros genes mesmo cromossomo”



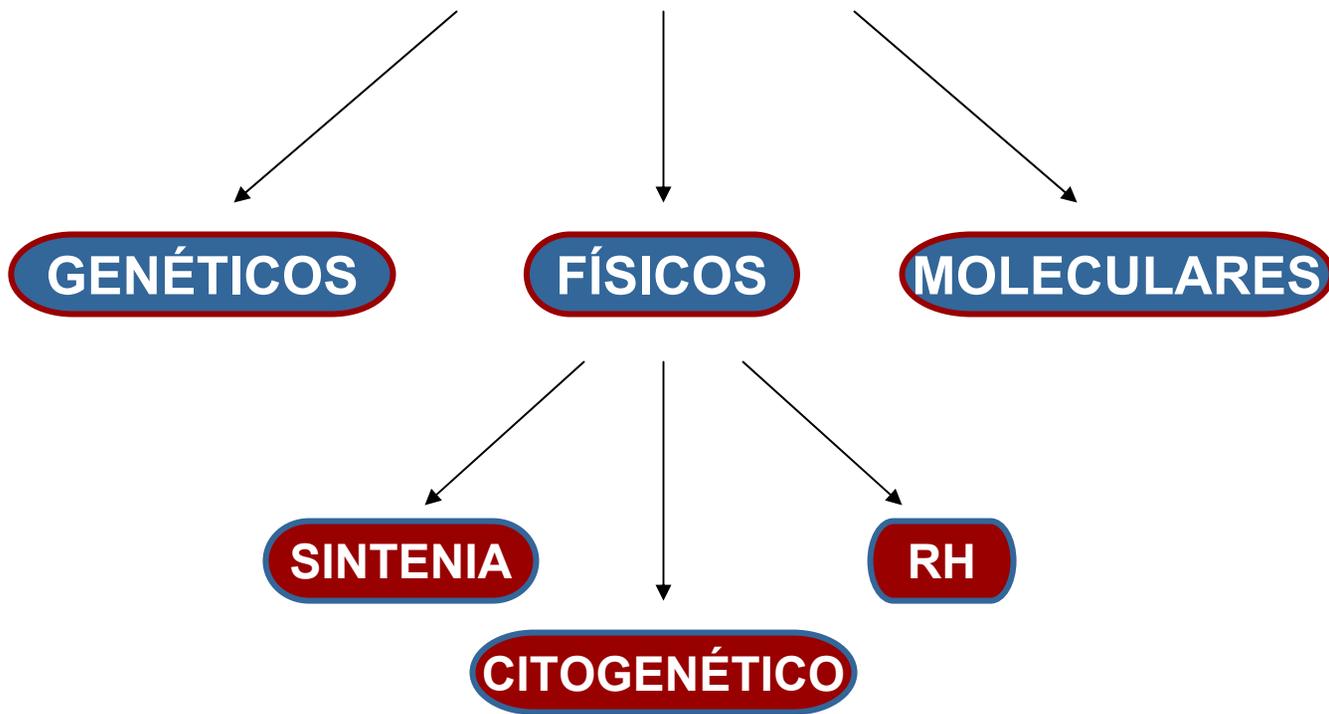


Mapeamento genômico em animais de interesse econômico

- 1) Localizar genes responsáveis por características comercialmente importantes;
- 2) Localizar genes associados a doenças;
- 3) Procurar genes que sirvam como modelo de estudo dos efeitos de doenças genéticas humanas;
- 4) Estudar mecanismos de rearranjos cromossômicos que resultaram na evolução dos mamíferos.



Mapas genômicos





Seqüência de DNA



genoma animal interesse econômico



Genes conhecidos

diferentes
tipos de mapas



Indicação de um gene a um cromossomo



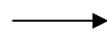
Obtenção da sua seqüência completa de bases





Como iniciar os estudos de mapeamento do genoma de uma espécie de interesse econômico?

1º passo



Quais genes?



syn = mesmo/junto
tene = fio

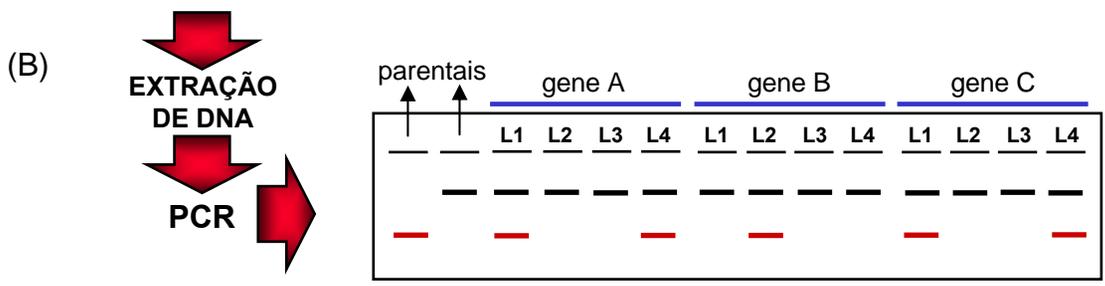
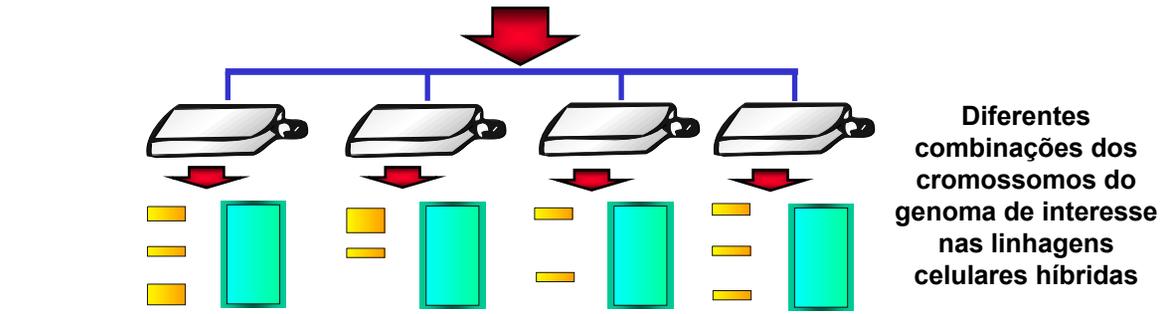
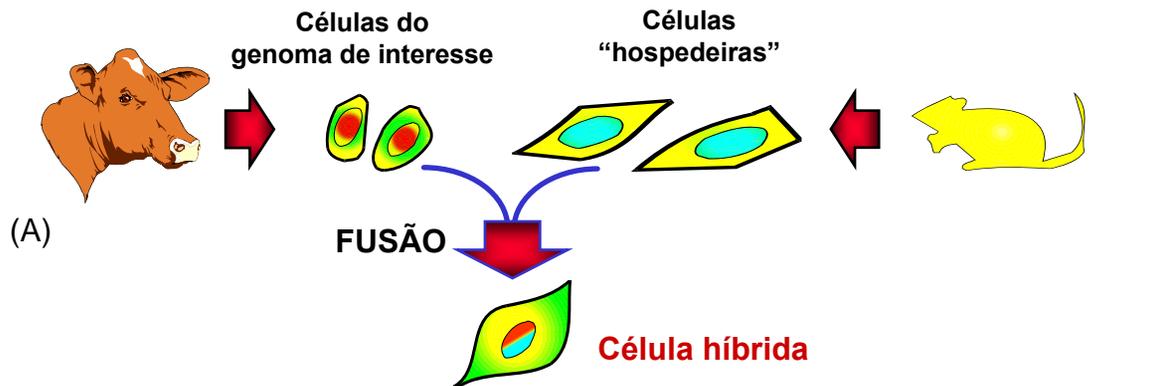
MAPA DE SINTENIA

(mapa físico)

Descreve quais genes estão localizados em um determinado cromossomo sem a necessidade de cruzamento sexual.

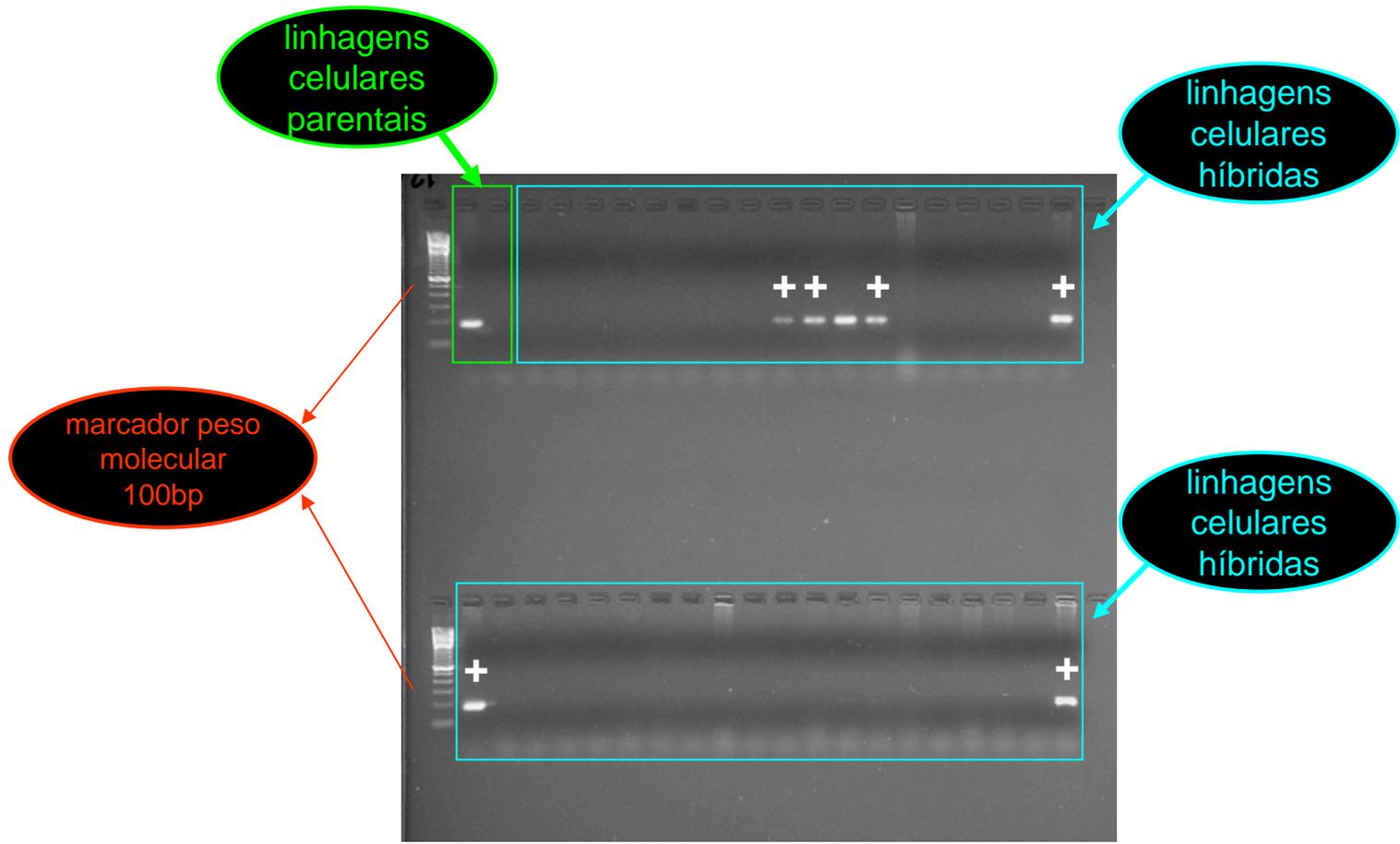
Conjunto de linhagens de células híbridas

PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS



(C)

| gene | Linhagem 1 | Linhagem 2 | Linhagem 3 | Linhagem 4 |
|------|------------|------------|------------|------------|
| A | + | - | - | + |
| B | - | + | - | + |
| C | + | - | - | + |



Gel de agarose contendo os produtos de uma reação de PCR do gene CGA



Como iniciar os estudos de mapeamento do genoma de uma espécie de interesse econômico?

1º passo → Quais genes?

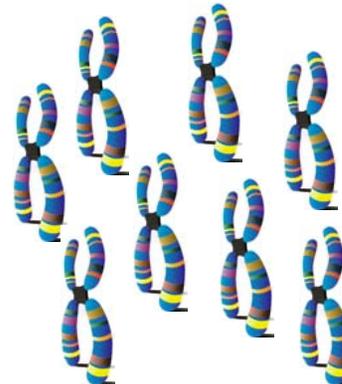


MAPA DE SINTENIA

(mapa físico)

Descreve quais genes estão localizados em um determinado cromossomo sem a necessidade de cruzamento sexual.

Não fornece informações





Como saber em qual cromossomo do genoma um grupo de sintenia está localizado?

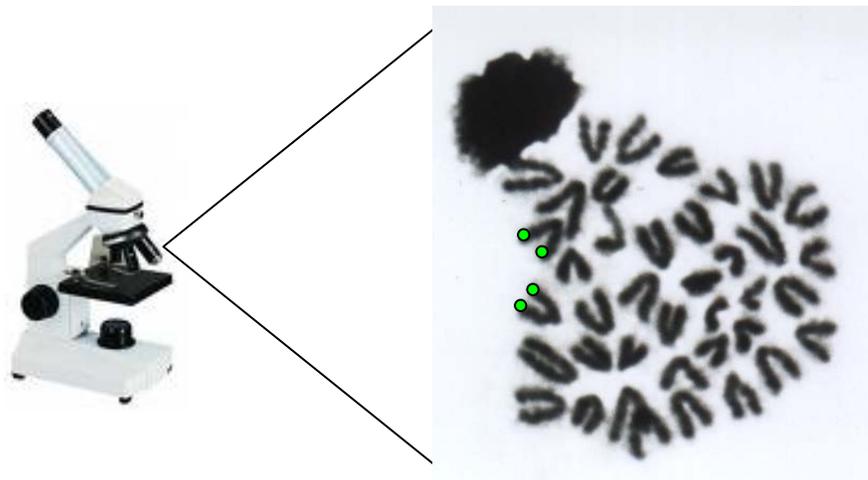
MAPA CITOGENÉTICO

(mapa físico)

Construído por meio da técnica de HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Utiliza seqüências de DNA
(**sondas**) complementares
aos genes-alvo

Hibridizar **cromossomos
metafásicos** do genoma
de interesse



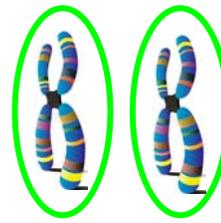
**visualização dos
genes nos
cromossomos**

Metaphase chromosomes in XO mouse –
adaptado
(http://darwin.iz.uj.edu.pl/iz/genetics/szot_e.htm)

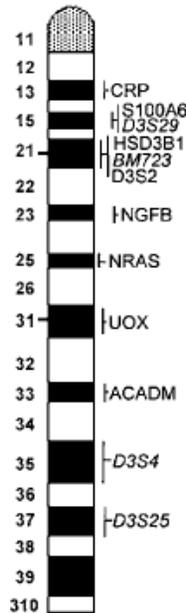


Grupos de sintenia

∈



CARIÓTIPO



Mapa citogenético do cromossomo 6 do genoma do búfalo-de-rio (Iannuzzi et al., 2003)



www.ciencia-ativa.org/DivergenAlfabetoGenes.htm

**MAPA
CITOGENÉTICO**

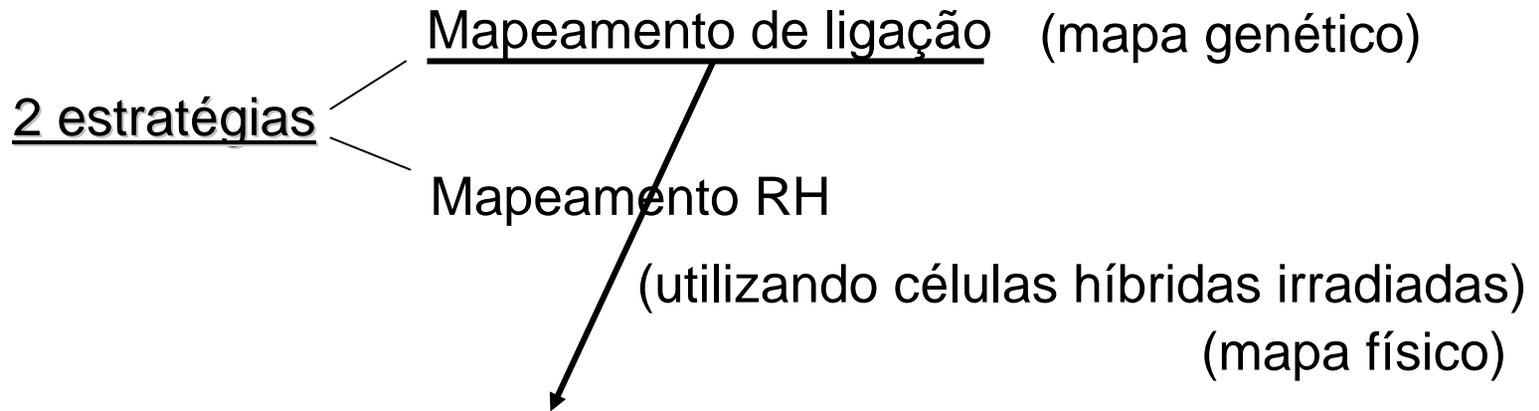
(mapa físico) =

=



resolução

Como conhecer a ordem e a distância de genes vizinhos no cromossomo?

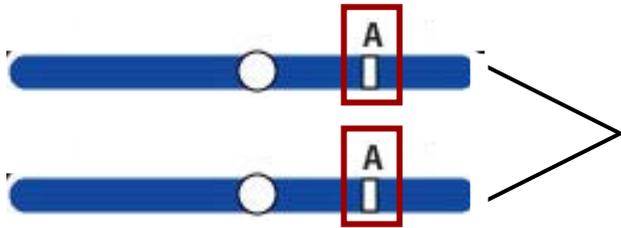


Fornece a ordem dos genes em um cromossomo baseando-se na análise da frequência de indivíduos recombinantes a partir de um cruzamento sexual.

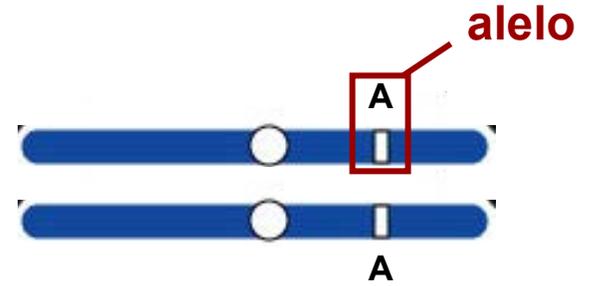




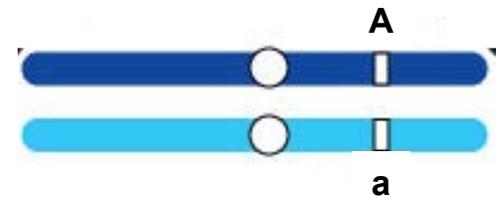
Indivíduo diplóide



homólogos

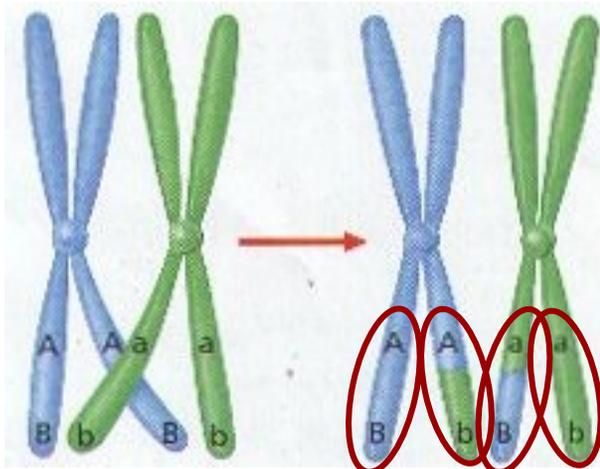


homozigoto



heterozigoto

MEIOSE



Recombinação
Crossing-over



1911



Thomas Hunt Morgan



Alfred Sturtevant

THE LINEAR ARRANGEMENT OF
SIX SEX-LINKED FACTORS IN **DROSOPHILA**,
AS SHOWN BY THEIR MODE OF ASSOCIATION

A. H. STURTEVANT

Sturtevant, A. H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14: 43-59.

Teoria da recombinação

ESP

ELECTRONIC SCHOLARLY PUBLISHING

[HTTP://WWW.ESP.ORG](http://www.esp.org)



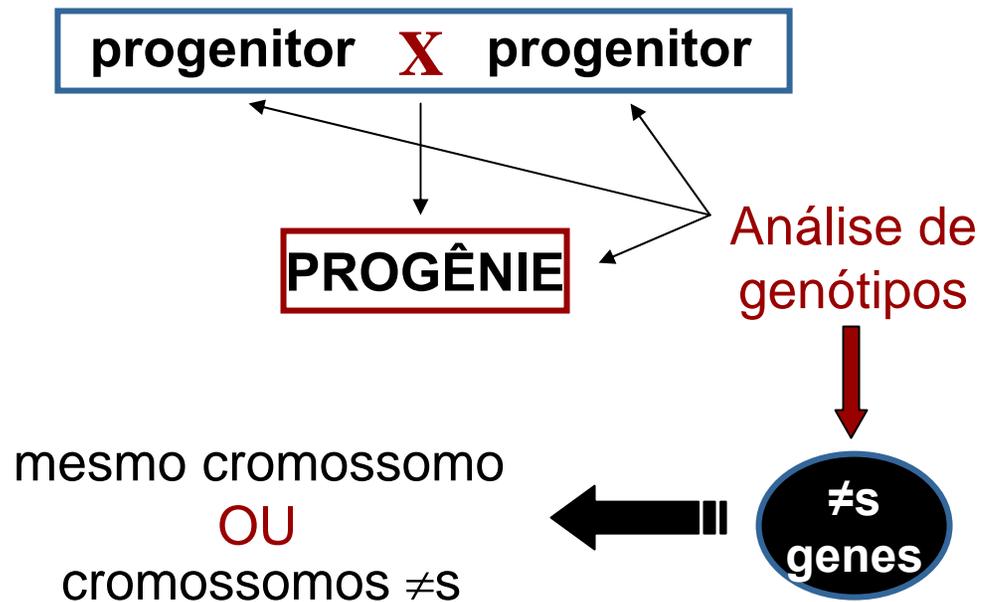
Hipótese criada para a construção do mapa

menor a **distância** entre dois genes em um **mesmo cromossomo**

maior é a **chance** de serem **herdados** juntos - **ligados**

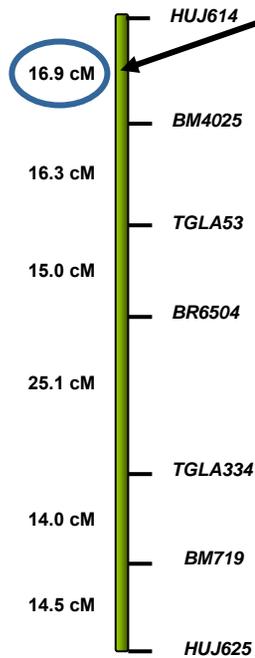
Mapa genético

→ análise padrão de **herança dos genes** dos pais para a prole pelo cruzamento sexual → recombinação meiótica.

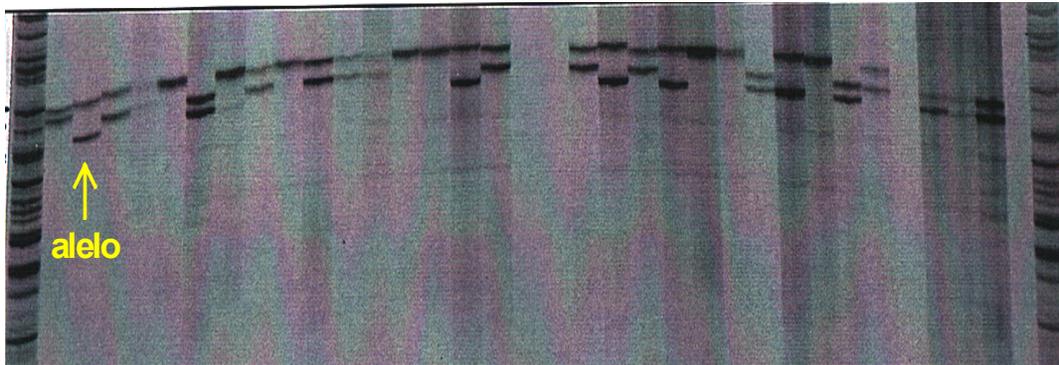
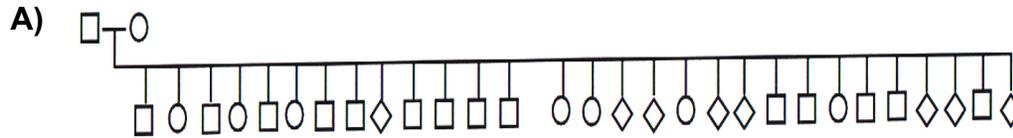


Conjunto de genes ligados = GRUPO DE LIGAÇÃO

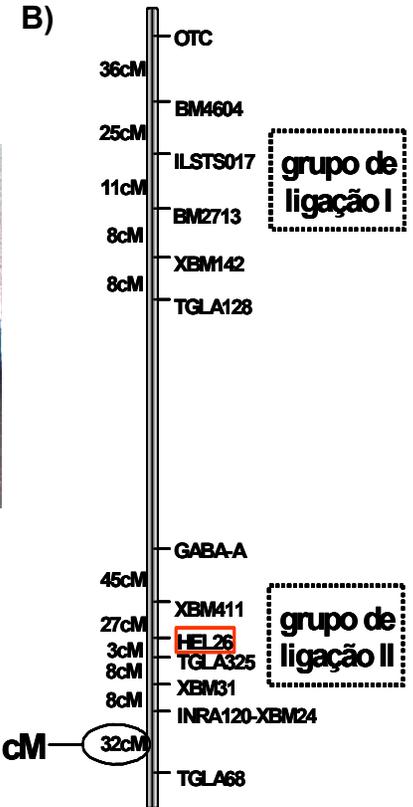
DISTÂNCIA
centiMorgan - cM



Representação esquemática do mapa de ligação do cromossomo 12 de ovelha (Crawford et al., 1995).



← marcador de tamanho da molécula de DNA



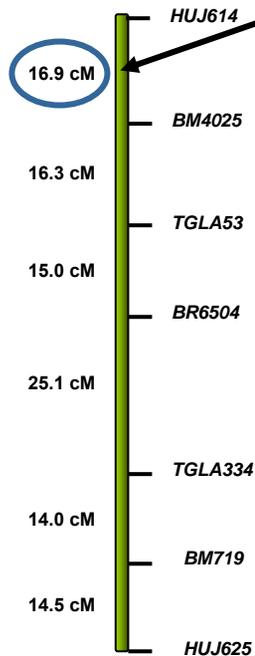
Obtenção de um mapa de ligação do cromossomo X bovino. Parte A - análise dos genótipos dos pais e da prole de uma família de bovinos em relação ao marcador HEL26. Parte B – mapa construído a partir da análise da freqüência de recombinação de um conjunto de marcadores do cromossomo X bovino.



Conjunto de genes ligados = GRUPO DE LIGAÇÃO

DISTÂNCIA centiMorgan - cM

ordem e distância → genes



importantes

Como os genes são transmitidos
através das gerações

Representação esquemática do mapa de ligação do cromossomo 12 de ovelha (Crawford et al., 1995).



Final do século XX

2 estratégias

Mapeamento de ligação (mapa genético)

Mapeamento células híbridas irradiadas - **RH**
(mapa físico)



1990 – genoma humano

1997 – genoma bovino



Mammalian Genome 8, 854–856 (1997).

*Mammalian
Genome*

© Springer-Verlag New York Inc. 1997

A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping

James E. Womack, Jan S. Johnson, Elaine K. Owens, Caird E. Rexroad III, Jörg Schläpfer, Ya-Ping Yang

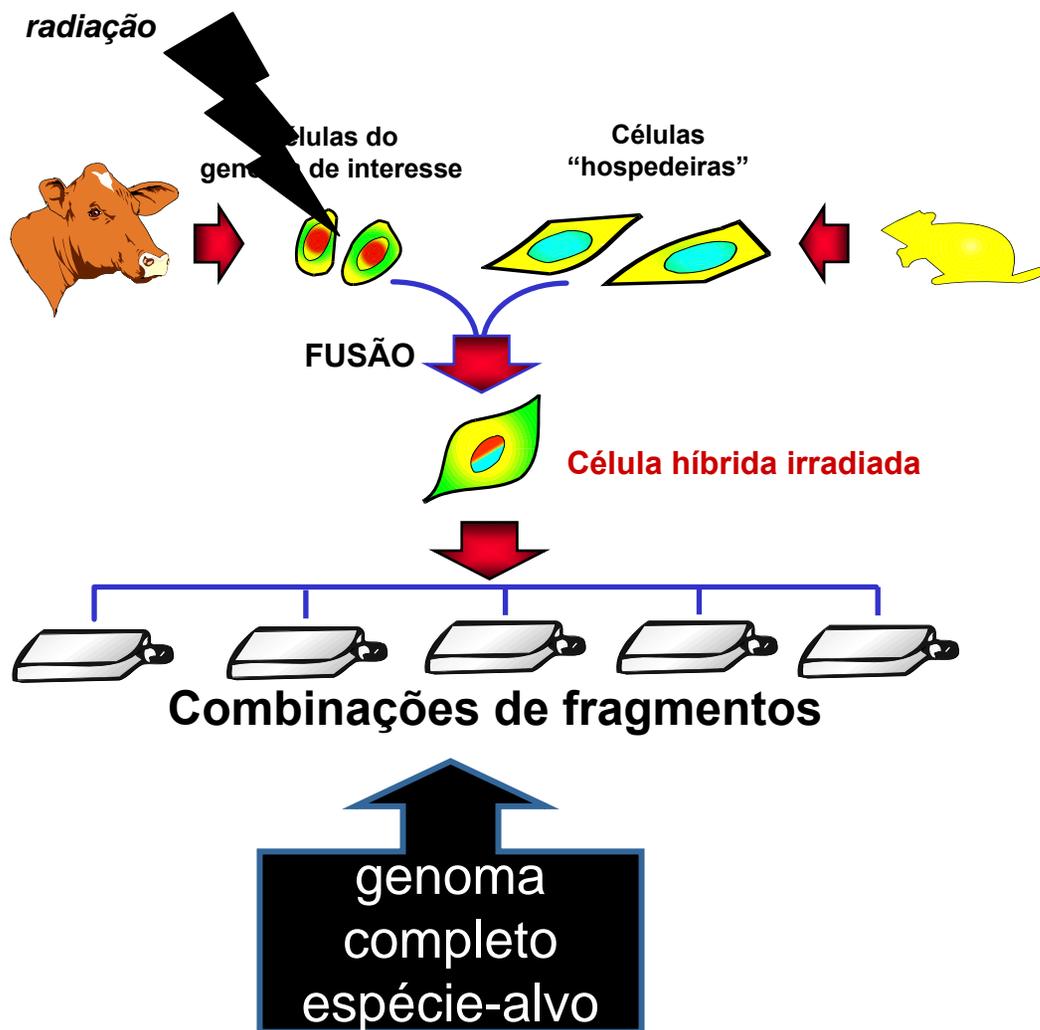
Center for Animal Genetics, Institute of Biosciences and Technology, Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, USA



MAPA RH

(mapa físico)

Adaptação da metodologia utilizada ao mapeamento sintênico





MAPA RH

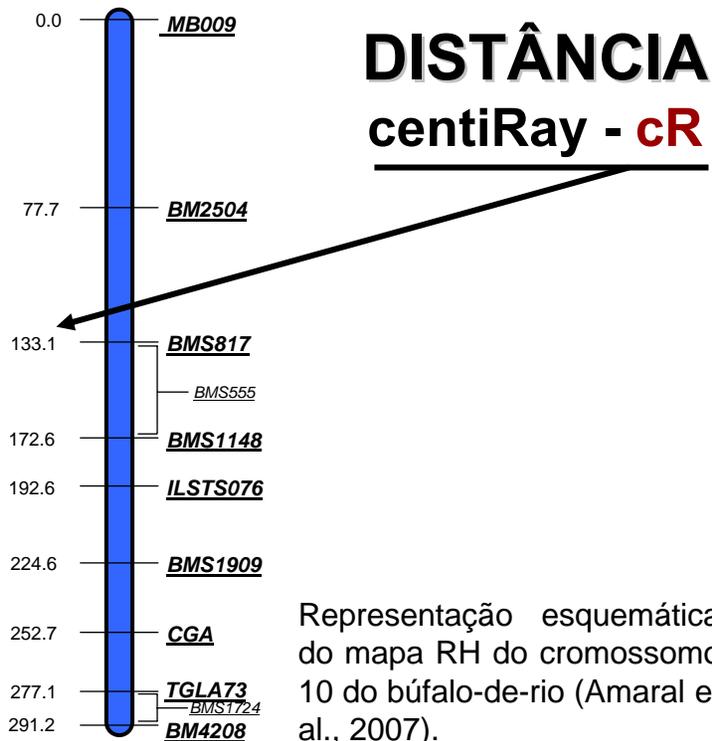
(mapa físico)

Análise estatística → presença e ausência dos genes

hipótese

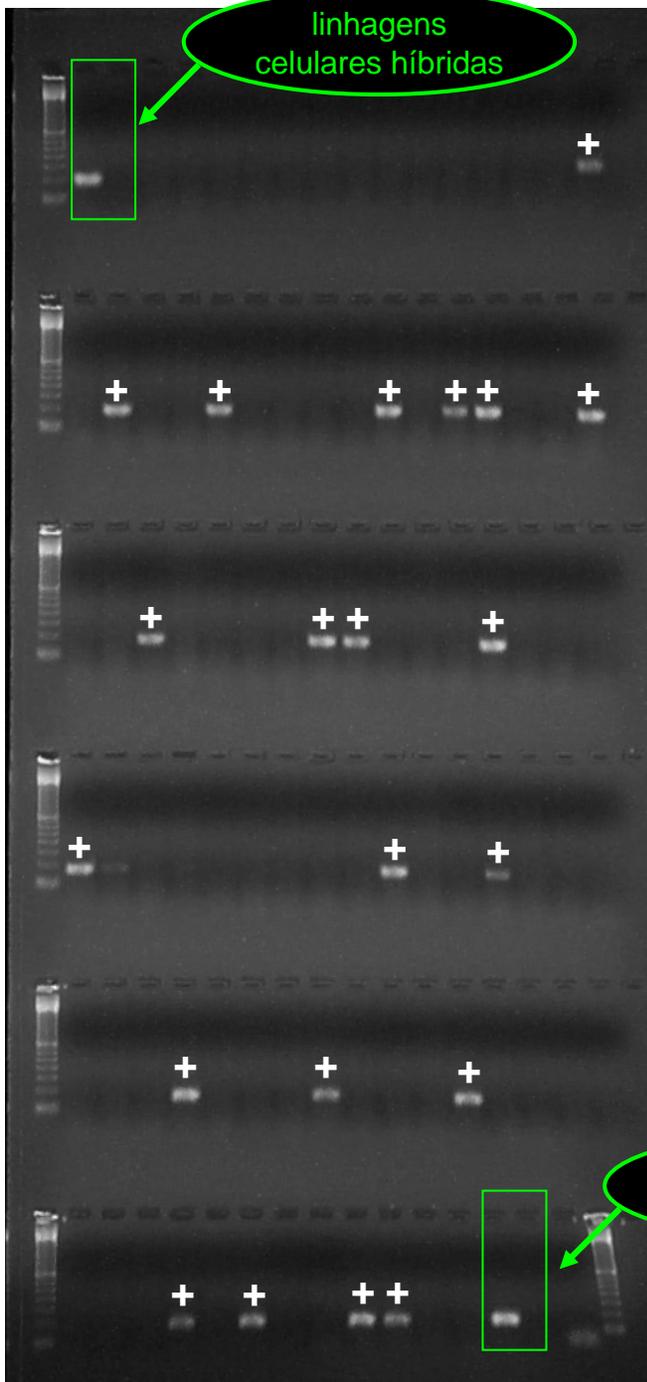
menor a distância entre dois genes em um mesmo cromossomo

maior a probabilidade de permanecerem juntos no mesmo fragmento



Representação esquemática do mapa RH do cromossomo 10 do búfalo-de-rio (Amaral et al., 2007).

linhagens celulares híbridas



Gel de agarose contendo os produtos de uma reação de PCR do gene UBE2D3

| Clone | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 | Clone | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 | Clone | Gel 1 | Gel 2 | Gel 3 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2 | | | | 72 | | | | 114 | | | |
| 5 | | | | 75 | | | | 116 | | | |
| 8 | | | | 76 | + | + | | 117 | | | |
| 9 | | | | 78 | | | | 120 | | | |
| 15 | | | | 79 | | | | 121 | | | |
| 17 | | | | 80 | | | | 122 | + | + | |
| 21 | | | | 81 | | | | 123 | | | |
| 22 | | | | 82 | + | + | | 126 | | | |
| 23 | | | | 85 | + | + | | 127 | | | |
| 24 | | | | 86 | | | | 131 | + | + | |
| 25 | | | | 87 | | | | 132 | | | |
| 26 | | | | 89 | | | | 133 | | | |
| 27 | | | | 90 | + | + | | 134 | | | |
| 30 | + | + | | 91 | | | | 137 | + | + | |
| 31 | | | | 92 | | | | 138 | | | |
| 33 | + | + | | 93 | | | | 139 | | | |
| 38 | | | | 94 | + | + | | 141 | | | |
| 39 | | | | 95 | + | + | - | 143 | | | |
| 44 | + | + | | 97 | | | | 144 | | | |
| 47 | | | | 98 | | | | 145 | | | |
| 48 | | | | 100 | | | | 146 | | | |
| 51 | | | | 102 | | | | 147 | + | + | |
| 53 | | | | 103 | | | | 148 | | | |
| 55 | + | + | | 104 | | | | 150 | + | + | |
| 62 | | | | 105 | | | | 151 | | | |
| 63 | + | + | | 106 | + | + | | 153 | ? | | - |
| 66 | + | + | | 110 | | | | 158 | + | + | |
| 67 | | | | 111 | | | | 159 | + | + | |
| 70 | | | | 112 | + | + | | 162 | | | |
| 71 | + | + | | 113 | | | | 163 | | | |

linhagens celulares híbridas



MAPA RH

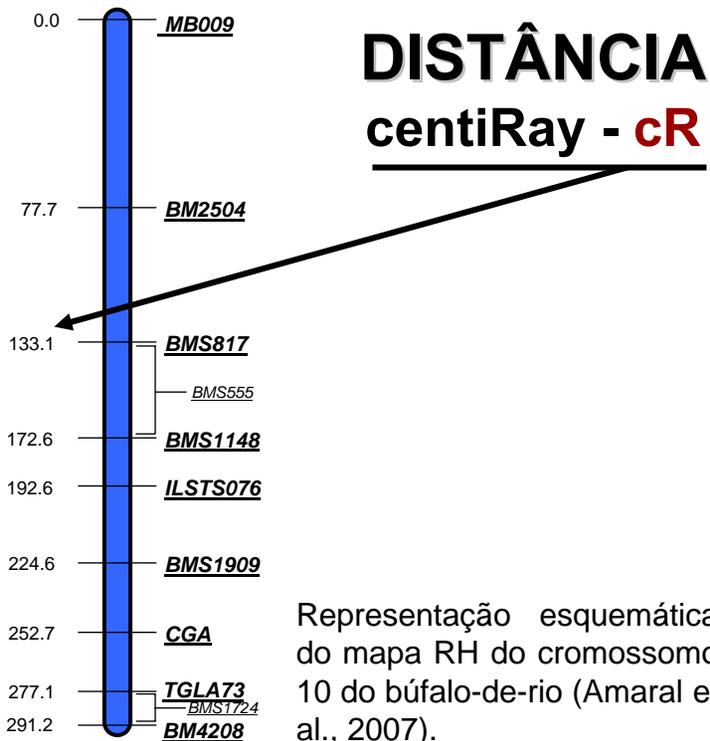
(mapa físico)

Análise estatística → presença e ausência dos genes

hipótese

menor a distância entre dois genes em um mesmo cromossomo

maior a probabilidade de permanecerem juntos no mesmo fragmento



Representação esquemática do mapa RH do cromossomo 10 do búfalo-de-rio (Amaral et al., 2007).

Distância entre os genes

ESTIMADA

não apresenta relação bp

Manipulação individual

Obtenção de mapas

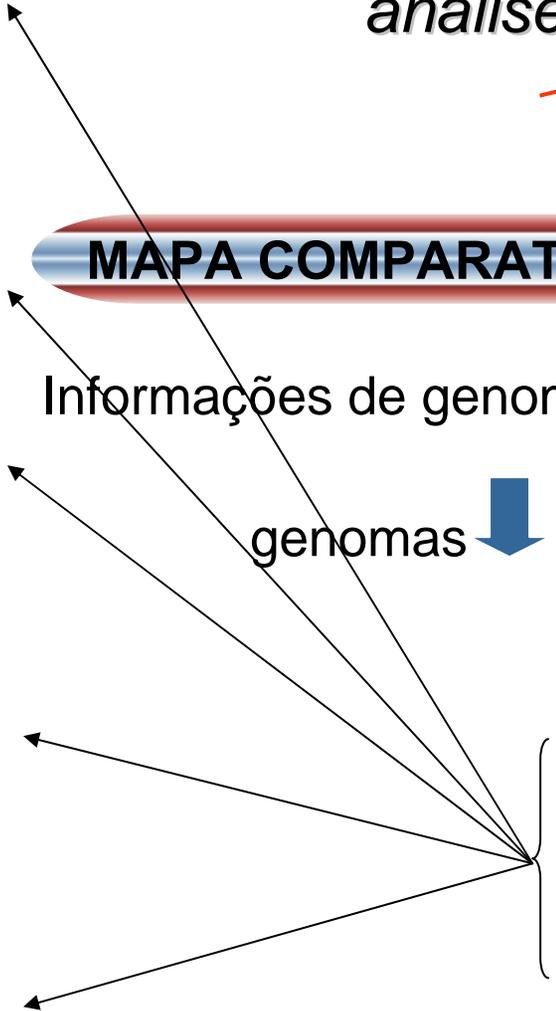
~~análise de polimorfismos em famílias~~

MAPA COMPARATIVO

Informações de genomas ↑ caracterizados

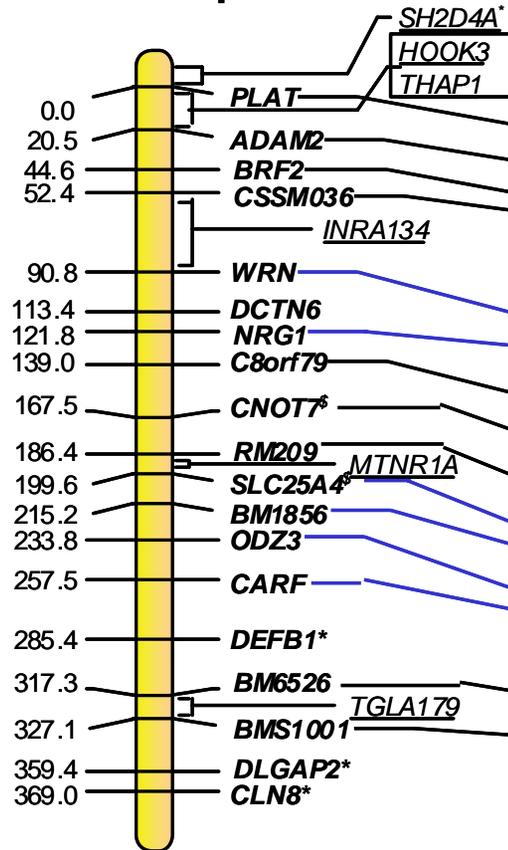
genomas ↓ documentados

**conservação
genes
mamíferos**

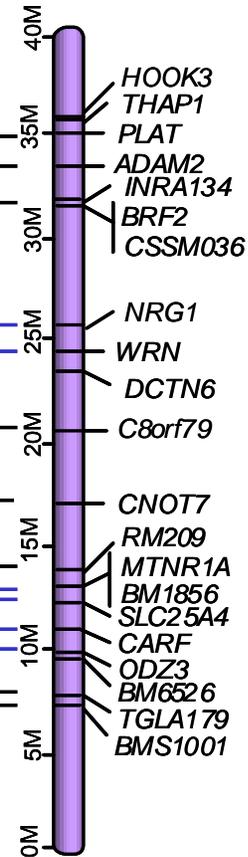




BBU1 Mapa RH



BTA27 Mapa de seqüência



Comparação do mapa RH do braço curto do cromossomo 1 do genoma do búfalo-de-rio com o mapa molecular do cromossomo 27 do genoma bovino (Miziara et al., 2007). As linhas na cor preta indicam genes presentes nos dois mapas e que apresentam a mesma ordem nos cromossomos das duas espécies. As linhas na cor azul indicam três inversões na ordem dos genes em questão.

Como conhecer a distância real entre os genes em um determinado cromossomo?

MAPA MOLECULAR



...attgccgctgctgaggcaaagtctttaagcacacata...

pares de base





attgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataa
 ttgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatg
 ccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgcc
 gcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgc
 gctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgct
 gcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgct
 gcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgct
 gacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagc
 acacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcac
 acataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcac
 ggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgagg
 caaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgagg
 gctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgc
 agcatttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaag
 tctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtct
 ttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtcttta
 agcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataat
 tgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaa
 gtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaa
 gtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattg
 ccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagt
 cttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgc
 gctgcgaggcaaagtctttaagcacagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtcttta
 agcaaaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgag
 gcaaagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggc
 aagtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaa
 agtctttaagcacacatatgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagt
 cttaagcacacatagaggcaaagtctttaagcacacataattgccgcgctgcgaggcaaagtctttaagcaatggg

?

A T C G

gene sequências reguladoras

?



construção \neq tipos de mapas

integração



conhecimento detalhado

genes do genoma

localização

funcionamento

→ estudos de características economicamente importantes
→ identificação/manipulação genes
- para obtenção de fenótipos desejáveis
- possíveis curas doenças

obtenção de mapas:

- não se limita a identificar um gene
- **CONHECIMENTO DE GENOMAS INTEIROS**
(funcionamento e evolução)

crescente disponibilidade informações:

- **organização genomas animais interesse econômico**
- **resulta na obtenção de mapas mais detalhados**
- **contribuir nos programas melhoramento genético**
- **estudos mais aprofundados de doenças genéticas**

Genômica Estrutural em animais de interesse econômico



❖ Construção de mapas

❖ Uso dos mapas para escanear genoma de populações cruzadas para caracteres comercialmente importantes
localizar QTLs → segmentos cromossômicos

❖ Identificação dos genes responsáveis pelos caracteres dentro dessas regiões
ferramentas de biotecnologia

❖ Preencher o *gap* GENE → FENÓTIPO FINAL

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

The Journal of Heredity 77:2-7. 1986.

Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Copyright © 1994 by the Genetics Society of America

A Genetic Linkage Map for Cattle

**Michael D. Bishop,* Steven M. Kappes,* John W. Keele,* Roger T. Stone,*
Sara L. F. Sunden,*[†] Gregory A. Hawkins,* Sabina Solinas Toldo,[†] Ruedi Fries,[†]
Michael D. Grosz,* Jakyoungh Yoo* and Craig W. Beattie***

**USDA, ARS, Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, Nebraska 68933-0166 and*

[†]Swiss Federal Institute of Technology, CH-8092 Zurich, Switzerland

Manuscript received September 9, 1993
Accepted for publication October 22, 1993

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 8, 21–28 (1997).

***Mammalian
Genome***

© Springer-Verlag New York Inc. 1997

A medium-density genetic linkage map of the bovine genome

W. Barendse,¹ D. Vaiman,² S.J. Kemp,³ Y. Sugimoto,⁴ S.M. Armitage,¹ J.L. Williams,⁵ H.S. Sun,⁶ A. Eggen,² M. Agaba,³ S.A. Aleyasin,¹ M. Band,⁷ M.D. Bishop,⁸ J. Buitkamp,⁹ K. Byrne,¹ F. Collins,¹ L. Cooper,¹ W. Coppettiers,¹⁰ B. Denys,¹⁰ R.D. Drinkwater,¹ K. Easterday,¹¹ C. Elduque,^{2,22} S. Ennis,¹² G. Erhardt,¹³ L. Ferretti,¹⁴ N. Flavin,¹² Q. Gao,¹⁵ M. Georges,¹⁰ R. Gurung,¹ B. Harlizius,¹⁶ G. Hawkins,⁸ J. Hetzel,¹ T. Hirano,⁴ D. Hulme,³⁴ C. Jorgensen,¹⁷ M. Kessler,¹³ B.W. Kirkpatrick,⁶ B. Konfortov,¹⁸ S. Kostia,³¹ C. Kuhn,¹⁹ J.A. Lenstra,²⁰ H. Leveziel,² H.A. Lewin,²¹ B. Leyhe,¹³ L. Lil,¹⁵ I. Martin Burriel,²² R.A. McGraw,²³ J.R. Miller,¹⁸ D.E. Moody,²⁴ S.S. Moore,¹ S. Nakane,^{4,25} I.J. Nijman,²⁰ I. Olsaker,²⁶ D. Pomp,²⁴ A. Rando,²⁸ M. Ron,⁷ A. Shalom,²⁸ A.J. Teale,³ U. Thieven,¹⁶ B.G.D. Urquhart,⁵ D.-I. Vage,²⁹ A. Van de Weghe,³⁰ S. Varvio,³¹ R. Velmala,³² J. Vilkki,³² R. Weikard,¹⁹ C. Woodside,¹ J.E. Womack,¹⁵ M. Zanotti,³³ P. Zaragoza²²

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 8, 854–856 (1997).

***Mammalian
Genome***

© Springer-Verlag New York Inc. 1997

A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping

James E. Womack, Jan S. Johnson, Elaine K. Owens, Caird E. Rexroad III, Jörg Schläpfer, Ya-Ping Yang

Center for Animal Genetics, Institute of Biosciences and Technology, Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University,
College Station, Texas 77843, USA

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 13, 469–474 (2002).
DOI: 10.1007/s00335-002-3001-x

**Mammalian
Genome**
Incorporating Mouse Genome
© Springer-Verlag New York Inc. 2002

A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map

John L. Williams,¹ André Eggen,² Luca Ferretti,³ Christine J. Farr,⁴ Mathieu Gautier,² Giuseppe Amati,³
Glynn Ball,¹ Tiziana Caramorr,³ Ricky Critcher,⁴ Sandro Costa,³ Patrick Hextall,⁴ David Hills,¹ Aurore Jeulin,²
Susanna L. Kiguwa,⁴ Olivia Ross,¹ Angela L. Smith,⁴ Katiana Saunier,² Barbara Urquhart,¹ Dave Waddington¹

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



A 1463 Gene Cattle–Human Comparative Map With Anchor Points Defined by Human Genome Sequence Coordinates

Annelie Everts-van der Wind, Srinivas R. Kata, Mark R. Band, Mark Rebeiz, Denis M. Larkin, Robin E. Everts, Cheryl A. Green, Lei Liu, Shreedhar Natarajan, Tom Goldammer, Jun Heon Lee, Stephanie McKay, James E. Womack and Harris A. Lewin

Genome Res. 2004 14: 1424-1437

Access the most recent version at doi:[10.1101/gr.2554404](https://doi.org/10.1101/gr.2554404)

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

BMC Genomics



Research article

Open Access

A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence

Oliver C Jann^{*1}, Jan Aerts¹, Michelle Jones¹, Nicola Hastings¹, Andy Law¹, Stephanie McKay², Elisa Marques², Aparna Prasad², Jody Yu², Stephen S Moore², Sandrine Floriot³, Marie-Françoise Mahé³, André Eggen³, Licia Silveri^{3,4}, Riccardo Negrini⁴, Elisabetta Milanese⁴, Paolo Ajmone-Marsan⁴, Alessio Valentini⁵, Cinzia Marchitelli⁵, Maria C Savarese⁵, Michal Janitz⁶, Ralf Herwig⁶, Steffen Hennig⁷, Chiara Gorni^{4,8}, Erin E Connor⁹, Tad S Sonstegard⁹, Timothy Smith¹⁰, Cord Drögemüller¹¹ and John L Williams^{1,8}

BMC Genomics 2006, **7**:283

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

GENOMICS 16, 466-472 (1993)

Mapping the Sheep Genome: Production of Characterized Sheep × Hamster Cell Hybrids

DEAN J. BURKIN,^{*,†} HELVISE G. MORSE,^{*,†} T. E. BROAD,[‡] P. D. PEARCE,[‡] H. A. ANSARI,[‡]
PAULINE E. LEWIS,[‡] AND CAROL JONES^{*,†,1}

**Eleanor Roosevelt Institute for Cancer Research, 1899 Gaylord Street, Denver, Colorado 80206; †Gene Mapping Unit, AgResearch Grasslands, Box 11008, Palmerston North, New Zealand; and ‡Department of Biochemistry, Biophysics and Genetics, UCHSC, 4200 East 9th Avenue, Denver, Colorado 80220*

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



Ovis aries

→ Modelo medicina humana – estudos de reprodução, doenças cardíacas, hemofilia...

| mapa de sintenia | mapa de ligação | mapa comparativo |
|-------------------------|---|-------------------------|
| Burkin et al., 1993 | Crawford et al., 1995 de Gortari et al., 1998 Maddox et al., 2001 | Cockett et al., 2003 |

status atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica

Copyright © 1995 by the Genetics Society of America

Genetics 140: 703–724 (June, 1995)

An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome

**A. M. Crawford,* K. G. Dodds,[†] A. J. Ede,* C. A. Pierson,* G. W. Montgomery,* H. G. Garmonsway,*
A. E. Beattie,[†] K. Davies,[‡] J. F. Maddox,[‡] S. W. Kappes,[§] R. T. Stone,[§] T. C. Nguyen,** J. M. Penty,*
E. A. Lord,* J. E. Broom,* J. Buitkamp,^{††} W. Schwaiger,^{††} J. T. Epplen,^{††} P. Matthew,[‡]
M. E. Matthews,^{‡‡} D. J. Hulme,^{§§} K. J. Beh,^{§§} R. A. McGraw*** and C. W. Beattie[§]**

**AgResearch Molecular Biology Unit, Department of Biochemistry and Centre for Gene Research, University of Otago, Dunedin, New Zealand, [†]AgResearch Invermay Agricultural Centre, Mosgiel, New Zealand, [‡]Centre for Animal Biotechnology, University of Melbourne, Melbourne, Australia, [§]USDA Meat Animal Research Center, Clay Center, Nebraska 68933-0166, **Laboratoire des Groupes Sanguins, INRA, Jouy en Josas, France, ^{††}Molecular Human Genetics, Ruhr-University, Bochum, Germany, ^{‡‡}Victorian Institute of Animal Science, Melbourne, Australia, ^{§§}CSIRO McMaster Laboratory, Glebe, NSW, Australia and
*** College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, Georgia 30602*

Manuscript received December 28, 1994

Accepted for publication March 6, 1995

~250 marcadores

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



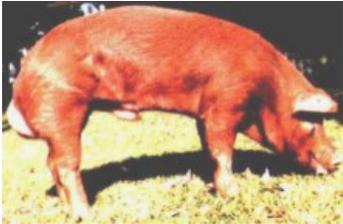
An Enhanced Linkage Map of the Sheep Genome Comprising More Than 1000 Loci

Jillian F. Maddox, Kizanne P. Davies, Allan M. Crawford, Dennis J. Hulme, Daniel Vaiman, Edmond P. Cribiu, Bradley A. Freking, Ken J. Beh, Noelle E. Cockett, Nina Kang, Christopher D. Riffkin, Roger Drinkwater, Stephen S. Moore, Ken G. Dodds, Joanne M. Lumsden, Tracey C. van Stijn, Sin H. Phua, David L. Adelson, Heather R. Burkin, Judith E. Broom, Johannes Buitkamp, Lisa Cambridge, William T. Cushwa, Emily Gerard, Susan M. Galloway, Blair Harrison, Rachel J. Hawken, Stefan Hiendleder, Hannah M. Henry, Juan F. Medrano, Korena A. Paterson, Laurent Schibler, Roger T. Stone and Beryl van Hest

Genome Res. 2001 11: 1275-1289; originally published online Jun 12, 2001;

~1500 marcadores

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



Sus scrofa

→ modelo medicina humana – estudos de obesidade, câncer, transplante órgãos...

| mapa de sintenia | mapa de ligação | mapa RH | mapa comparativo | mapa molecular |
|-------------------------|---|---|--|-------------------------------|
| Andersson et al., 1993 | Archibald et al., 1995 Rohrer et al., 1996 | Yerle et al., 1998 Hawken et al., 1999 | Rink et al., 2002 Tuggle et al., 2003 | previsão de término para 2008 |

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Genome Research, Vol 6, 371-391, Copyright © 1996 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

REVIEW

A comprehensive map of the porcine genome

GA Rohrer, LJ Alexander, Z Hu, TP Smith, JW Keele and CW Beattie

U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Meat Animal Research Center (MARC), Clay Center, Nebraska 68933-0166, USA.

~2700 marcadores

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 10, 824–830 (1999).

**Mammalian
Genome**
Incorporating Mouse Genome
© Springer-Verlag New York Inc. 1999

A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map

Rachel J. Hawken,¹ Jeremy Murtaugh¹, Gail H. Flickinger¹, Martine Yerle², Anne Robic², Denis Milan², Joel Gellin², Craig W. Beattie¹, Lawrence B. Schook¹, Leeson J. Alexander¹

¹Program on Comparative Genomics, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 1365 Gortner Avenue, St. Paul, Minnesota 55108, USA

²INRA, Laboratoire de Genetique Cellulaire, 31326 Castanet-Tolosan, France

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 13, 578–587 (2002).

DOI: 10.1007/s00335-002-2192-5

**Mammalian
Genome**
Incorporating Mouse Genome
© Springer-Verlag New York Inc. 2002

A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome

Anette Rink,¹ Elizabeth M. Santschi,² Katie M. Eyer,¹ Benjamin Roelofs,¹ Markus Hess,¹ Myra Godfrey,¹ Elif K. Karajusuf,¹ Martine Yerle,³ Denis Milan,³ Craig W. Beattie

¹Department of Animal Biotechnology, College of Agriculture, Biotechnology and Natural Resources, University of Nevada, Reno, Nevada 89557, USA

²Department of Surgical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA

³Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Genetique Cellulaire, Castanet-Tolosan, France

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 8, 267–273 (1997).

***Mammalian
Genome***

© Springer-Verlag New York Inc. 1997

Genetical and physical assignments of equine microsatellites—first integration of anchored markers in horse genome mapping

Matthew Breen,^{1,3} Gabriella Lindgren,² Matthew M. Binns,³ Julianne Norman,¹ Zlaka Irvin,¹ Kevin Bell,¹ Kaj Sandberg,² Hans Ellegren²

¹Australian Equine Blood Typing Research Laboratory, University of Queensland, St. Lucia, Brisbane, Queensland, 4072 Australia

²Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 597, S-751 24 Uppsala, Sweden

³Centre for Preventive Medicine, Animal Health Trust, P.O. Box 5, Newmarket, Suffolk CB8 7DW, UK

status atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica

The second generation of the International Equine Gene Mapping Workshop half-sibling linkage map

G. Guérin*, E. Bailey[†], D. Bernoco[‡], I. Anderson[§], D. F. Antczak[¶], K. Bell**, I. Biroš**, G. Bjørnstad****, A. T. Bowling^{††}, R. Brandon**, A. R. Caetano^{††}, G. Cholewinski^{‡‡}, D. Colling^{§§}, M. Eggleston^{††}, N. Ellis^{††††}, J. Flynn^{¶¶}, B. Gralak****, T. Hasegawa^{†††}, M. Ketchum^{‡‡‡}, G. Lindgren, L. A. Lyons^{§§§}, L. V. Millon^{††}, D. Mariat*, J. Murray^{¶¶¶}, A. Neau*, K. Røed****, K. Sandberg, L. C. Skow^{††††}, I. Tammen^{††††}, T. Tozaki^{§§§§}, E. Van Dyk^{¶¶¶¶}, B. Weiss*, A. Young^{§§§} and J. Ziegler*****

*Centre de Recherche de Jouy, Jouy-en-Josas, France, [†]Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, KY, USA, [‡]Stormont Laboratories, Inc., Woodland, CA, USA, [§]Massey University, Palmerston North, New Zealand, [¶]J.A. Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY, USA, **Department Physiology and Pharmacology, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia, ^{††}Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, USA, ^{‡‡}Agricultural University of Poznan, Wolynska, Poznan, Poland, ^{§§}Mann Equitest Inc., Guelph, ON, Canada, ^{¶¶}Weatherby's Ireland Blood Typing Laboratory, Kildare, Ireland, ^{****}Institute of Genetics and Animal Breeding, PAS, Jastrzebiec, Wolka Kosowska, Poland, ^{†††}Japan Racing Association, Tochigi, Japan, ^{††††}Shelterwood Laboratories, Carthage TX, USA, ^{§§§}Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, USA, ^{¶¶¶}Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, USA, ^{****}Department of Morphology, Genetics and Aquatic Biology, Norwegian School of Veterinary Medicine, Oslo, Norway, ^{††††}Department of Veterinary Anatomy and Public Health, School of Veterinary Medicine, Texas A & M University, College Station, TX, USA, ^{††††}University of Sydney, Faculty of Veterinary Science, Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction-ReproGen, Camden, Australia, ^{§§§§}Department of Molecular Genetics, Laboratory of Racing Chemistry, Tochigi, Japan, ^{¶¶¶¶}University of Pretoria, Onderstepoort, Republic of South Africa and ^{*****}Applied Biosystems Division of Perkin Elmer, Foster City, CA, USA

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



The First-Generation Whole-Genome Radiation Hybrid Map in the Horse Identifies Conserved Segments in Human and Mouse Genomes

Bhanu P. Chowdhary, Terje Raudsepp, Srinivas R. Kata, Glenda Goh, Lee V. Millon, Veronica Allan, François Piumi, Gérard Guérin, June Swinburne, Matthew Binns, Teri L. Lear, Jim Mickelson, James Murray, Douglas F. Antczak, James E. Womack and Loren C. Skow

Genome Res. 2003 13: 742-751

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



Equus caballus

→ Melhoramento saúde, reprodução, resistência a doenças

| mapa de sintenia | mapa de ligação | mapa RH | mapa comparativo | mapa molecular |
|---|--|------------------------|---|----------------------------|
| Bailey et al., 1995 Breen et al., 1997 Shiue et al., 1999 | Lindgren et al., 1998 Guérin et al., 1999, 2003 Swinburne et al., 2000 | Chowdhary et al., 2003 | Caetano et al., 1999 Milenkovic et al., 2002 | primeira versão disponível |

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 13, 524–534 (2002).
DOI: 10.1007/s00335-001-2137-4

**Mammalian
Genome**
Incorporating Mouse Genome
© Springer-Verlag New York Inc. 2002

Cytogenetic localization of 136 genes in the horse: comparative mapping with the human genome

Dragan Milenkovic,¹ Anne Oustry-Vaiman,¹ Teri L. Lear,² Alain Billault,³ Denis Mariat,¹ François Piumi,⁴ Laurent Schibler,¹ Edmond Cribiu,¹ Gérard Guérin¹

¹Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Jouy, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Département de Génétique animale, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

²M.H. Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, KY 40546-0099, USA

³Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier, 75011 Paris, France

⁴Laboratoire mixte INRA-CEA de Radiobiologie et d'Etude du Génome, UMR 13.314, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Mammalian Genome 7, 831–834 (1996).

***Mammalian
Genome***

© Springer-Verlag New York Inc. 1996

Synten mapping in river buffalo

S.M. El Nahas,¹ H.A. Oraby,¹ H.A. de Hondt,¹ A.M. Medhat,² M.M. Zahran,¹ E.R. Mahfouz,¹ A.M. Karim²

¹Department of Cell Biology, National Research Center, Dokki, Cairo, Egypt

²Biochemistry Department, Faculty of Science, Ain Shams University, Cairo Egypt

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



Bubalus bubalis

| mapa de sintenia | mapa citogenético | mapa RH |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| El Nahas et al., 1996 | Iannuzzi et al., 2003 | Amaral et al., 2007 |

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

Cytogenet Genome Res 102:65–75 (2003)
DOI: 10.1159/000075727

Cytogenetic and
Genome Research

The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding

L. Iannuzzi,^a G.P. Di Meo,^a A. Perucatti,^a L. Schibler,^b D. Incarnato,^a D. Gallagher,^c A. Eggen,^b L. Ferretti,^d E.P. Crihiu^b and J. Womack^c

^aNational Research Council (CNR), ISPAAM, Laboratory of Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Naples (Italy);

^bINRA, Department of Animal Genetics, Laboratory of Biochemical Genetics and Cytogenetics, Jouy-en-Josas (France);

^cDepartment of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX (USA);

^dDepartment of Genetics and Microbiology, University of Pavia, Pavia (Italy)

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**



Bubalus bubalis

| mapa de sintenia | mapa citogenético | mapa RH |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| El Nahas et al., 1996 | Iannuzzi et al., 2003 | Amaral et al., 2007 |

***status* atual do mapeamento dos genomas das principais espécies de importância econômica**

2007 International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 38, 311–314

Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10

M. E. J. Amaral^{*}, K. E. Owens[†], J. S. Elliott[†], C. Fickey[†], A. A. Schäffer[‡], R. Agarwala[‡] and J. E. Womack[†]

^{*}Department Biologia, IBILCE, Unesp – São Paulo State University, São Jose Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. [†]Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. [‡]Department of Health and Human Services, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique de Jouy-en-Josas

Mapping the Bovine Genome

[Entry of the Bovmap database - click here](#)



WELCOME
TO THE
BOVMAP
DATABASE !

[Cattle and cattle on human chromosomes physical mapping](#)

[Mendelian inheritance in cattle](#)

[CHROMOSOME HOMOLOGY](#)

[INRA's report about bovine's Bulldog genetic disease - 14 Feb 2000 - A. Eggen and D. Boichard](#)



Endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9940&chr=19>

[Map Viewer Home](#)

[Map Viewer Help](#)
[Sheep Maps Help](#)
[Data As Table View](#)

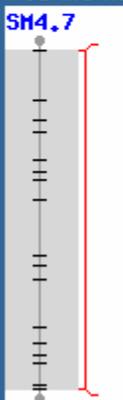
Maps & Options

Compress Map

Region Shown:



You are here:



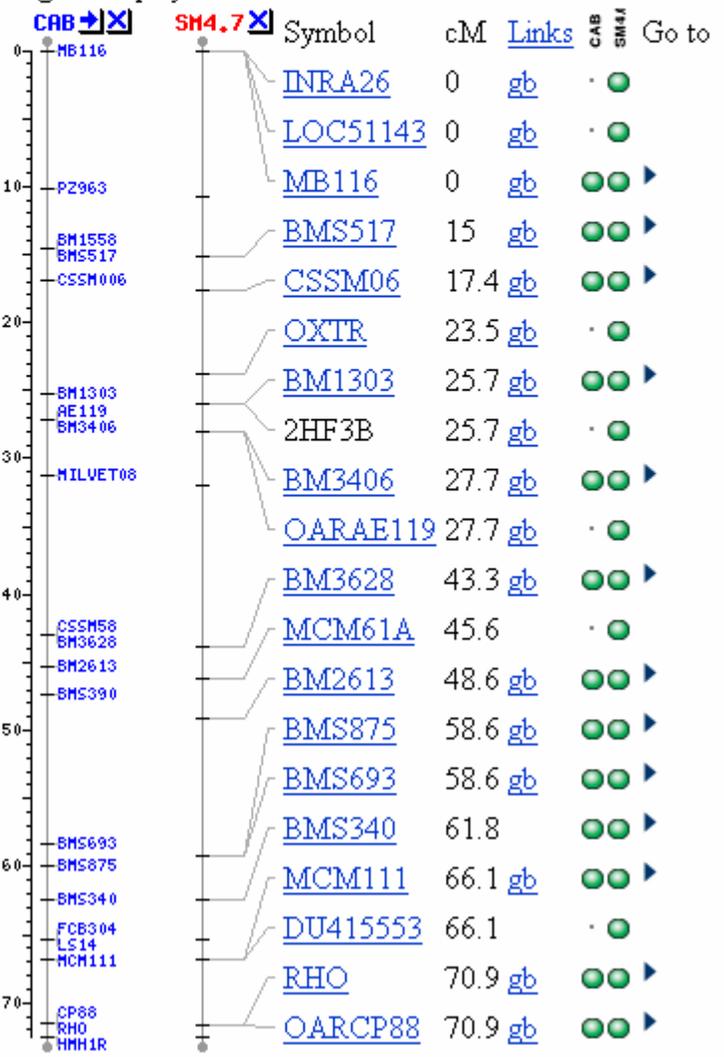
Chromosome: [1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) [12](#) [13](#) [14](#) [15](#) [16](#) [17](#) [18](#) [[19](#)] [20](#) [21](#) [22](#) [23](#) [24](#) [25](#) [26](#) [X](#) [Y](#) [MT](#)

Master Map: SheepMap v4.7 Linkage

[Summary of Maps](#)

Maps & O

Region Displayed: 0.00-71.80 cM



NAGRP Pig Genome Coordination Program

[Updates](#)
[Activities](#)
[Resources](#)
[Databases](#)
[Community](#)
[Education](#)

Structure and Updates

- [Coordinator's Annual Updates](#)
2004 | 2005 | 2006 | 2007 **NEW** 
- [Pig Genome Bi-monthly Newsletters](#)
78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 **NEW**
- [NRSP-8 Reports: 2004 | 2005 | 2006 | 2007](#) **NEW**

Activities and Discussions

- [ANGENMAP Discussion Group](#)
- [Members of ANGENMAP Community](#)
- [Swine Genome Sequencing:](#)
[News & Updates](#) ✓
- [Upcoming Meetings](#) **UPDATED** 

U.S. Pig Gene Mapping Coordination Program Shared Resources

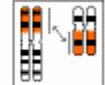
- [Pig Microarray](#) **NEW**
- [Fluorescent Primers](#)
- [Primers and Probes](#)
- [Differential Display Primers](#)
- [Bioinformatics software](#)
- [NAGRP Blast Server](#)
- [Crittenden Genomics References](#)
- [Genome Research Information Links](#)

Databases

- [Pig FPC to Genome View](#) (pre)
- [The ArkDB](#) | [The USDA MARC Database](#)
- [PigESTdb](#) | [PigQTLdb](#) ✓ | [SNPdb](#)
- [Blast pig sequences - NCBI](#) 
- [Gene Indices \(SsGI\)](#) | [Patents](#) | [PigGO](#)
- [OMIA](#) | [OMIM](#) | [HGMD](#) | [HGVbase](#)
- [Catalog of porcine reproduction genes](#)

Gene Maps

Linkage Maps

- [The Arkdb PIGMAP Viewer](#)
- [The USDA MARC Map](#) (NCBI | MARC)
- [RH Maps](#) (INRA-UMN | UNR | UIUC) 

Physical Maps

- [Sanger WebChrom: porcine physical map](#) **NEW**
- [The Comparative Map: Pigs and Humans](#)

Swine Genetics Community Links

- [Agriculture genome community](#)
- [Pig genome research community](#)
- [Guide to Livestock Genetic Tests](#)
- [Animal Genome Resource in Other Species](#) 

Genes, QTL, Genome and Applications

- [Genes](#) | [Gene Mapping](#) **NEW**
- [A Primer on Molecular Genetics](#)
- [QTL and Marker Assisted Selection](#)
- [Short Courses](#) (Schedule and Online Materials) 






Agradecimentos
Profa Dra M. Elisabete J. Amaral

Contato
melissamiziara@yahoo.com.br

Laboratório de Genômica Comparativa

Departamento de Biologia
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE
UNESP São José do Rio Preto
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth – CEP 15054-000

Métodos de análise de QTLs

Henrique Nunes de Oliveira

FMVZ-Unesp/Botucatu

Situação do Melhoramento Animal

- Avanços nos últimos 50 anos
- Modelos Simples
- Muitos genes
- Efeitos aditivos

Melhoramento Genético

- Identificação das características
- Efeitos ambientes e genéticos
- Modelos
- Algoritmos e Softwares
- Aplicação na seleção
- Estratégias de acasalamento

Incorporação Tecnologias

- Inseminação Artificial
- Transferência de Embriões
- Fecundação in Vitro

Novas Biotecnologias

■ QTLs

- Aumento da Acurácia em características tradicionais (Leite, crescimento).
- Genes diretamente responsáveis pela maior parte da variação em características de importância (calpastatina).

O que é um QTL?

**Localização hipotética de um gene
que afeta uma característica que
é medida em uma escala
quantitativa.**

O que queremos?

- Mapear o QTL
- Identificar os genes envolvidos na expressão das características quantitativas
- Entender seu funcionamento

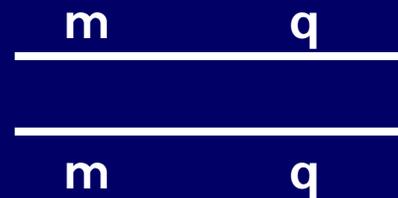
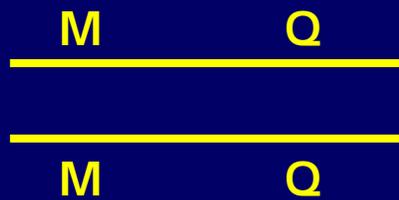
Como faremos?

- Usando Marcadores Moleculares!
 - (RAPDs, RFLPs, Microsatelites, etc)
- Busca-se associação entre os marcadores e o fenótipo do animal para a característica quantitativa.

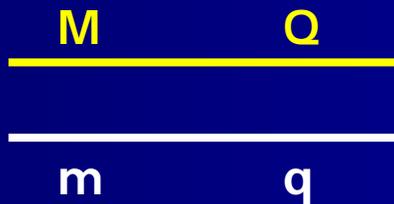
Em que se baseia?

- Ligação Gênica ("Linkage")
- Marcadores ligados aos QTLs

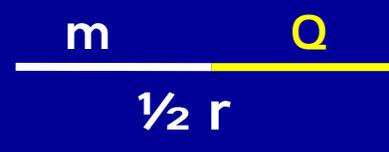
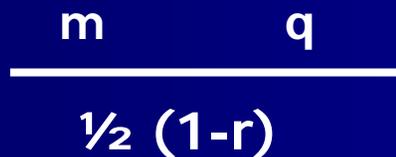
P



F1



Gametas



Parentais

Recombinantes

Ligação Gênica

| | Pais | MMQQ | x | mmqq |
|----------------------------------|--------------|-------------|-----------|---------------------|
| | F1 | MmQq (100%) | | |
| | F1 - Gametas | MQ | Mq | mQ mq |
| M e Q Não Ligados ($r=0,5$) | Freq(%) | 25 | 25 | 25 25 |
| M e Q Ligados ($r=0,15$) | Freq(%) | 35 | 15 | 15 35 |
| M e Q Muito Ligados ($r=0,02$) | Freq(%) | 48 | 2 | 2 48 |

Ligação Gênica

| Geração | MQ | mQ | Mq | mq |
|---------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0,3750 | 0,1250 | 0,1250 | 0,3750 |
| 2 | 0,3125 | 0,1875 | 0,1875 | 0,3125 |
| 3 | 0,2813 | 0,2188 | 0,2188 | 0,2813 |
| 4 | 0,2657 | 0,2344 | 0,2344 | 0,2657 |
| 10 | 0,2502 | 0,2498 | 0,2498 | 0,2502 |
| 15 | 0,2501 | 0,2499 | 0,2499 | 0,2501 |
| 20 | 0,2500 | 0,2500 | 0,2500 | 0,2500 |

Ligação Gênica

Se $r < 0,5$ então:

$$f(MQ) f(mq) \ll f(Mq) f(mQ)$$

(desequilíbrio de ligação)

Ligação Gênica

Se $r = 0,5$, ou se a população estiver em equilíbrio então:

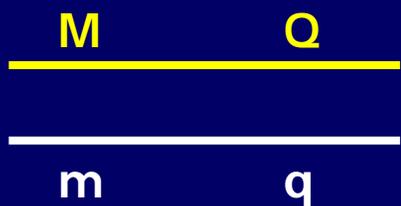
$$f(MQ) f(mq) = f(Mq) f(mQ)$$

$$P(Q|M) = P(Q|m)$$

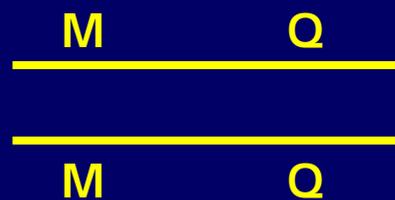
Populações Experimentais

- Cruzamentos de linhagens endogâmicas (raças puras)
- Retro Cruzamentos (F1 x P)
- F2 (F1 X F1)
- outras

RC

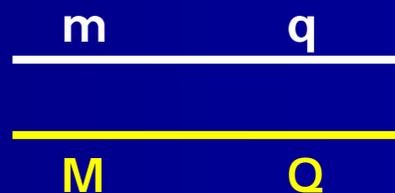
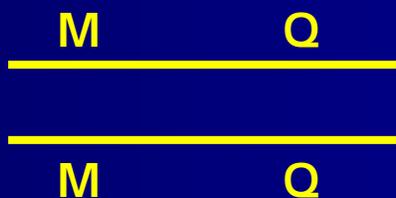


X



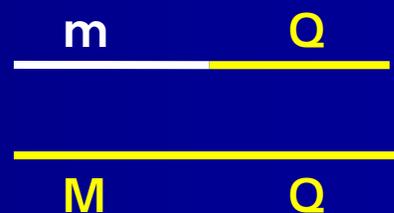
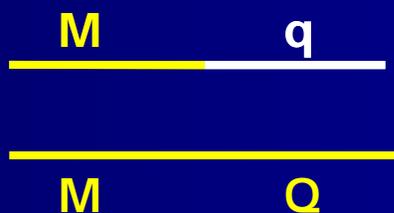
Genótipos
Parentais

(1-r)



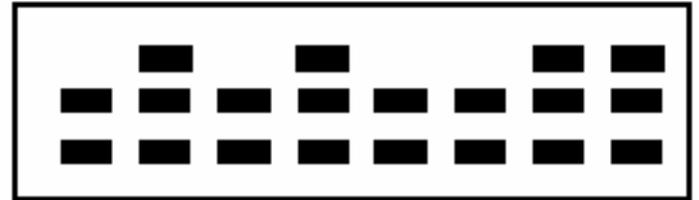
Genótipos
Recombinantes

(r)

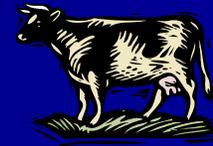


Retro Cruzamientos

MM Mm MM Mm MMMMm Mm



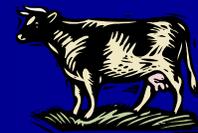
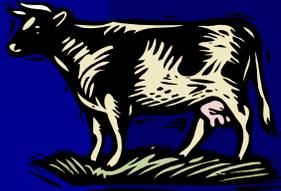
?



MM

>

Mm



Análise Estatística

- Existe alguma associação entre o marcador e o fenótipo do animal ?
- Teste por Anova
- Diferença entre as médias = Efeito estimado do QTL

Diferença entre as Médias

μ_{QQ} = média dos animais QQ

μ_{Qq} = média dos animais Qq

$$\Delta = \mu_{Qq} - \mu_{QQ}$$

$$\mu_{MM} = (1 - r)\mu_{QQ} + r\mu_{Qq} = \mu_{QQ} + r\Delta$$

$$\mu_{Mm} = (1 - r)\mu_{Qq} + r\mu_{QQ} = \mu_{Qq} - r\Delta$$

$$\mu_{Mm} - \mu_{MM} = (\mu_{Qq} - r\Delta) - (\mu_{QQ} + r\Delta)$$

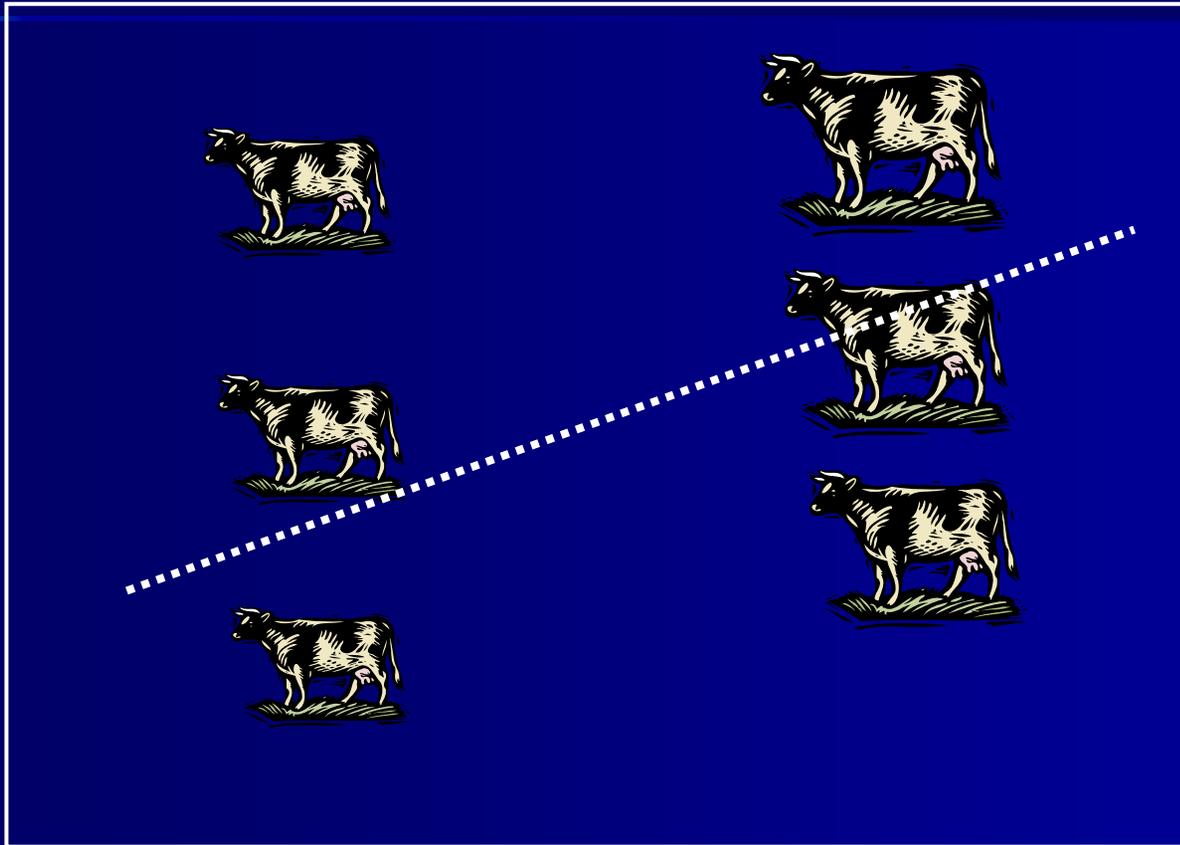
$$\mu_{Mm} - \mu_{MM} = \Delta(1 - 2r)$$

Regressão Linear

- Regressão do fenótipo nos códigos dos marcadores (0,1)
- Significância \Rightarrow ligação com o QTL
- Coeficiente de regressão = efeito do QTL

Regressão

Y



$mm=0$

$Mm=1$

Limitações

- Recombinação
- Variância dentro de cada classe
- Custo da genotipagem

Mapeamento por Intervalo

- Maneira mais comum de se fazer análise de experimentos de QTL.
- Utiliza-se vários marcadores com distancia de aproximadamente 10 a 20 cM
- Busca-se a posição mais provável do QTL entre os marcadores.

Mapeamento por Intervalo

- Para cada posição entre os marcadores é obtida Valor da Função de Verossimilhança.
- Função de Verossimilhança
 - Probabilidade de que exista um QTL com efeito estimado naquela posição.
 - Maior Valor da Função de Verossimilhança => Maior probabilidade de que o efeito o QTL esteja naquela posição

Máxima Verossimilhança

- Urna com bolas pretas e brancas
- Proporção de pretas ? $1/3$; $1/2$; $2/3$
- Amostra: 

- $P(1/3) = 1/3 * 1/3 * 1/3 * 2/3 * 2/3 = 0,017$

- $P(1/2) = 1/2 * 1/2 * 1/2 * 1/2 * 1/2 = 0,031$

- $P(2/3) = 2/3 * 2/3 * 2/3 * 1/3 * 1/3 = 0,032$

Mapeamento por Intervalo

- Exemplo:

- Dois marcadores a 20 cM entre eles
- L obtida para cada posição (0,5 ou 1 cM entre os Marcadores)

Mapeamento por Intervalo

LL

0



RR

20



Mapeamento por Intervalo

$$\frac{P(Q | LLRR) - P(Q | LLRR)}{P(LLRR)}$$
$$\left(\frac{1(1-r_L)(1-r_R)}{2(1-r)} \right) - \left(\frac{r_L r_R}{(1-r)} \right)$$

$$P(Q | LLRR) = \frac{P(Q \cap LLRR)}{P(LLRR)} =$$
$$= \left(\frac{1(1-r_L)(1-r_R)}{2(1-r)} \right) = \left(1 - \frac{r_L r_R}{(1-r)} \right)$$

Mapeamento por Intervalo

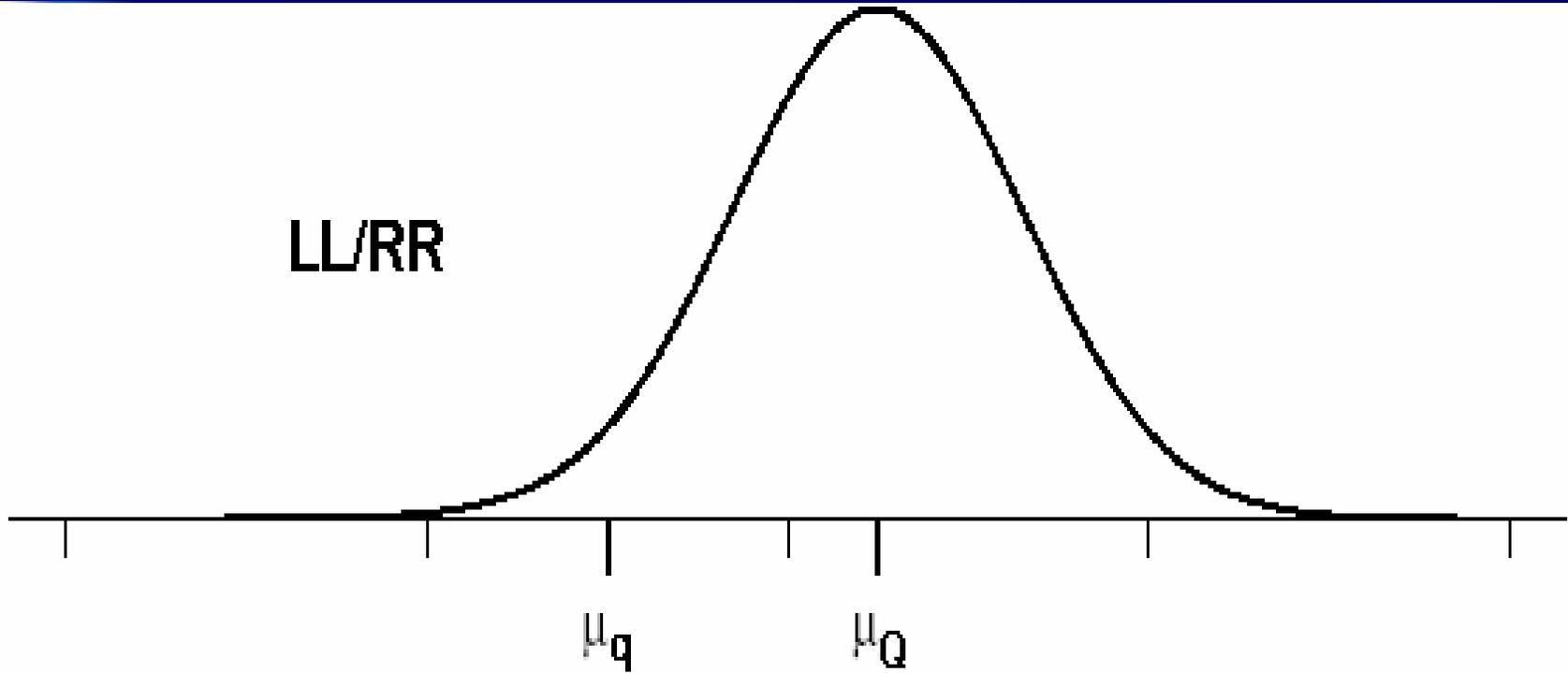
| Genótipo do Marcador | P(Q M) |
|----------------------|--|
| LL RR | $\left(1 - \frac{r_R r_L}{1-r}\right)$ |
| LL Rr | $\left(\frac{r_L - r_R r_L}{r}\right)$ |
| Ll RR | $\left(\frac{r_R - r_R r_L}{r}\right)$ |
| Ll Rr | $\left(\frac{r_R r_L}{1-r}\right)$ |

Mapeamento por Intervalo

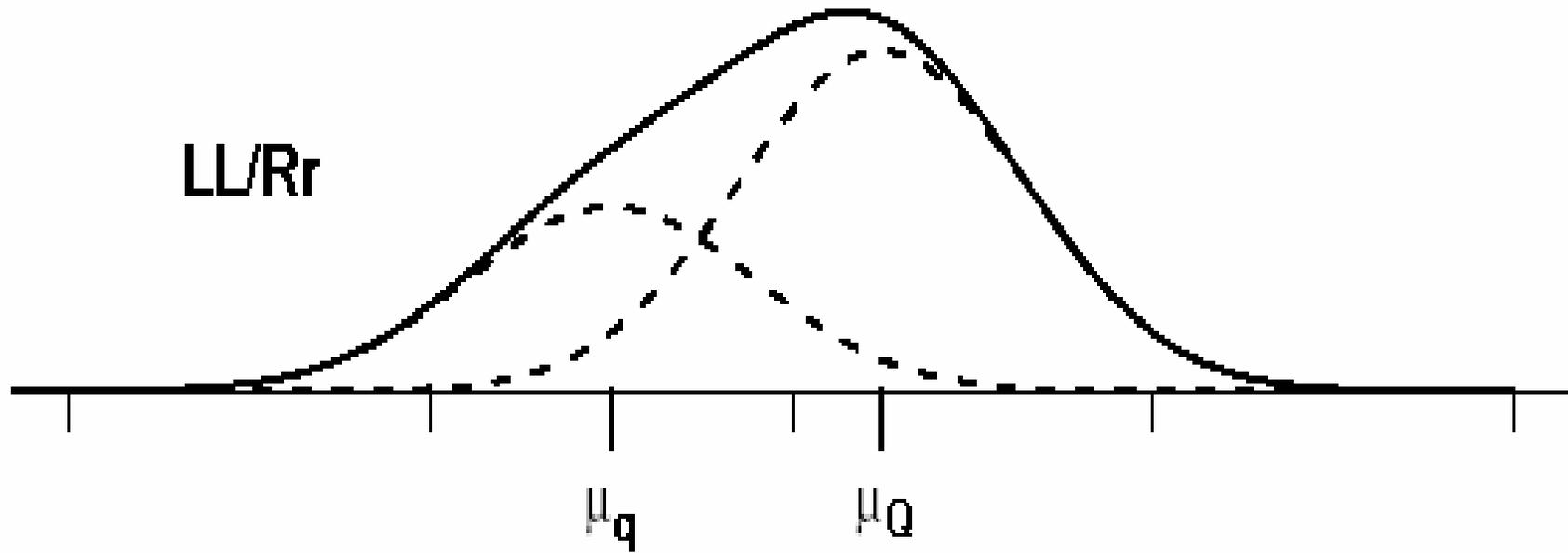
- QTL a 7 cM de L.

| Marcador | | P(QTL M) | |
|----------|-----|----------|-----|
| Esq | Dir | QQ | Qm |
| LL | RR | 99% | 1% |
| LI | RR | 65% | 35% |
| LL | Rr | 35% | 65% |
| LI | Rr | 1% | 99% |

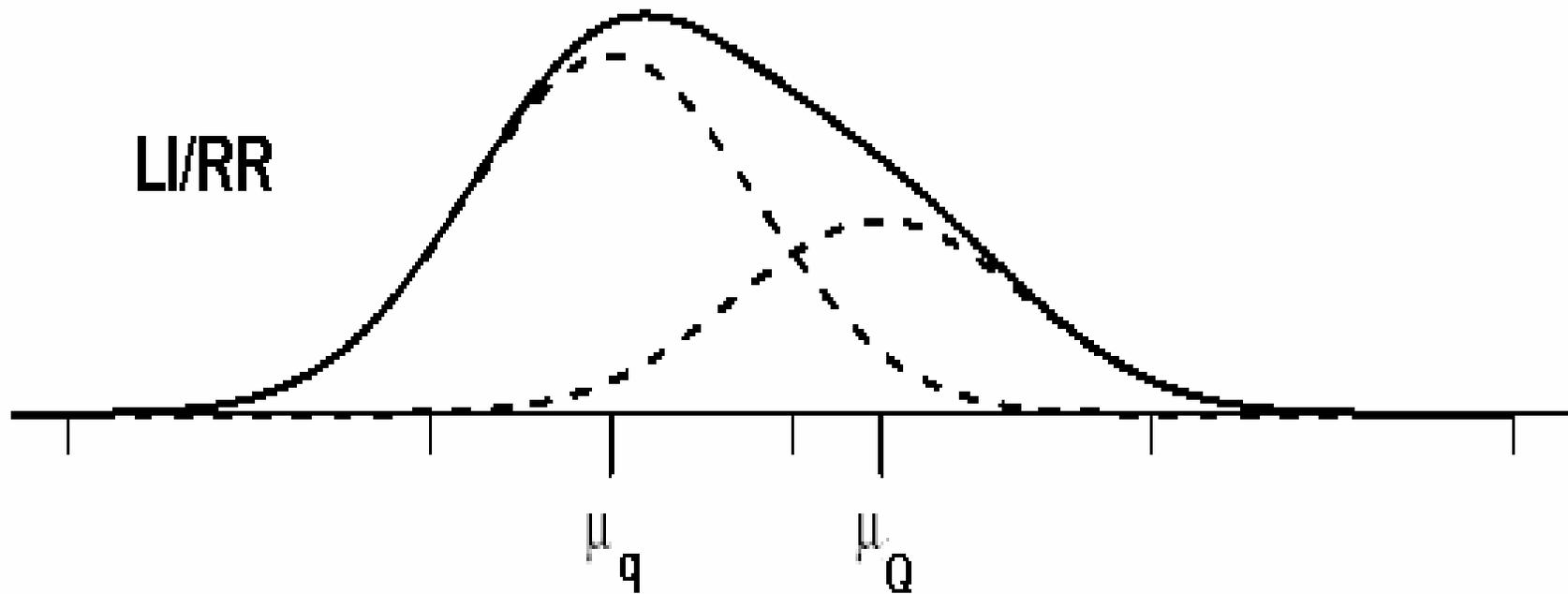
Mapeamento por Intervalo



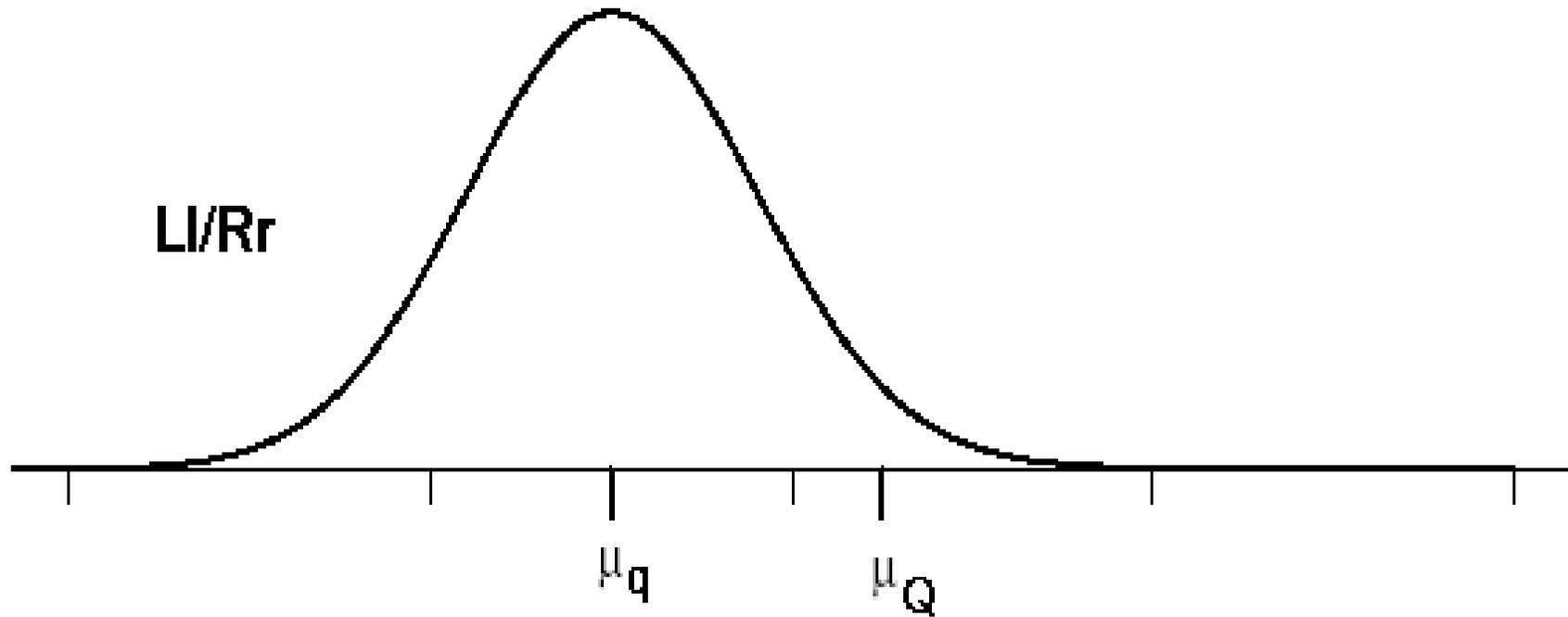
Mapeamento por Intervalo



Mapeamento por Intervalo



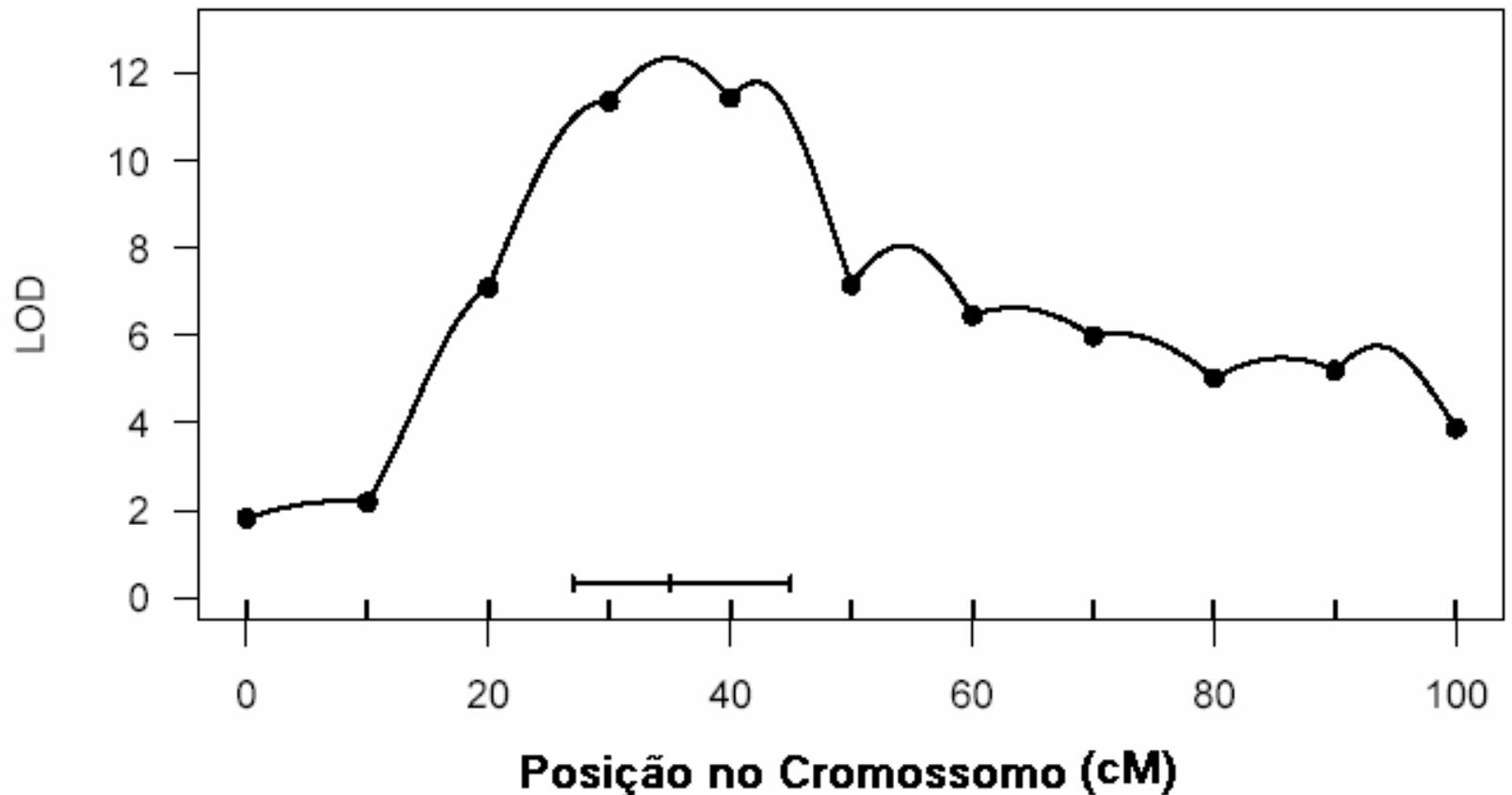
Mapeamento por Intervalo



Mapeamento por Intervalo

| Posição (cM) | L |
|--------------|----|
| 1 | X1 |
| 2 | X2 |
| . | . |
| . | . |
| n | Xn |

Mapeamento por Intervalo



Mapeamento por Intervalo

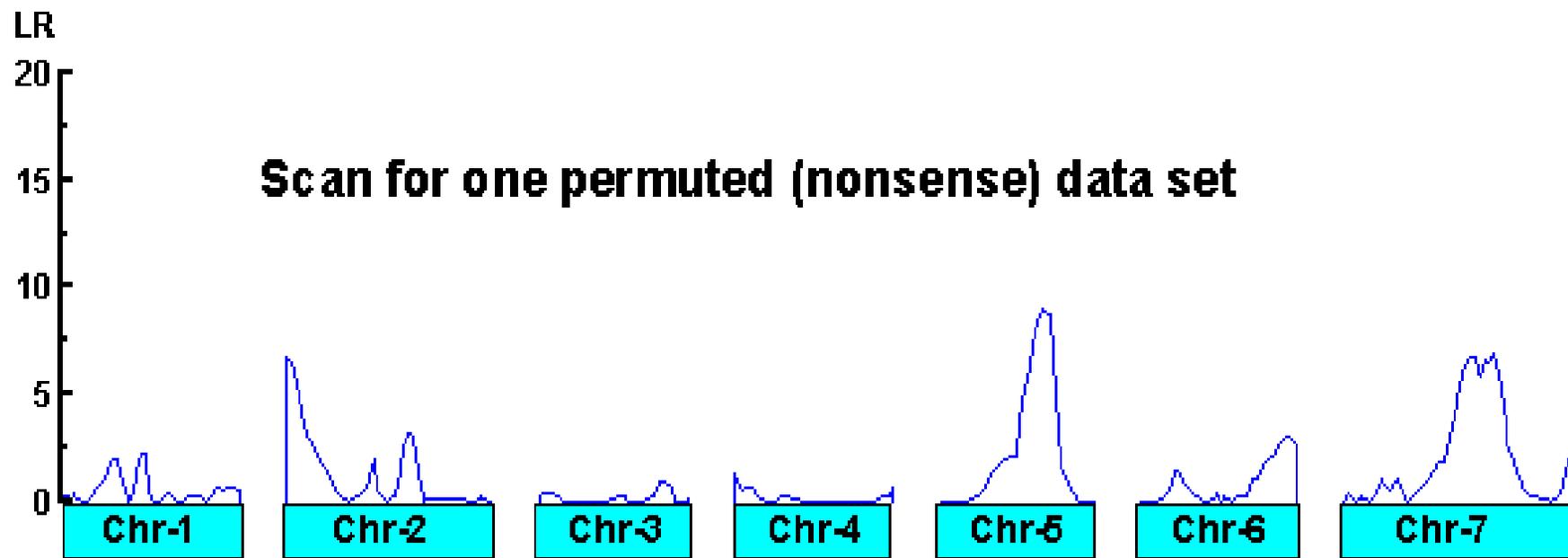
- LOD “Likelihood of Odds Favoring Linkage”
- Log da:

$$\frac{\text{Verossimilhança supondo-se QTL}}{\text{Verossimilhança sem QTL}}$$

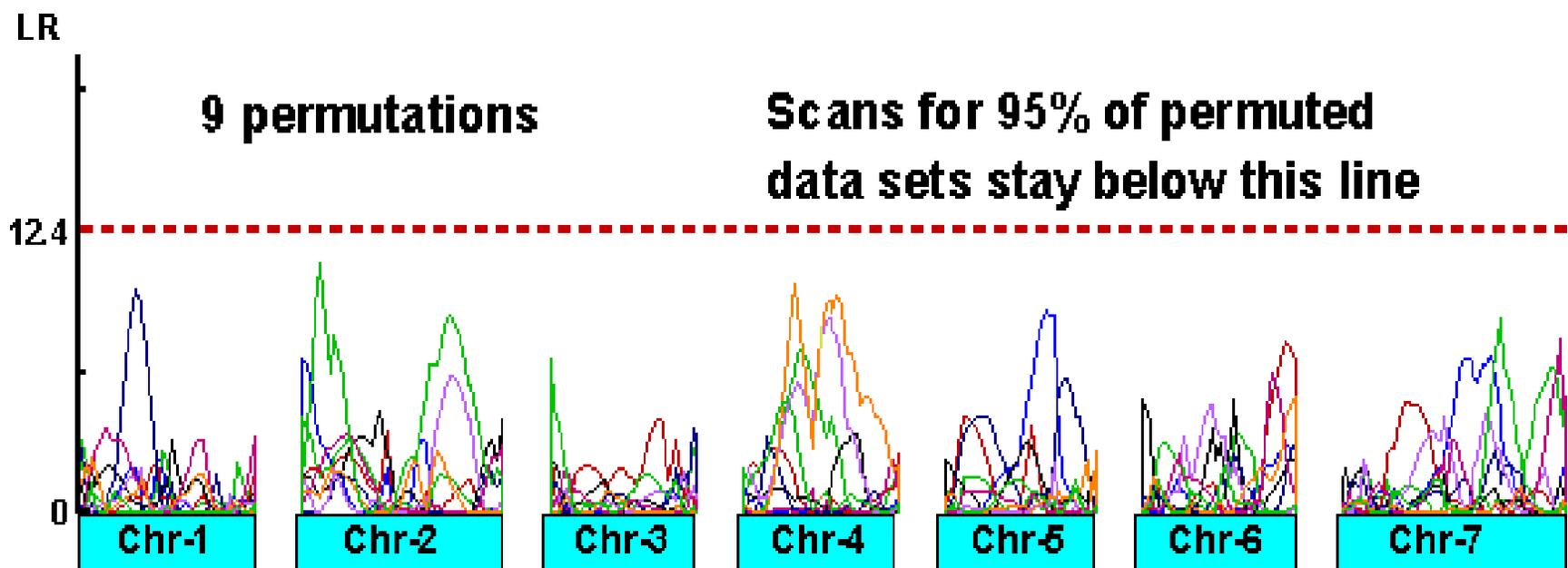
Mapeamento por Intervalo

- Significância Estatística
 - Probabilidade de encontrar, ao acaso, um Lod score maior que o encontrado em uma população sem QTL
- Teste de Permutação

Mapeamento por Intervalo



Mapeamento por Intervalo



Aproximação por regressão

- $X = P(Q | \text{Marcadores})$
- Regressão do fenótipo em Q
- $Y = a + bx$
- $SQT = \sum (y - \hat{a})^2$
- $SQR = SQT - \sum (y - \hat{a} - bx)^2$

Aproximação por regressão

- Modelo sem QTL
- $Y = a + e$
- $SQR = \Sigma(y - \hat{a})^2$

Aproximação por regressão

$$LOD \cong \log_{10} \left(\frac{\sum (y - \hat{a} - \hat{b}x)^2}{\sum (y - \hat{a})^2} \right)$$

$$LOD \cong \log_{10} \left(\frac{SSR(\text{Com QTL})}{SSR(\text{Sem QTL})} \right)$$

Delineamentos para “populações sem endogamia”

- Populações em Equilíbrio de Ligação
 - Informação do marcador não traz informação sobre o QTL
- Pais são geneticamente variáveis
- Animais estão em fases diferentes
- Delineamento em grupos de família
- Nem todos os indivíduos são informativos

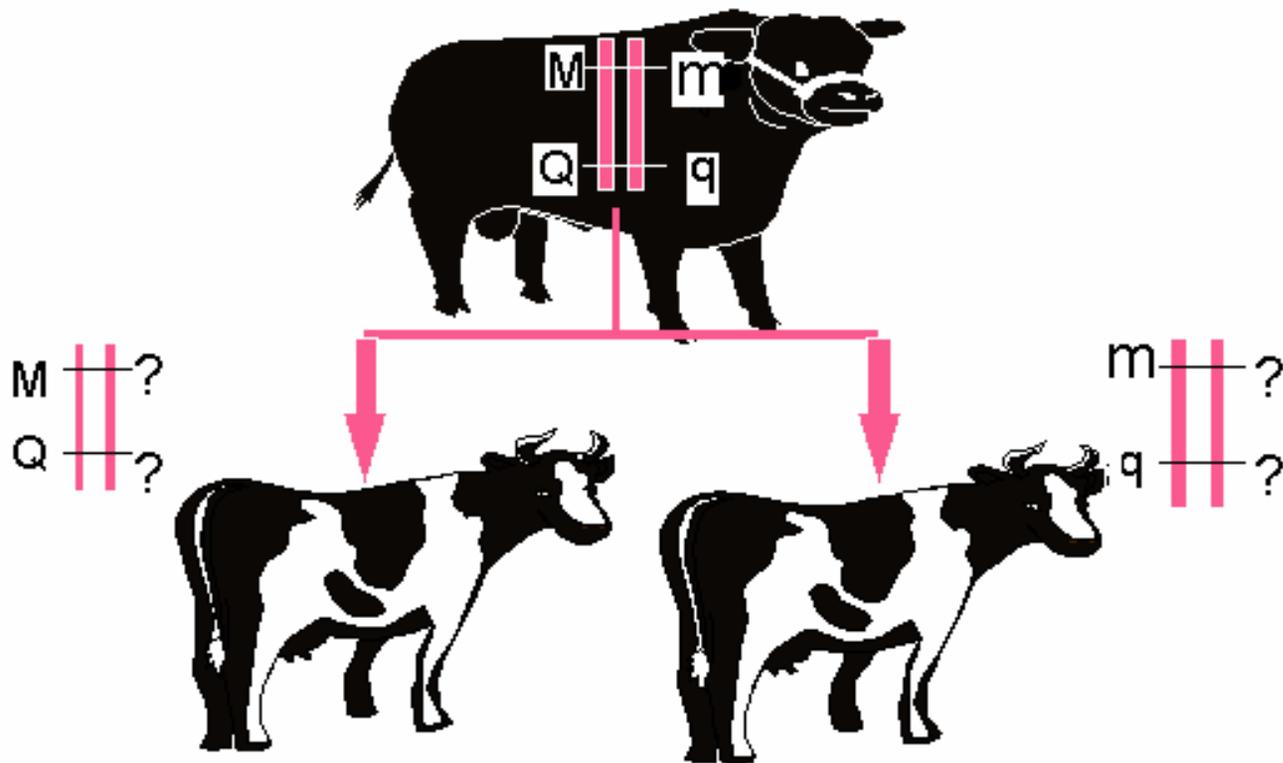
Delineamentos para “populações sem endogamia”

- Meio Irmãos
 - (delineamento de filhas)
- Irmãos Completos

- Famílias de 3 gerações
 - (Delineamento de netas)

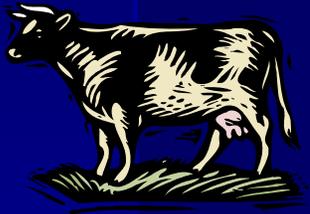
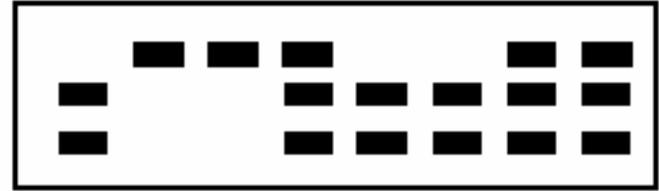
Delineamentos para populações sem endogamia

Delineamento de Filhas (meio-irmãos)

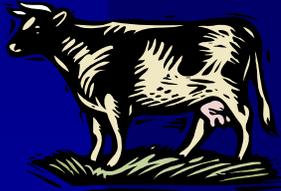


Meio irmãs

MM mm mmMm MMMMMm Mm



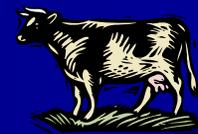
?



M?

>

m?

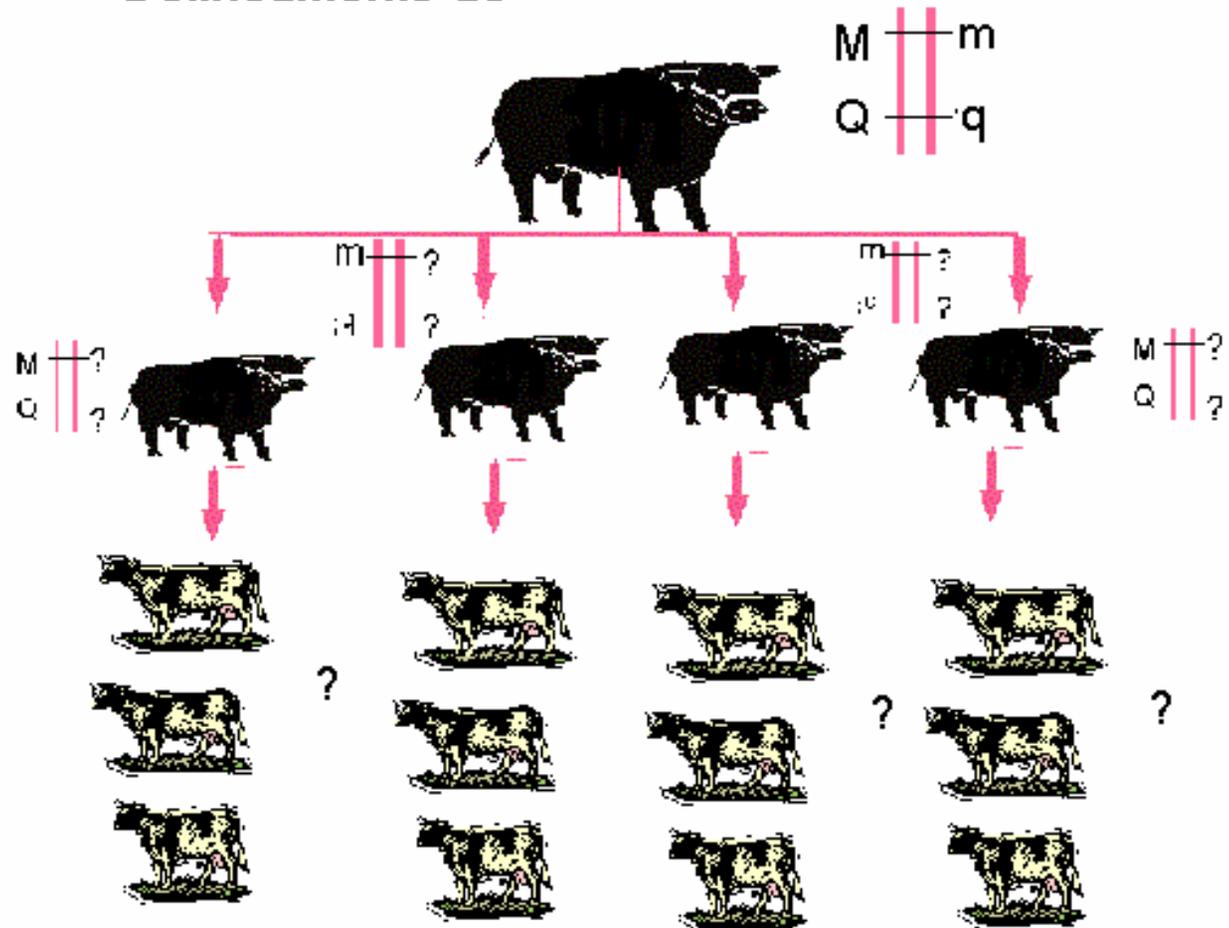


Análise Estatística

- Para um pai e um marcador apenas:
 - Existe alguma associação entre o alelo recebido do pai e o fenótipo do animal ?
 - Teste por Anova
 - Diferença entre as médias = Efeito médio da substituição gênica.

Delimitações para populações sem endogamia

Delimitamento de Netas



Obrigado



Marcadores Moleculares para Calidad de Carne

Med. Vet. Liliana A. Soria, MSc
Genética. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires

ATRIBUTOS QUE DETERMINAN LA CALIDAD DE LA CARNE

- Sabor
- Color
- Jugosidad
- TERNEZA

TERNEZA

¿Por qué es importante considerar la terneza de la carne?

1. Los consumidores tienen una muy buena percepción de las diferencias en terneza (Miller, 1992)
2. Los consumidores están dispuestos a pagar un mayor precio por los cortes más tiernos (Boleman *et al*, 1997)
3. La alta palatabilidad del lomo (*Psoas mayor*) se debe a su mayor terneza y no a su jugosidad y sabor (Shackelford *et al*, 1995)

FACTORES QUE DETERMINAN LA TERNEZA

1. GENÉTICOS:

Entre razas y cruzas varía:

La estructura del músculo

La magnitud de los cambios postmortem del músculo

2. AMBIENTALES:

Sexo

Edad

Sistema de engorde

Manejo pre y postfaena

MÉTODOS PARA ESTIMAR LA TERNEZA

Método OBJETIVO



Resistencia al Corte (RC)
Warner Bratzler Shear Force (WBSF)

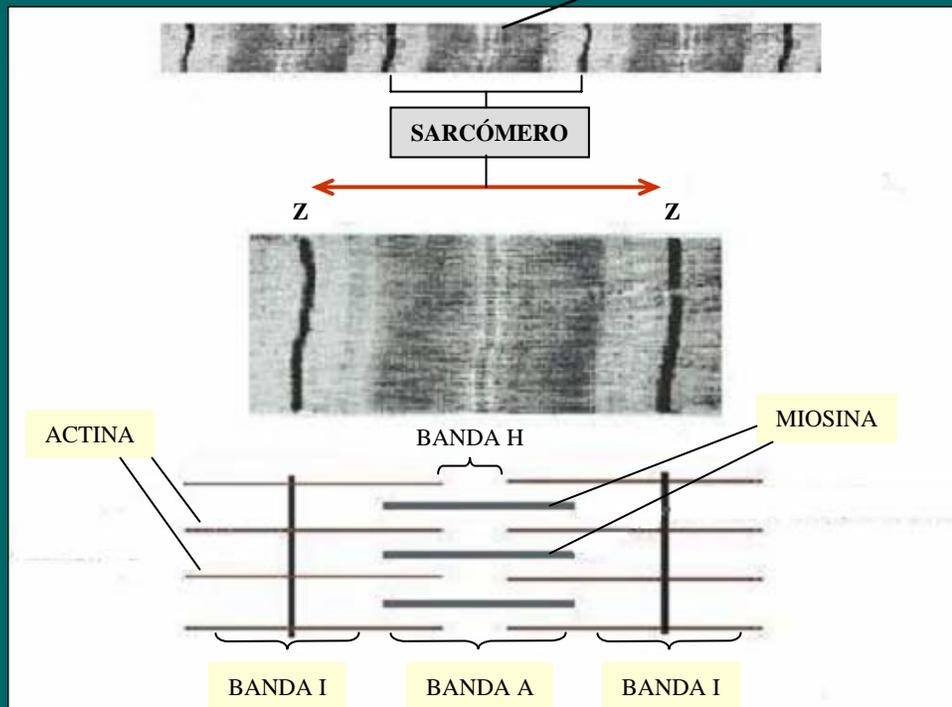
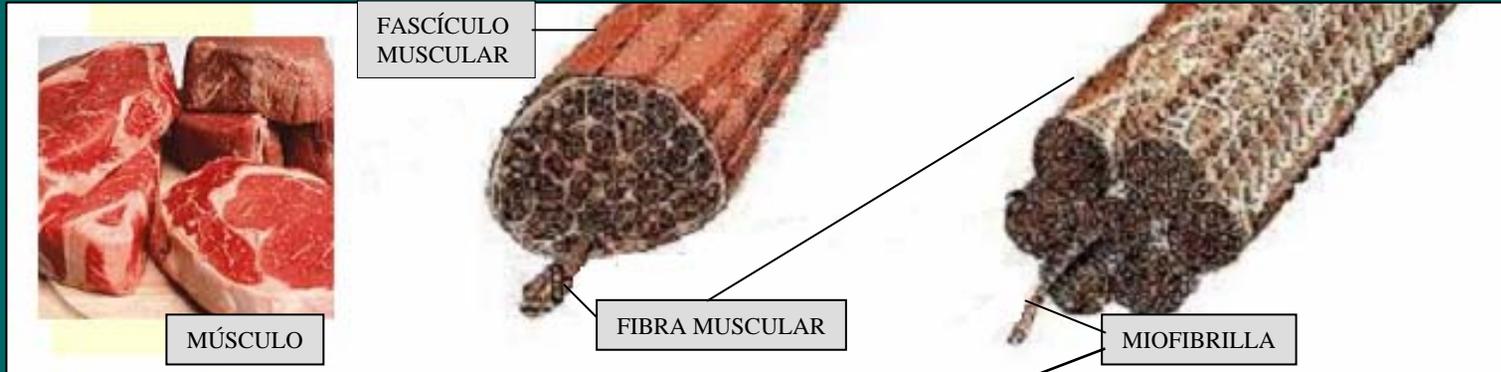
Método SUBJETIVO



Panel de degustadores



ESTRUCTURA DEL MÚSCULO



CAMBIOS POSTMORTEM DEL MÚSCULO (MADURACIÓN)

Modificación de las reacciones metabólicas
(15-36 hs)

- Carencia de O₂
- ↑ Ac. Láctico
- ↓ pH de 7 a 5,6

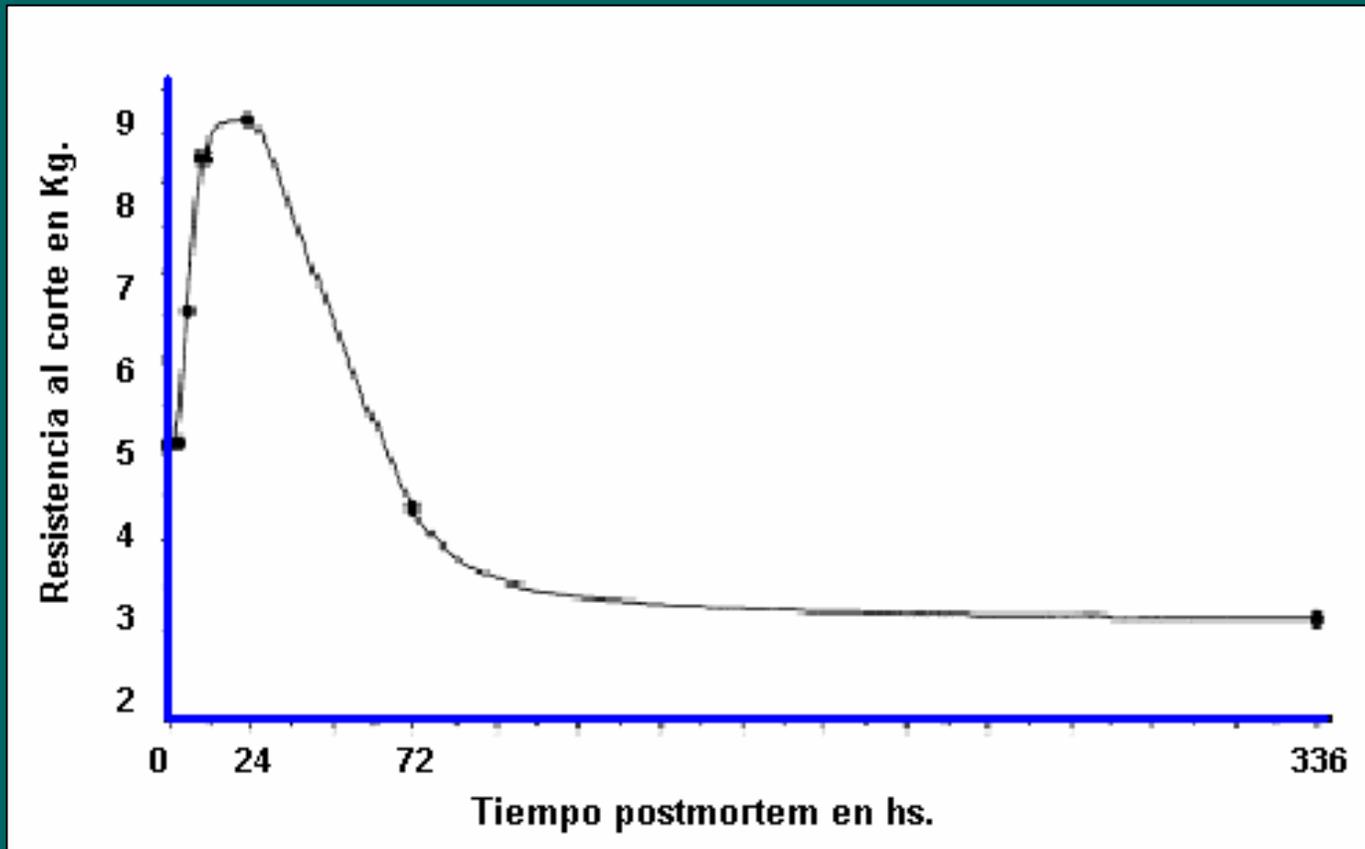
Cambios físicos y químicos
(12-24 hs)

- ↓ síntesis de ATP
- Aparición del rigor mortis

Activación enzimática
(12 hs en adelante)

- ↓ pH y ↑ de Ca²⁺ intracelular
- Activación del sistema proteolítico de las calpaínas

Cambios de la RESISTENCIA AL CORTE durante el período de maduración



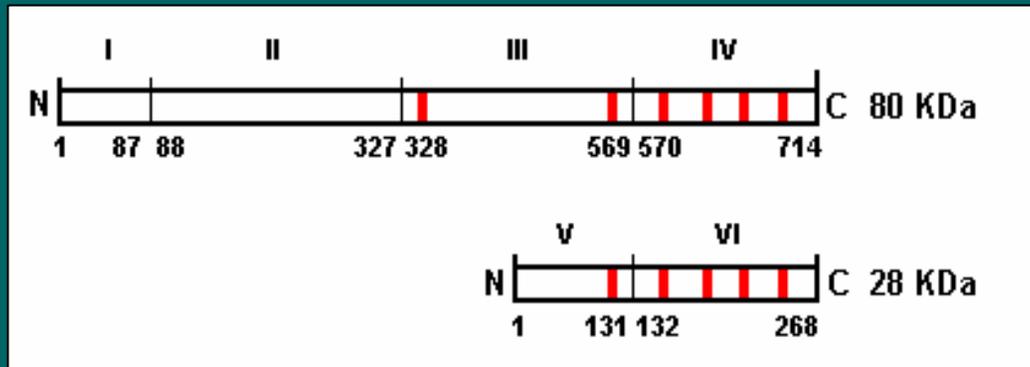
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

El sistema de enzimas dependientes de Ca^{2+} es el más importante

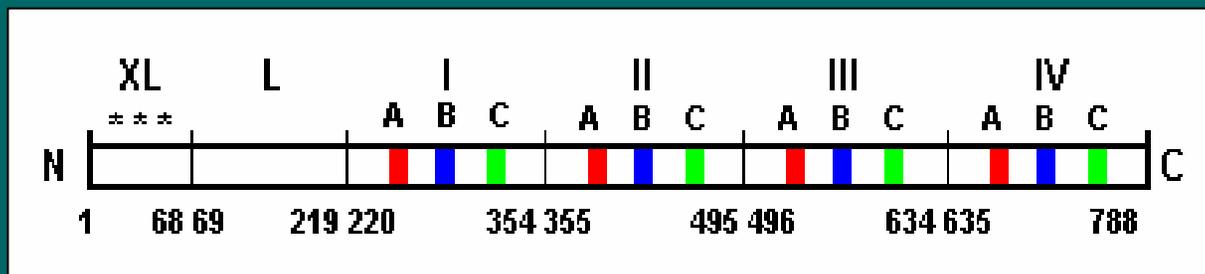
Está integrado por:

- ✓ Dos Calpaínas (μ -Calpaína y m-Calpaína)
- ✓ Un inhibidor de las calpaínas: la Calpastatina

μ -calpaína

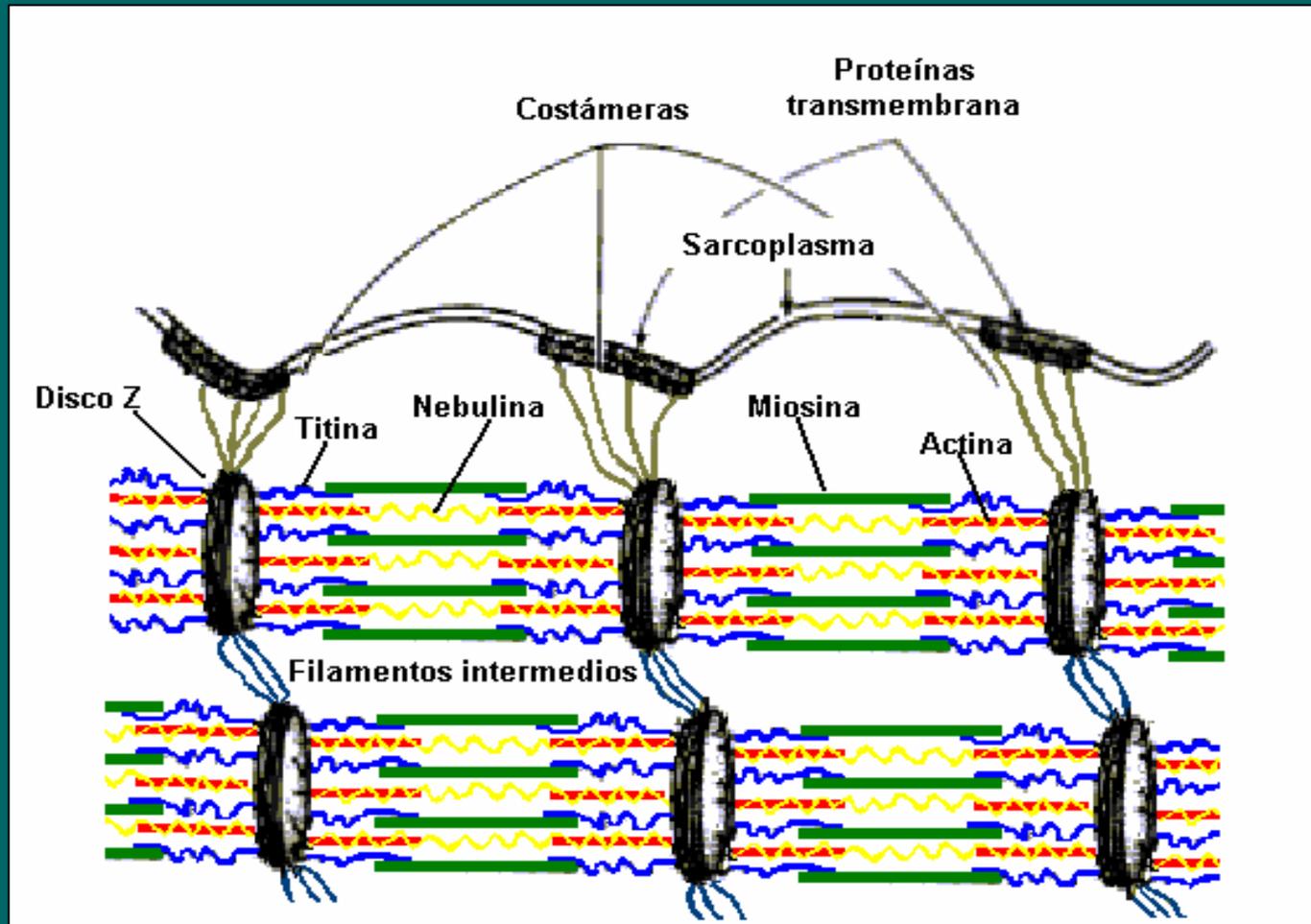


calpastatina



ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

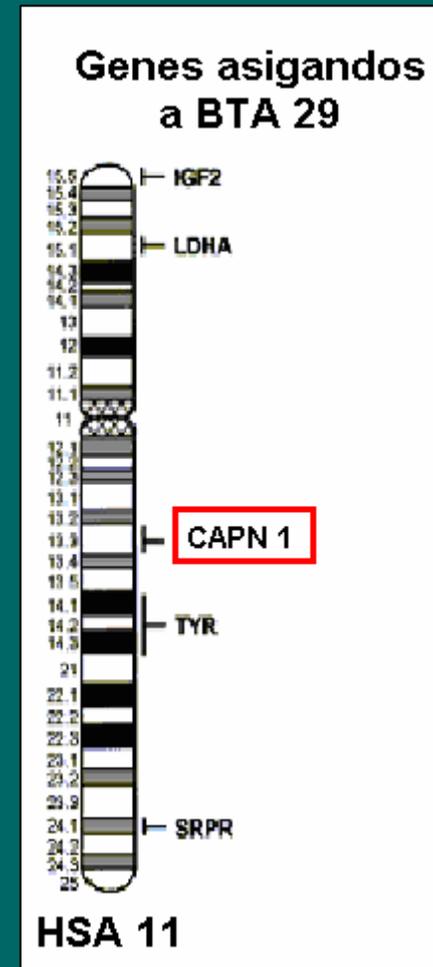
Por su acción se produce una desorganización de la estructura del sarcómero



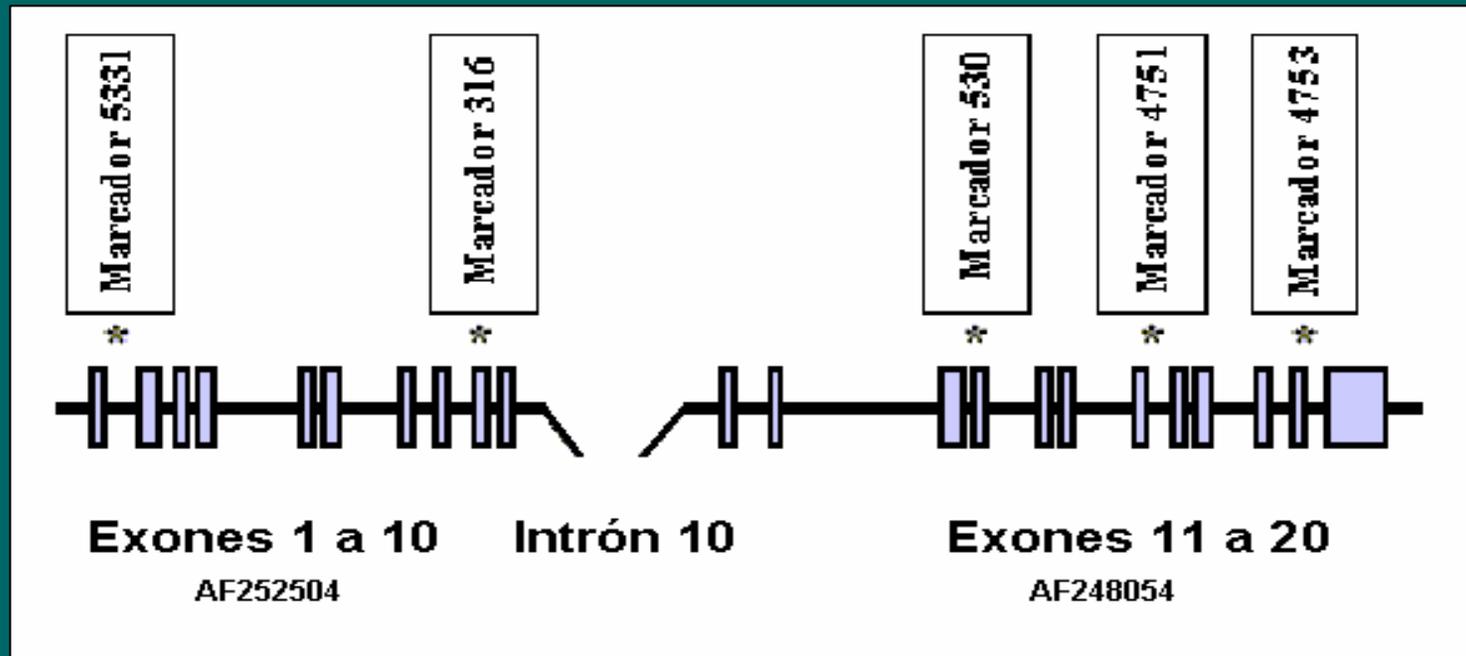
GEN CAPN1

Gen de la subunidad mayor de la μ -calpaína (CAPN1)

- ✓ Casas *et al.*, (2000) proponen un QTL (Quantitative Trait Loci) asociado con RC
- ✓ Smith *et al.*, (2000) mediante mapeo comparativo, proponen al gen CAPN1 como candidato posicional de dicho QTL



SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en el gen CAPN1

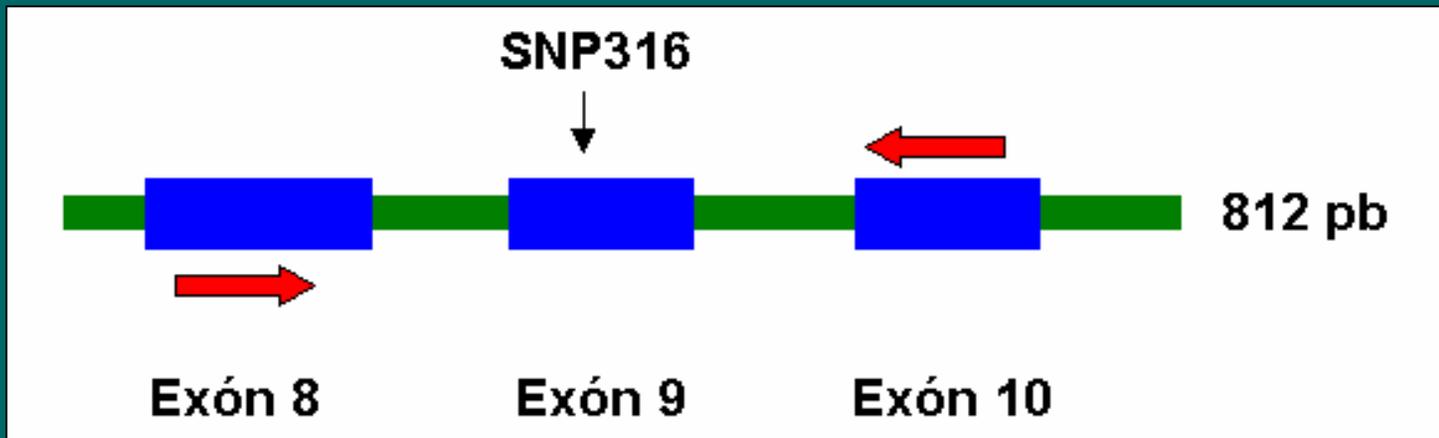


SNP 316: Sustitución de C por G → Ala / Gly en Dominio II

SNP 530: Sustitución de A por G → Ileu / Val en Domnio III

Análisis del SNP316 de CAPN1

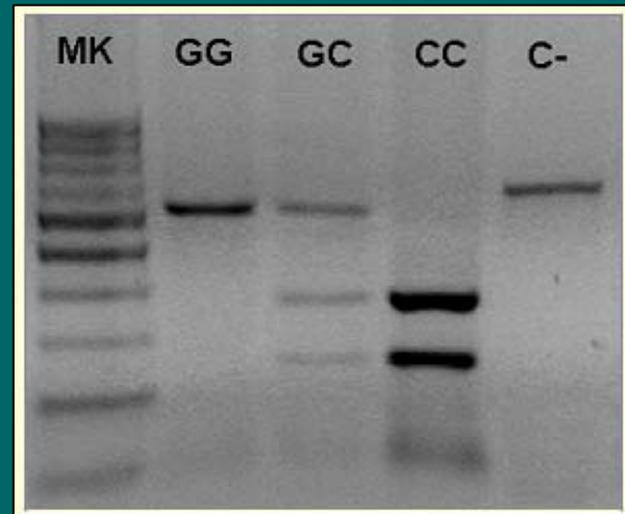
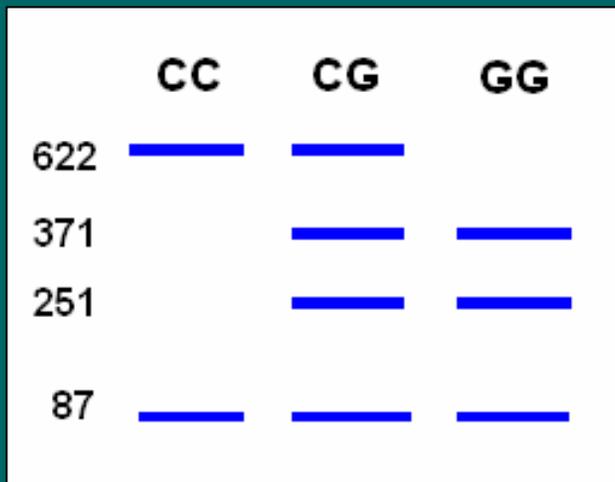
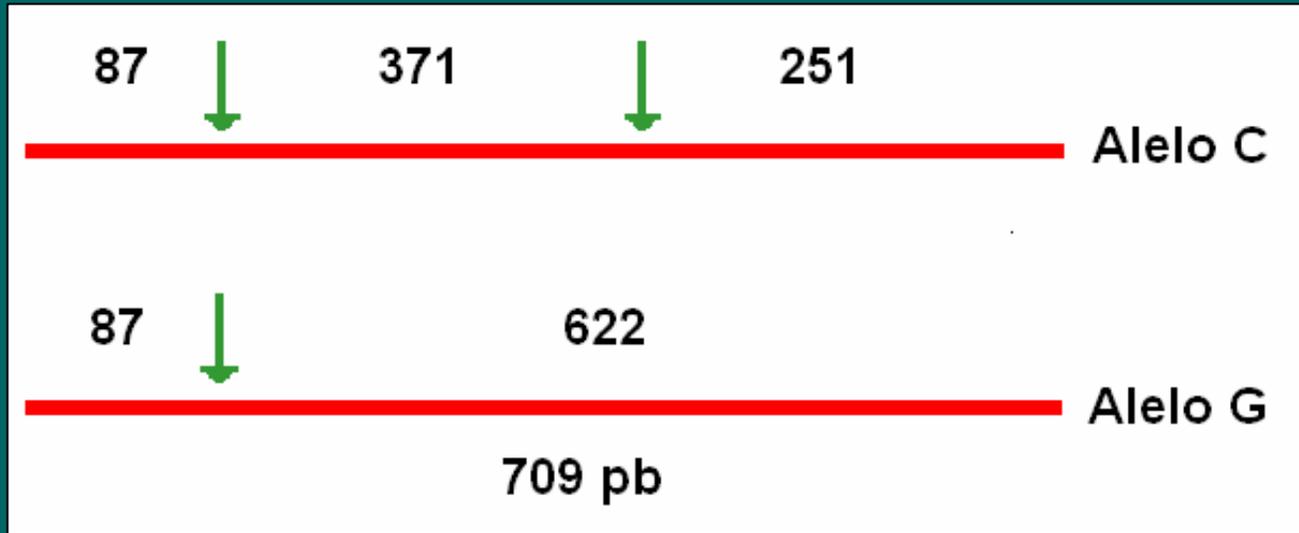
Técnica: PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism*)



Oligonucleótidos (AF252504, Page *et al.*, 2002):

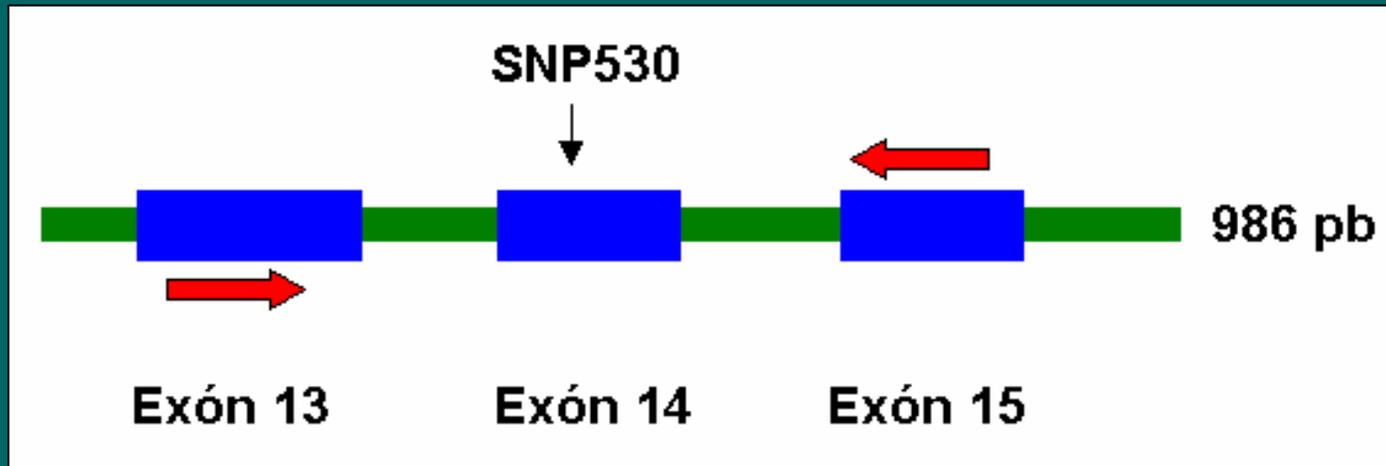
- 316F CCAGGGCCAGATGGTGAA
- 316R CGTCGGGTGTCAGGTTGC

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) Enzima *BtgI* (C↓CPuPyGG)



Análisis del SNP530 de CAPN1

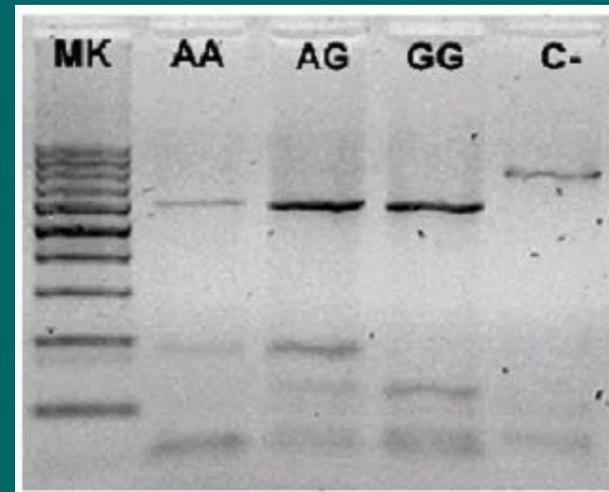
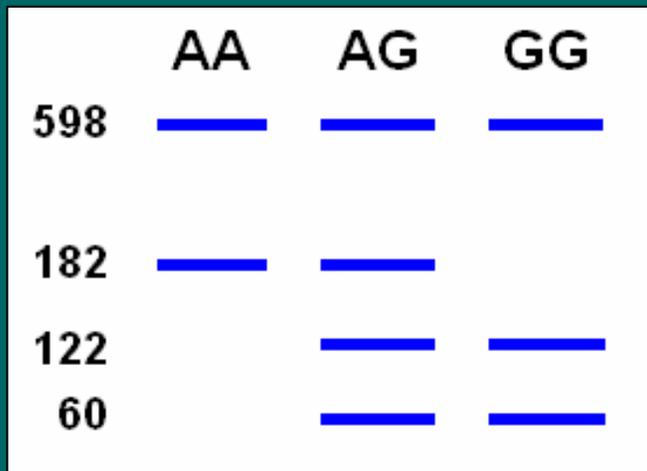
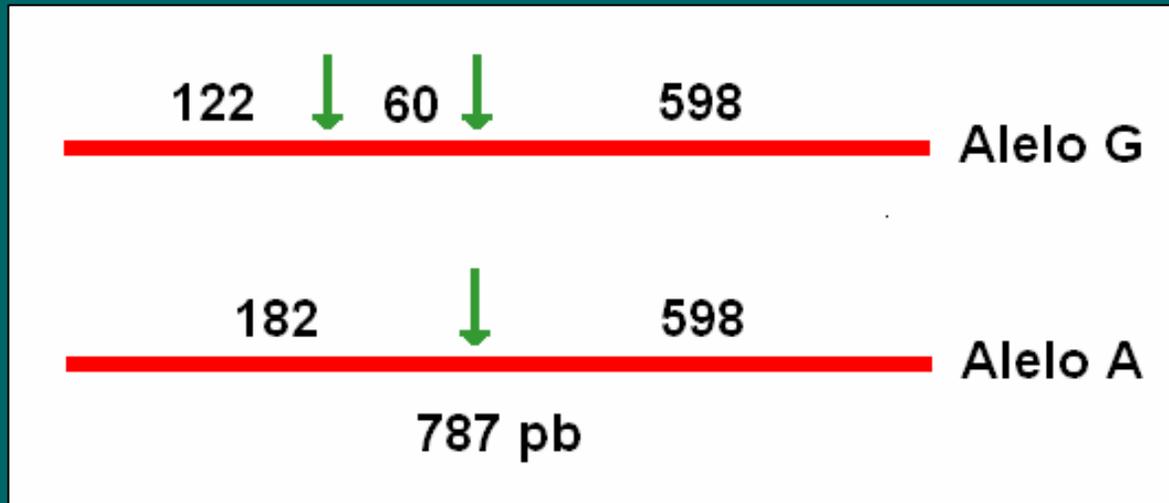
Técnica: PCR-RFLP



Oligonucleótidos (AF258054, Page *et al.*, 2002):

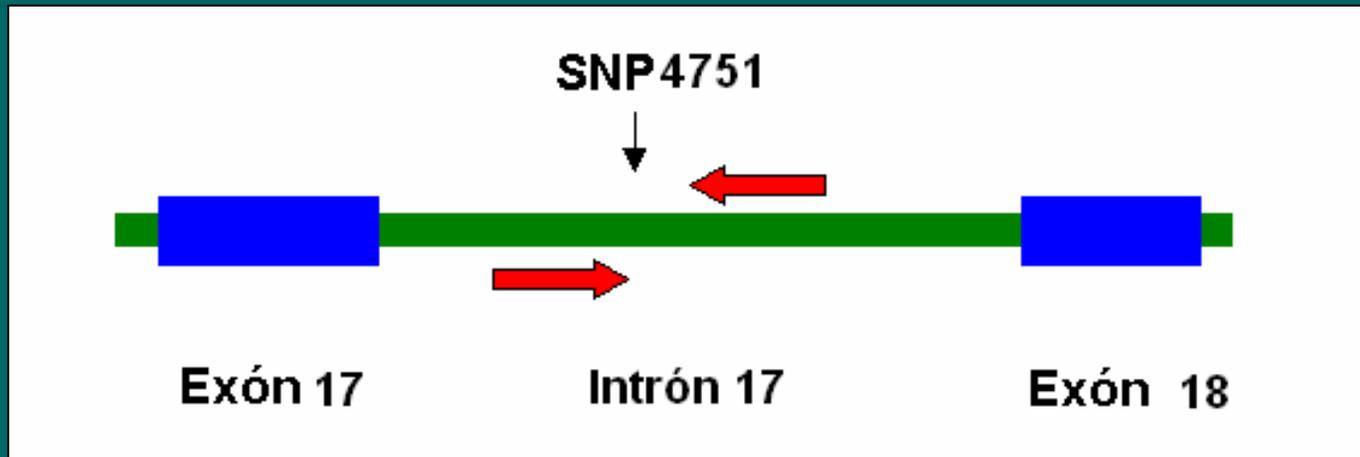
- 530F AGCGCAGGGACCCAGTGA
- 530R TCCCCTGCCAGTTGTCTGAAG

RFLP: Con *Ava*I (G↓GA/TCC)



Análisis del SNP4751 de CAPN1

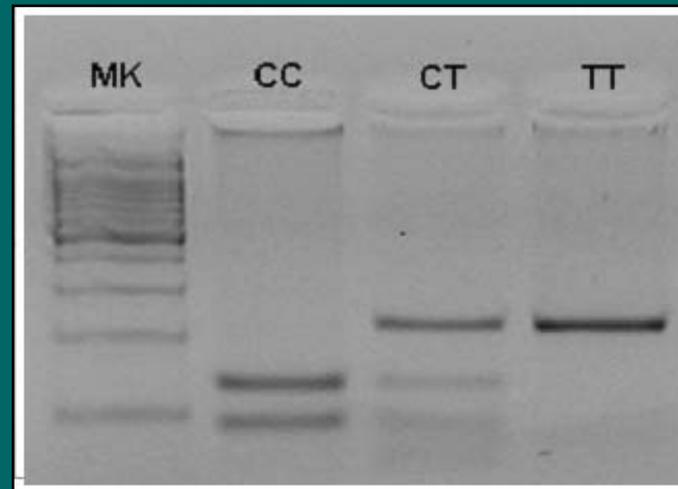
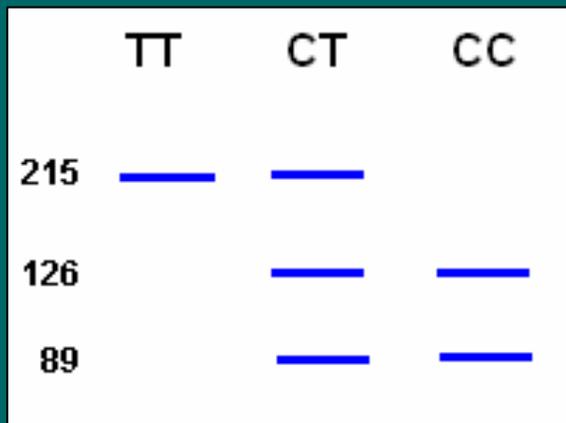
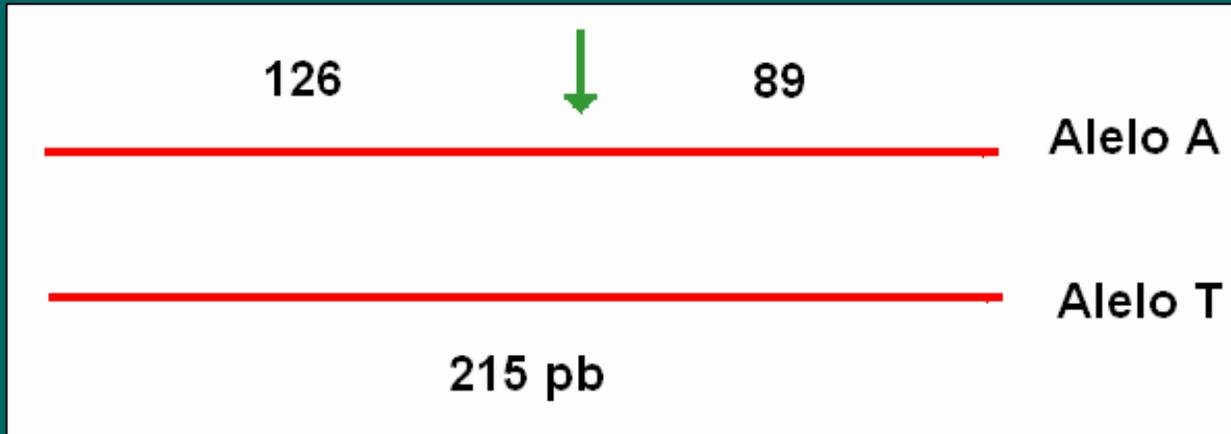
Técnica: PCR-RFLP



Oligonucleótidos ((AF258054, White *et al.*, 2005):

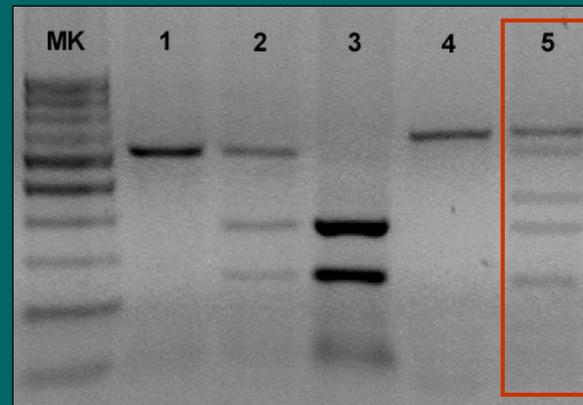
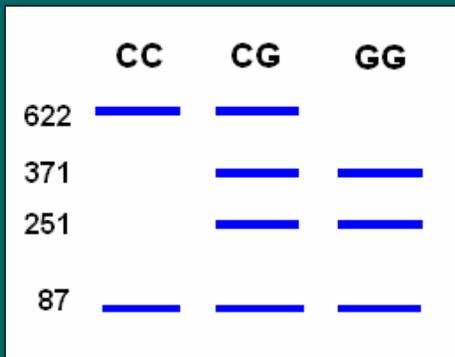
- 4751F: GAAGGGCTTGGGTTGGGATGTCGGCAGAG
- 4751R: AGGCTGGGAGGGGTGTTCTCTGAGTGCCA

RFLP: Con *Bsa*II (C↓CGAGG)



Polimorfismos identificados en el producto de PCR del SNP 316 en toros

Fueron identificadas por patrones de RFLP anómalos

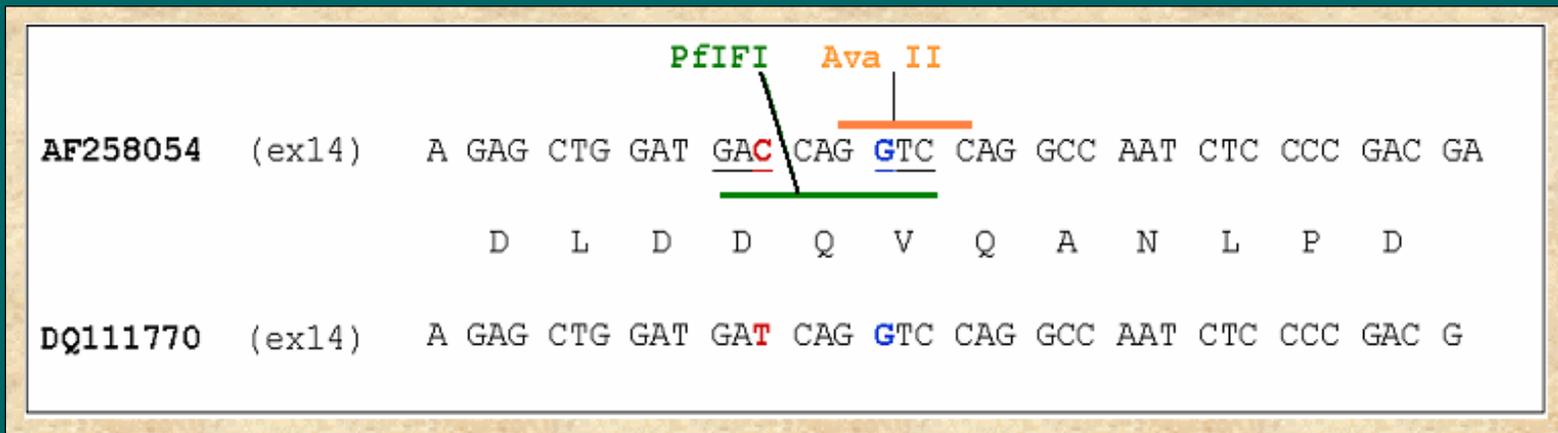


1 = CC
 2 = CG
 3 = GG
 4 = C-
 5 = ?

| Nº de acceso de acceso al GenBank | | Intrón 8 | | | Intrón 9 | Exón 10 |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Posición | 89 | 146 | 429 | 437 | 572 | 651 |
| AF252504 | A | G | G | A | T | C |
| DQ111667 | C | a | c | g | c | a |
| DQ111668 | A | G | c | g | c | a |

Polimorfismos identificados en el producto de PCR del SNP 530 en toros

| N° de acceso de acceso al GenBank | Exón 14 | Intrón 14 | | | | | | |
|-----------------------------------|----------|-----------|-----|-----|-----|-----|----------|----------|
| | | 304 | 306 | 307 | 308 | 309 | 531 | 611 |
| AF248054 | C | A | C | G | A | T | T | A |
| DQ111769 | t | g | - | - | - | - | T | A |
| DQ111770 | t | A | - | - | - | - | C | C |



Análisis del efecto de estos dos polimorfismos del gen CAPN1 sobre Resistencia al Corte (RC) en novillos engordados en pasturas en Argentina

Novillos:

247 Brangus

Datos Fenotípicos:

PV = Peso Vivo

AOB = Área de Ojo de Bife

EGD = Espesor de Grasa de Dorsal

PR = Peso de la Res

REN = Rendimiento

PGR = Peso de Grasa de Riñonada

% GR = Porcentaje de Grasa de Riñonada

RC = Resistencia al Corte (1d y 7d de maduración)

EE = Extracto de Etéreo

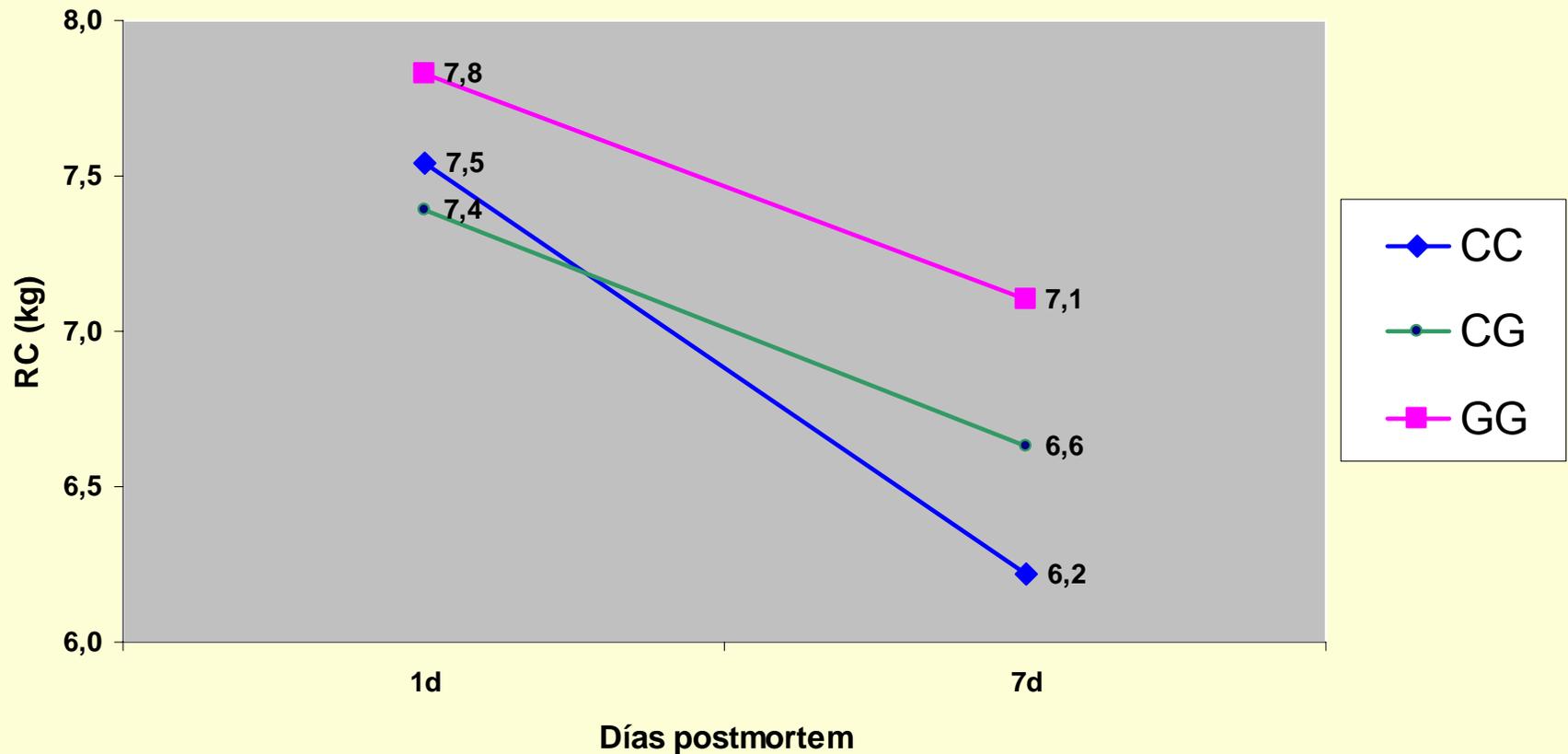


Medias y errores estándar de los genotipos del SNP 316 de CAPN1 en novillos Brangus

| SNP CAPN1 316 | | |
|---------------|-----|------------------------------|
| GENOTIPO | n | RC \pm EE ¹ |
| CC | 18 | 6,88 \pm 0,29 ^a |
| CG | 97 | 7,01 \pm 0,13 ^b |
| GG | 132 | 7,47 \pm 0,11 ^c |

(¹) Medias indicadas con letras distintas difieren significativamente ($P < 0,05$)

Medias de RC de cada genotipo del SNP 316 de CAPN1 en cada tratamiento de maduración



Medias y errores estándar de los genotipos del SNP 4751 de CAPN1 en novillos Brangus

| SNP CAPN1 4751 | | |
|----------------|-----|------------------------------|
| GENOTIPO | n | RC \pm EE ¹ |
| CC | 63 | 7,08 \pm 0,14 ^a |
| CT | 126 | 7,09 \pm 0,14 ^a |
| TT | 58 | 7,19 \pm 0,21 ^a |

(¹) Medias indicadas con la misma letra no difieren significativamente ($P > 0,05$)

GEN CAST

Gen de la calpastatina (CAST)

- ✓ Mapea en el cromosoma 7 bovino (BTA7)
- ✓ Purificación, clonación y secuenciación de ARNm (Killefer y Koohmaraie, 1994)
- ✓ Identificación de dos SNP asociados con la RC (Schenkel et al., 2006, Barednse, 2002)
- ✓ Actualmente hay dos pruebas comerciales.

Identificación de SNP en el gen CAST por bioinformática

Programa: CAP 3

```

AF159246+      2869 CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CB221225+      CGATTTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CB454471+      CGATTTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
AM463060+      CGATTTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GA
CN791474+      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CK951847-      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CB419436+      CGATTTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
BG358014+      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CK837283+      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
CK776191+      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT
NM_174003+      CAATTGCACTTATTTTGTGTTGTAGCATT TGGAAAAC GATGCCTCACGTGT TCTTCAGT

```

AAAGCTGC

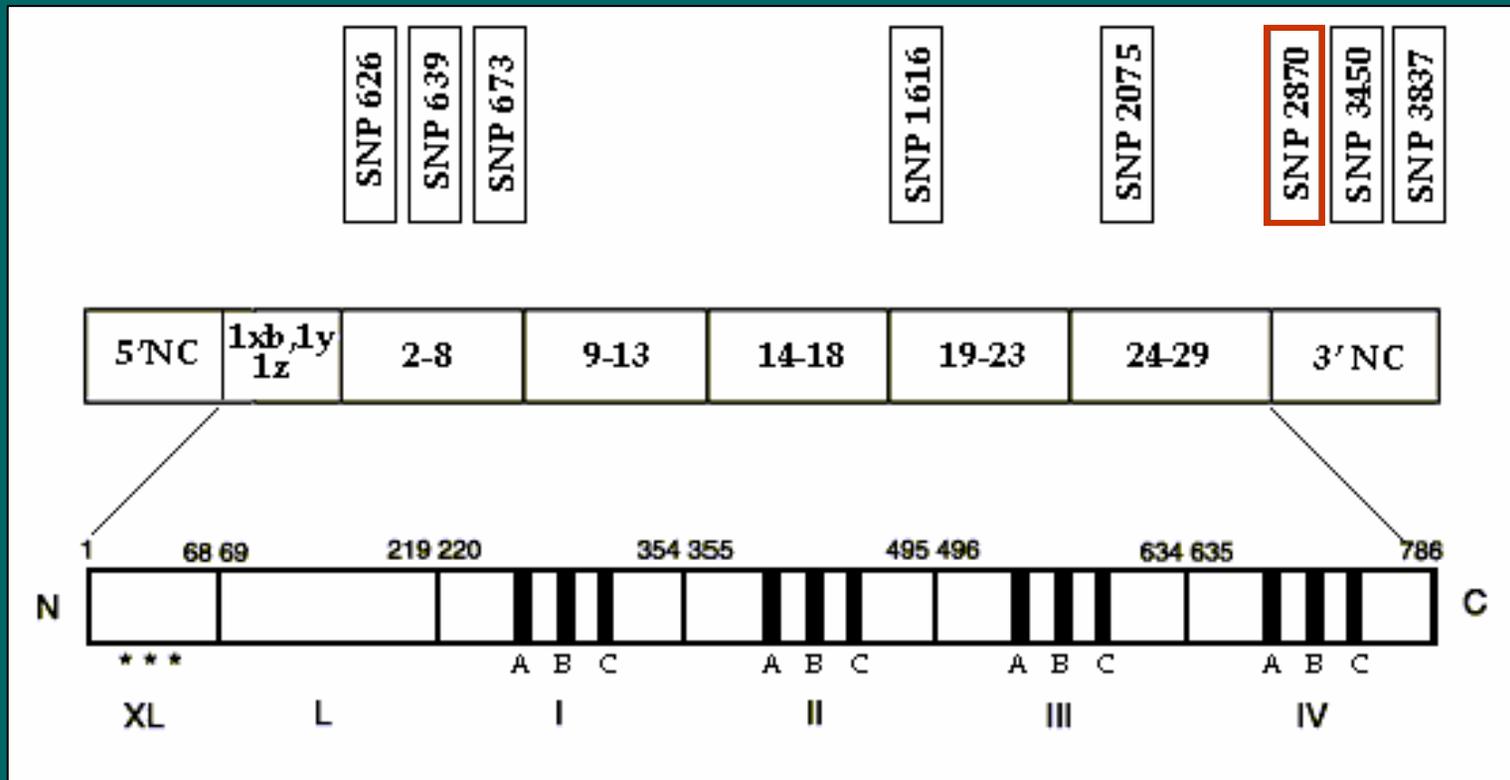
Programa: Auto SNIp

```

      ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZabcdefghijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM
2870 .....GAGAGGA.AGGG.....AA.....
3450 .....TTCTTTTC.C.CCTTC.....TT.....
3837 .....CCCTTCCTCCTCC.C.CTT.....

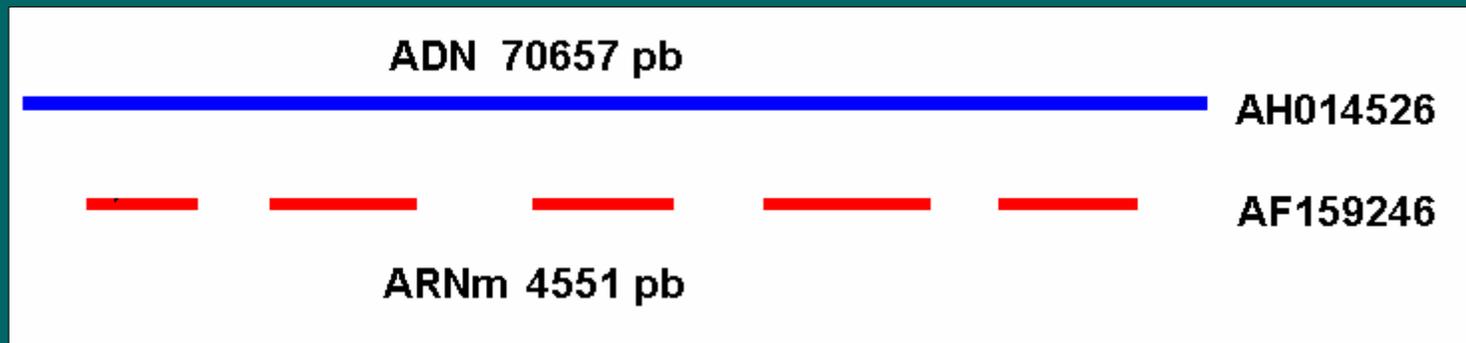
```

SNP identificados en el gen CAST por bioinformática



Organización del gen CAST

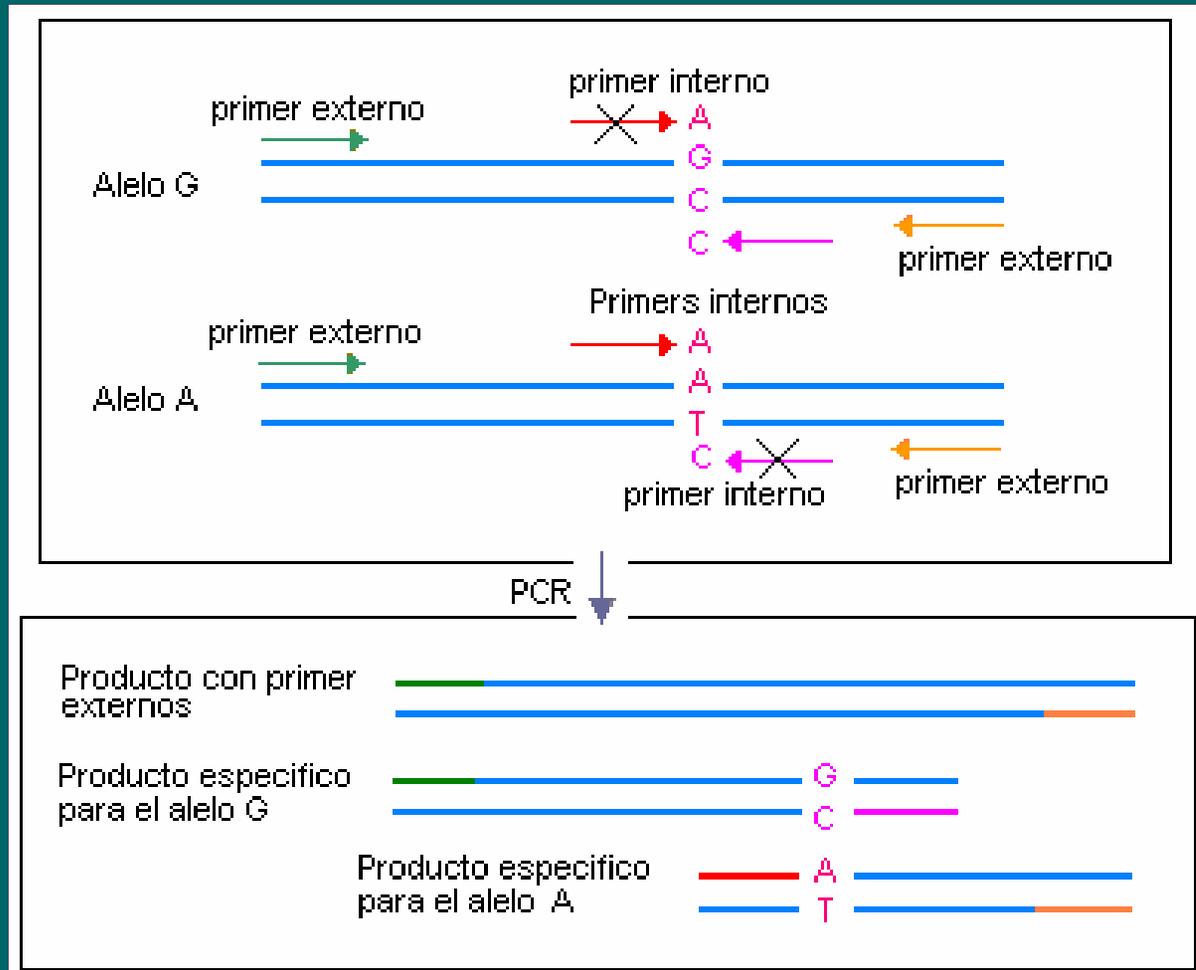
Se realizó para diseñar métodos apropiados para determinar genotipos del SNP seleccionado (*SNP 2870*)



| Número de exones | AH014526 (ADN genómico)* | AF159246 (ARNm CastII)* | Tamaño del exón (pb) | Tamaño del Intrón (pb) |
|------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|
| Exón 1x | 1617 - 1774 | 1 - 158 | 158 | 1544 |
| Exón 1y | 3319 - 3381 | 159 - 221 | 63 | 5987 |
| Exón 1z | 9369 - 9440 | 222 - 293 | 72 | 10472 |
| Exón 2 | 19913 - 19972 | 294 - 353 | 60 | 7111 |
| Exón 3 | 27084 - 27149 | 354 - 419 | 66 | 727 |

Análisis del SNP 2870 de CAST

Técnica: ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*)



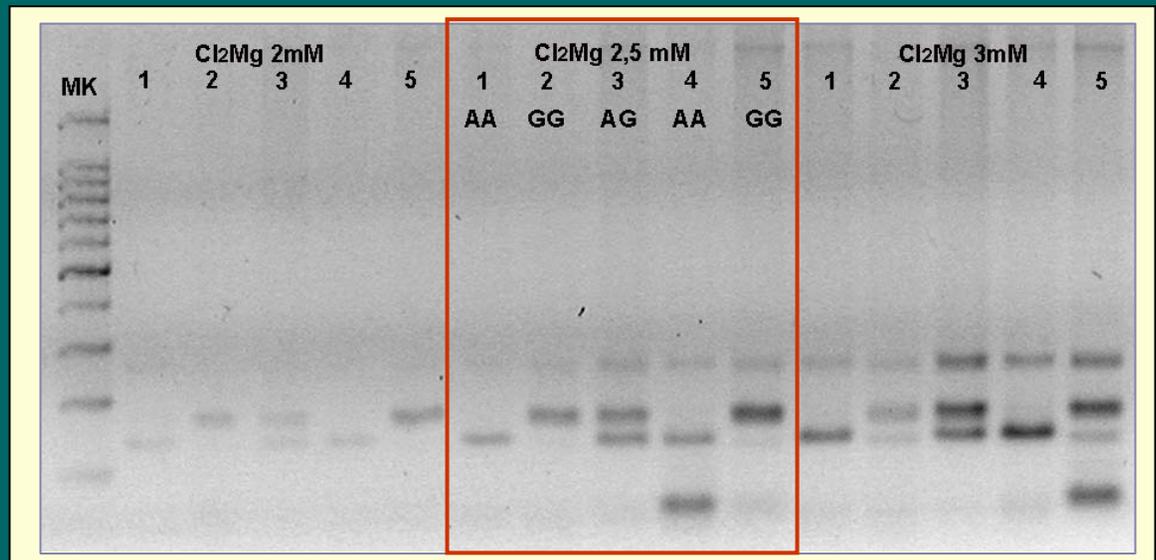
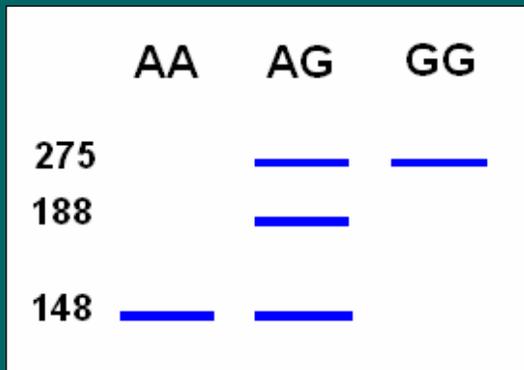
Técnica ARMS-PCR

Oligonucleótidos externos:

- CASTF AATTTTAAAAATTGCCTTCAGTTGGGAG
- CASTR AAGAAACATCAAACACAGTCCACAAGTCTA

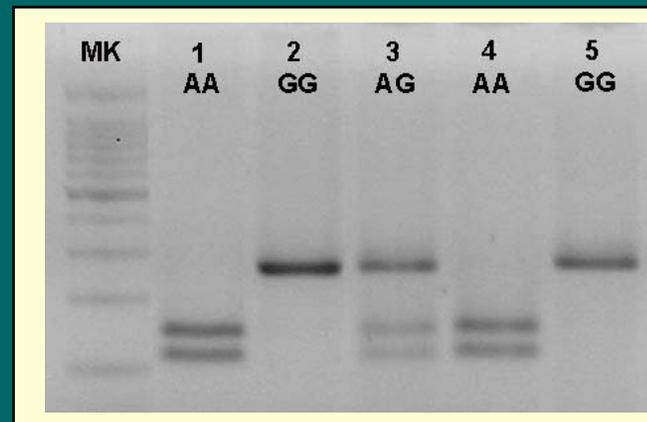
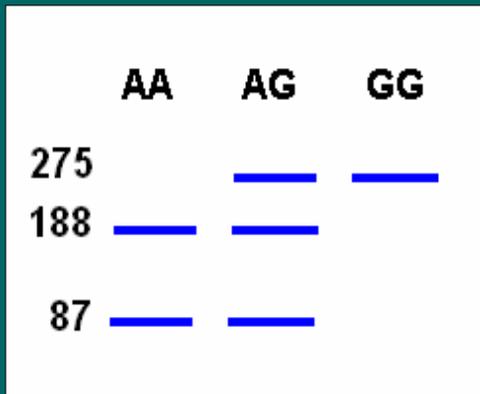
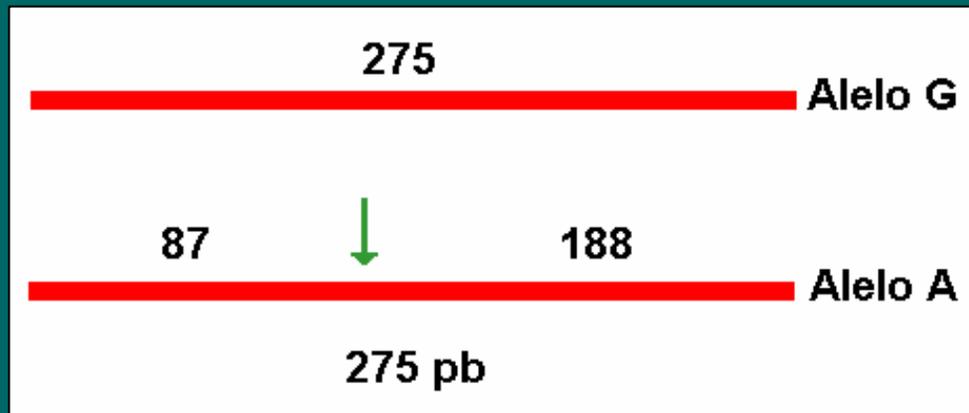
Oligonucleótidos internos:

- CASTA CAGTGCCTGTAAATCTCATTAGTATTGCAA
- CASTG CAAATGCTAACAACAAAAATAAGTGCAACTC



PCR-RFLP como control de la técnica ARMS-PCR

RFLP: Con *Tsp509I* (↓AATT)



Medias y errores estándar del SNP 2870 de CAST en novillos

| SNP 2870 | | |
|----------|----------------|--------------------------|
| GENOTIPO | n ¹ | RC ± EE ² |
| AA | 53 | 9,11 ± 0,75 ^a |
| AG | 162 | 8,91 ± 0,53 ^a |
| GG | 98 | 8,68 ± 0,56 ^a |

(1) 313 novillos biotipo europeo (≥ 75% Angus, ≥ 75% Hereford, F₁, retrocruzas, Limousin x F₁)

(2) Medias indicadas con la misma letra no difieren significativamente (P > 0,05)

No se detectaron diferencias entre los genotipos de este SNP en RC cuando se analizaron 313 novillos de biotipo europeo, tampoco en 60 novillos Brangus

TEST COMERCIALES DISPONIBLES PARA TERNEZA

1) Gene STAR Tenderness (Genetic Solution Pty Ltd) incluye:

- ✓ SNP G/C en exón 9 de CAPN1 (base 5709 de AF252504, Page *et al*, 2002)
- ✓ SNP C/T en intrón 17 de CAPN1 (base 6545 de AF248054, White *et al*, 2004)
- ✓ SNP G/A en 3' NT de CAST (base 2959 de AF159246, Barendse, 2002)

2) Igenity Tender GENE (Merial Ltd.) incluye:

- ✓ Los dos SNP descriptos previamente del gen CAPN1
- ✓ SNP G/C en intrón 5 de CAST (base 282 de AY008267, Schenkel *et al*, 2006)

GEN LEP

PROTEÍNA LEPTINA

- ✓ Sintetizada por los adipocitos
- ✓ Tiene un rol central en el consumo de alimentos, gasto energético y composición corporal
- ✓ Está codificada por el gen LEP que mapea en el cromosoma 4
- ✓ Se han descrito SNP en el exón 2 y en el promotor
- ✓ Hay un test comercial (Igenity-L, Merial Ltd.)

Análisis de un SNP del promotor de LEP

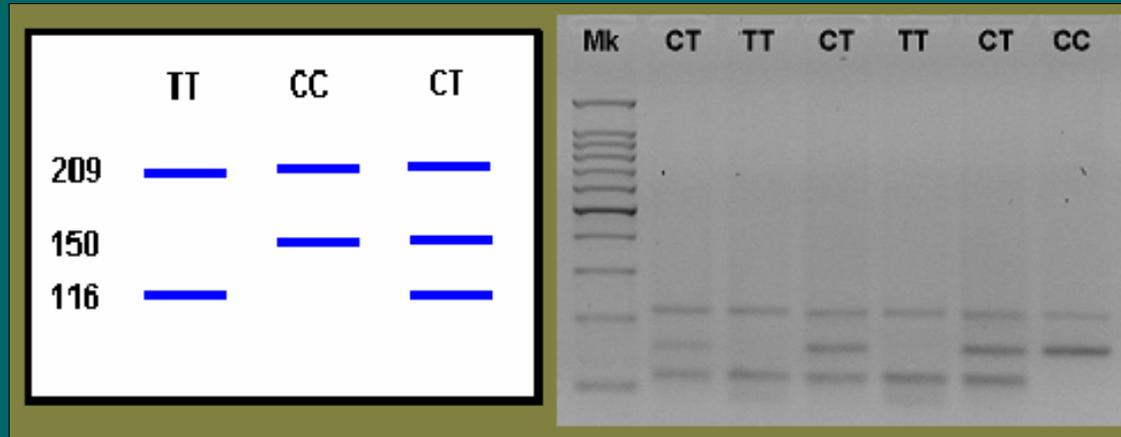
SNP C/T (Nkrumah *et al*, 2005)

Técnicas: ARMS-PCR y PCR-RFLP (para control)

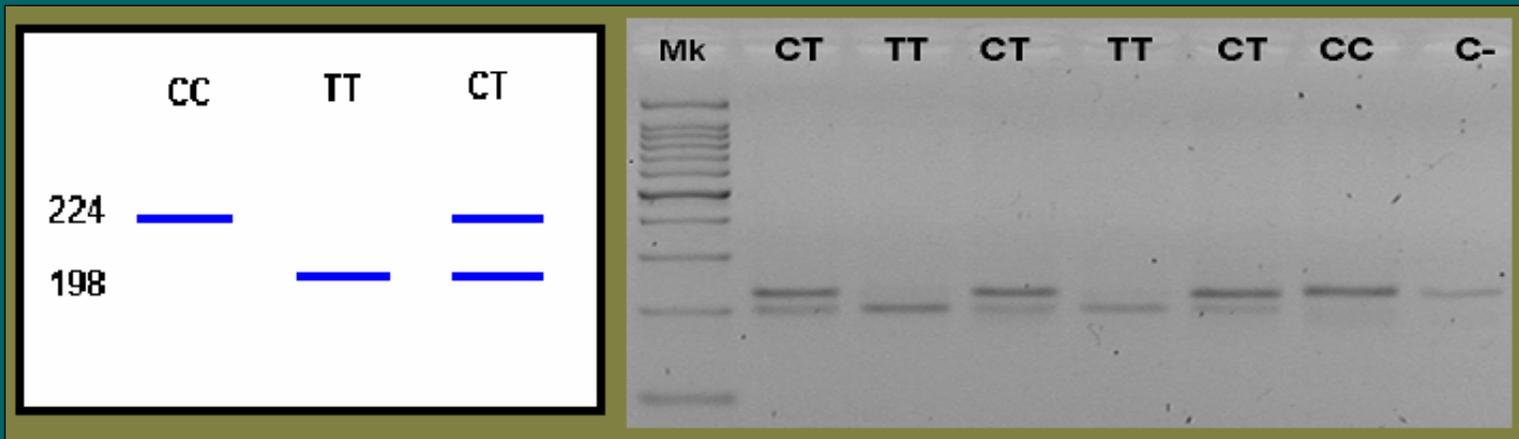
| MÉTODO | OLIGONUCLEÓTIDOS |
|----------|---|
| ARMS-PCR | LEP-Externo Forward: TGCAATGTGCAAGCTTCTCACTGTGGCAGC LEP-Externo Reverse: TGGTACAGTGGATGAGAATCCGCCTGCCA LEP-Interno-Alelo C: GCCCAGGGACTCAGCGGTTGCAACAAAC LEP-Interno-Alelo T: CGGCTCCCGAGCCCAAGCTCTAGAGCAT |
| PCR-RFLP | LEP Forward: TGTGGAGGCAGGGGGCAAGAA LEP Reverse: CTCCCGAGCCCAAGCTCTAGAGCAT |

Análisis de un SNP del promotor de LEP

Técnica: ARMS-PCR



Técnica: PCR-RFLP

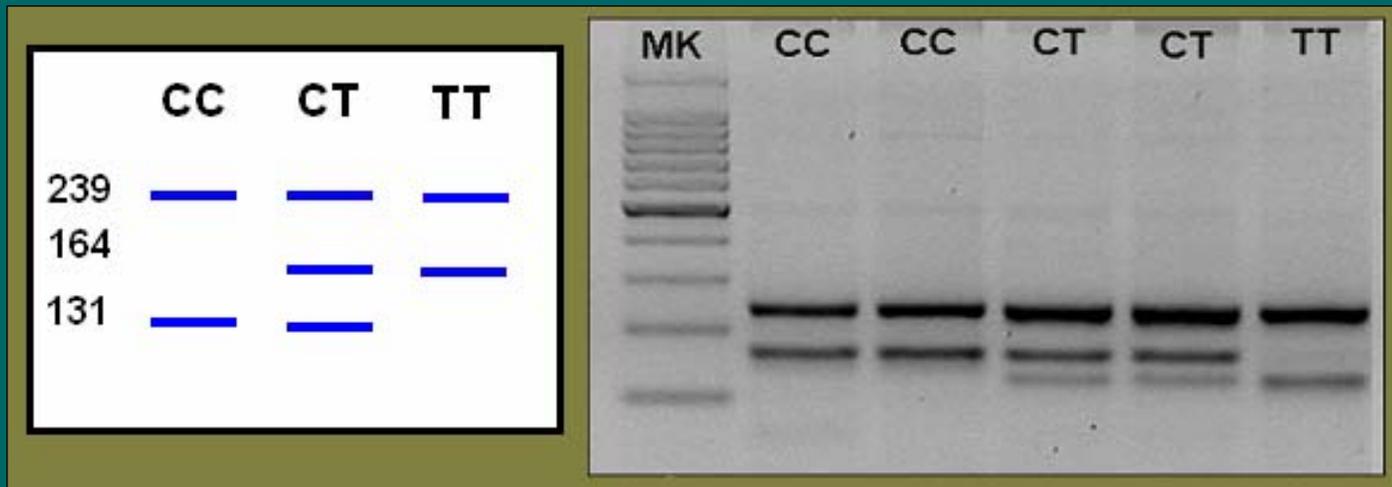


Análisis de un SNP del exón 2 de LEP

SNP C/T (Buchanan, *et al*, 2002)

Técnicas: ARMS-PCR (con controles +)

| MÉTODO | OLIGONUCLEÓTIDOS |
|----------|---|
| ARMS-PCR | Primer forward LEP172: TGTCTTACGTGGAGGCTGTGCCCAGCT Primer reverse LEP 226: AGGGTTTTGGTGTGCATCCTGGACCTTTTCG Primer forward LEP 63: GACGATGTGCCACGTGTGGTTTCTTCTGT Primer reverse LEP 301: CGGTTCTACCTCGTCTCCCAGTCCCTCC |



Análisis del efecto de estos dos polimorfismos del gen LEP en caracteres de crecimiento y de res de novillos engordados en pasturas en Argentina

Novillos:

- ✓ 155 de biotipo europeo ($\geq 75\%$ Angus, $\geq 75\%$ Hereford, F_1 , retrocruzas, Limousin x F_1)
- ✓ 246 Brangus →



Datos Fenotípicos:

- ✓ PV = Peso Vivo
- ✓ AOB = Área de Ojo de Bife
- ✓ EGD = Espesor de Grasa de Dorsal
- ✓ PR = Peso de la Res
- ✓ REN = Rendimiento
- ✓ PGR = Peso de Grasa de Riñonada
- ✓ % GR = Porcentaje de Grasa de Riñonada
- ✓ EE = Extracto de Etéreo

Medias y errores estándar del SNP del promotor de LEP para cada biotipo

| GENOTIPO | EUROPEOS ¹ | | | BRANGUS | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | CC | CT | TT | CC | CT | TT |
| n | 54 | 70 | 31 | 134 | 75 | 37 |
| PV (Kg) | 331 ± 6 | 323 ± 5 | 329 ± 8 | 436 ± 4 | 445 ± 5 | 430 ± 7 |
| PR (Kg) | 171 ± 3 ^a | 166 ± 3 ^a | 171 ± 5 ^a | 239 ± 2 ^a | 246 ± 3 ^b | 235 ± 4 ^a |
| REN (%) | 50,7 ± 0,4 | 50,6 ± 0,2 | 51,0 ± 0,3 | 54,6 ± 0,2 | 55,1 ± 0,2 | 54,6 ± 0,3 |
| AOB (cm ²) | 46,2 ± 1,1 ^a | 43,6 ± 1,1 ^b | 44,2 ± 1,5 ^{ab} | 65,9 ± 0,8 ^a | 68,6 ± 0,8 ^b | 65,8 ± 1,4 ^a |
| EGD (mm) | 4,7 ± 0,2 | 4,7 ± 0,2 | 4,6 ± 0,3 | 6,3 ± 0,1 | 6,3 ± 0,2 | 6,5 ± 0,3 |
| PGR (g) | 1.780 ± 124 | 1.626 ± 108 | 1.796 ± 164 | 2.826 ± 88 | 2.795 ± 107 | 2.597 ± 154 |
| %GR | 1,05 ± 0,05 | 0,98 ± 0,05 | 1,06 ± 0,06 | 1,15 ± 0,03 | 1,10 ± 0,04 | 1,09 ± 0,06 |
| EE (%) | 2,4 ± 0,2 | 2,3 ± 0,1 | 2,3 ± 0,2 | 2,7 ± 0,2 | 2,9 ± 0,2 | 3,0 ± 0,4 |

Medias de cada genotipo con letras diferentes dentro de cada biotipo difieren significativamente (P<0.05)

Medias y errores estándar del SNP del exón 2 de LEP para cada biotipo

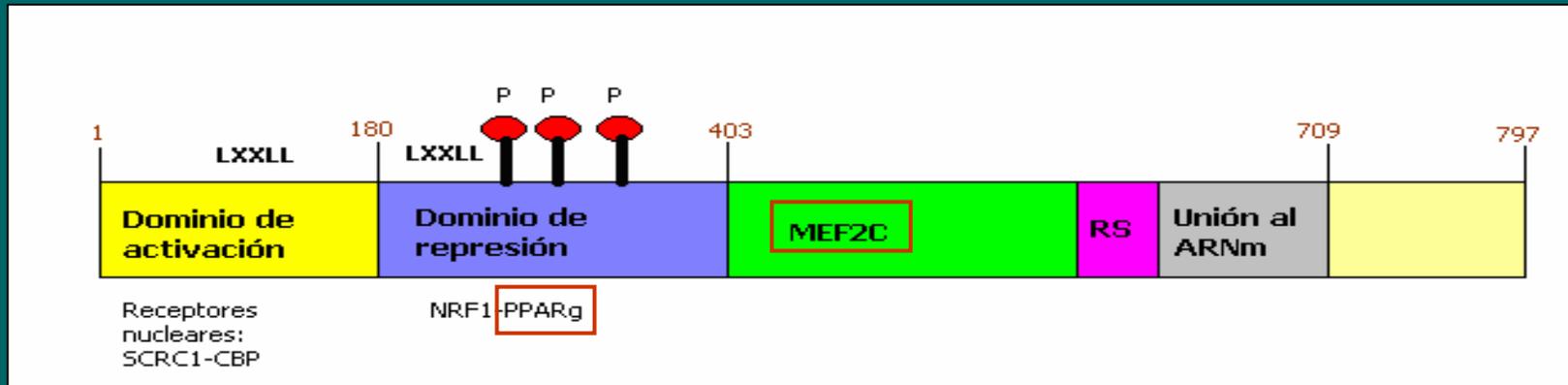
| GENOTIPO | EUROPEOS ¹ | | | BRANGUS | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CC | CT | TT | CC | CT | TT |
| n | 23 | 84 | 50 | 54 | 142 | 51 |
| PV (Kg) | 322 ± 9 | 329 ± 5 | 326 ± 6 | 441 ± 6 | 436 ± 4 | 444 ± 6 |
| PR (Kg) | 167 ± 5 | 170 ± 3 | 168 ± 3 | 241 ± 3 | 240 ± 2 | 242 ± 3 |
| REN (%) | 50,7 ± 0,4 | 50,9 ± 0,2 | 50,6 ± 0,3 | 54,7 ± 0,2 | 55,0 ± 0,2 | 54,4 ± 0,3 |
| AOB (cm ²) | 45,2 ± 1,7 | 45,1 ± 0,9 | 44,0 ± 1,2 | 66,8 ± 1,1 | 66,9 ± 0,8 | 66,5 ± 1,2 |
| EGD (mm) | 5,1 ± 0,3 ^a | 4,4 ± 0,1 ^b | 5,0 ± 0,2 ^a | 6,1 ± 0,2 ^a | 6,5 ± 0,1 ^a | 6,2 ± 0,2 ^a |
| PGR (g) | 1.813 ± 189 | 1.612 ± 99 | 1.844 ± 129 | 2.755 ± 126 | 2.742 ± 85 | 3.000 ± 132 |
| %GR | 1,10 ± 0,07 ^a | 0,95 ± 0,04 ^b | 1,10 ± 0,05 ^a | 1,12 ± 0,05 ^{ab} | 1,11 ± 0,03 ^b | 1,19 ± 0,05 ^a |
| EE (%) | 2,6 ± 0,2 | 2,2 ± 0,1 | 2,5 ± 0,2 | 2,8 ± 0,3 | 2,9 ± 0,2 | 2,5 ± 0,3 |

Medias de cada genotipo con letras diferentes dentro de cada biotipo difieren significativamente (P<0.05)

GEN PPARGC1 α

PROTEÍNA PPARGC1 α O PGC-1 α

- ✓ Es un coactivador de factores de la transcripción
- ✓ Codificada por el gen coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos



Lin *et al*, 2005

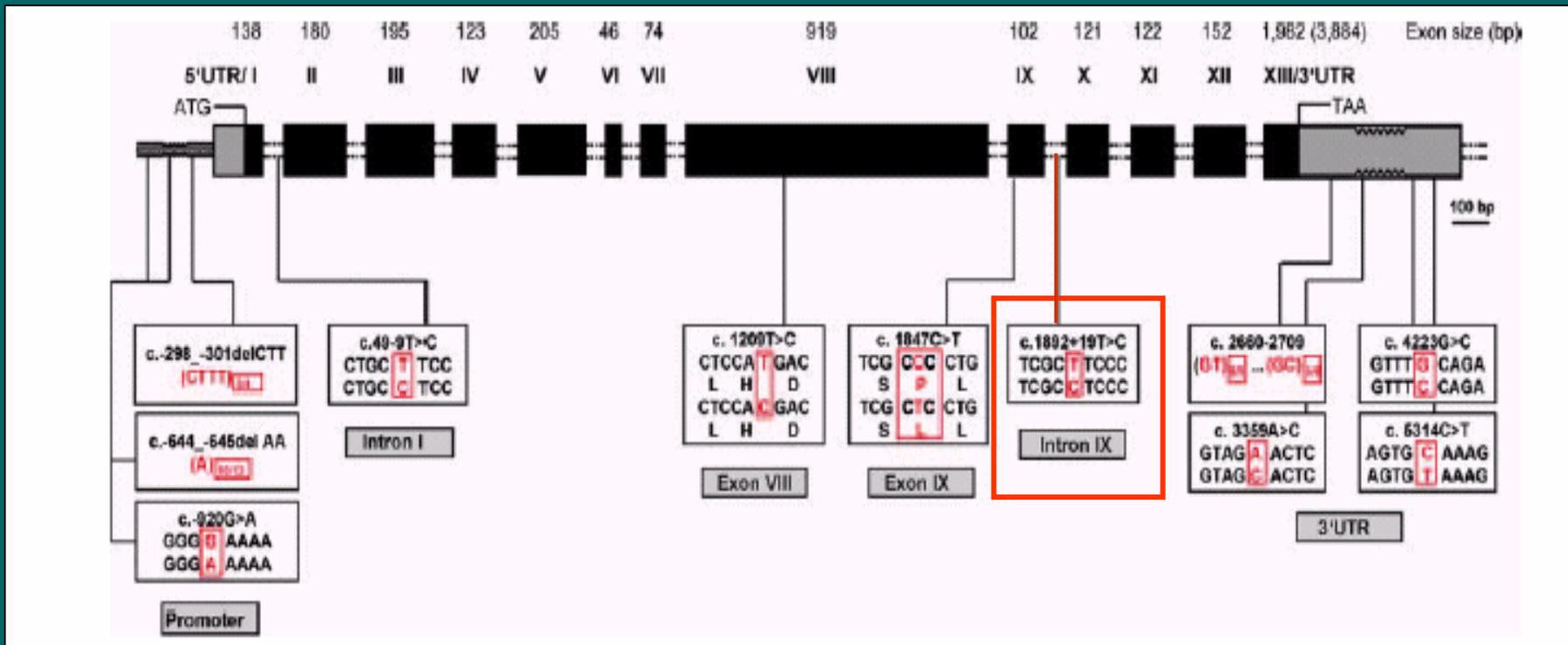
PROTEÍNA PPARGC1 α O PGC-1 α



Lin *et al*, 2005

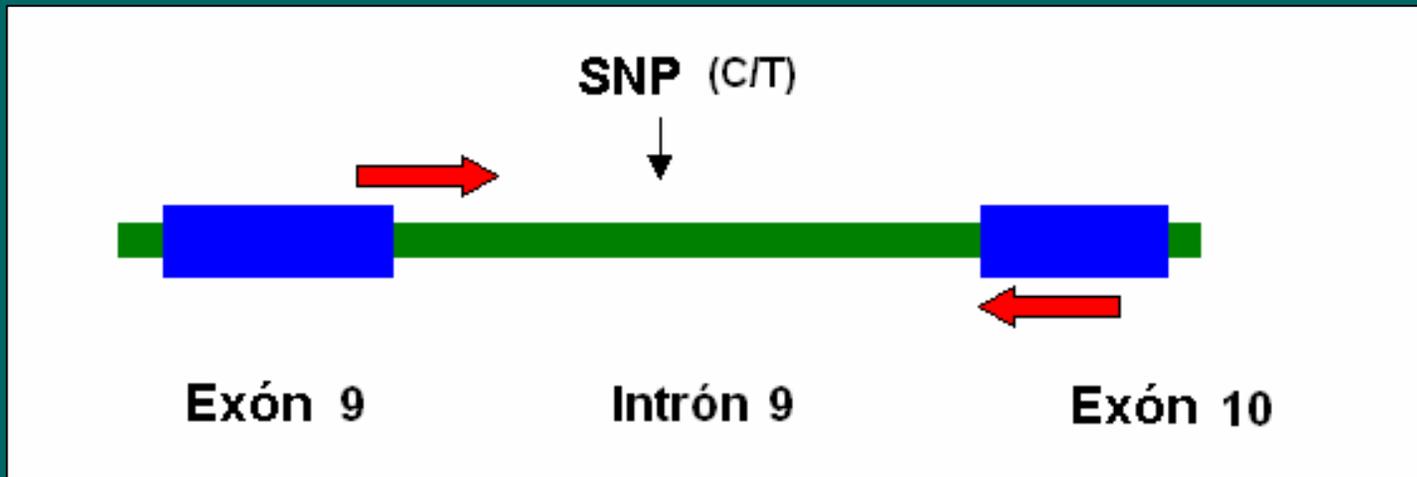
GEN PPARGC1 α BOVINO

- ✓ Se localiza en el cromosoma 6
- ✓ Se ha obtenido la secuencia del ARNm
- ✓ Se ha identificado un SNP en el intrón 9 asociado con contenido de grasa en leche



Análisis del SNP del intrón 9 de PPARGC1 α

Técnica: PCR-RFLP

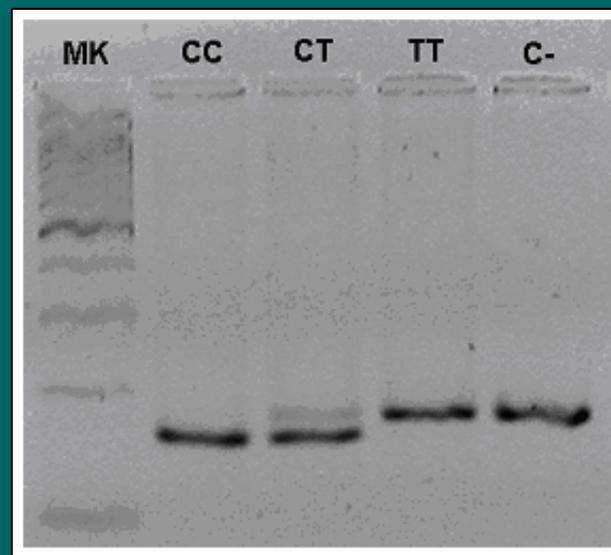
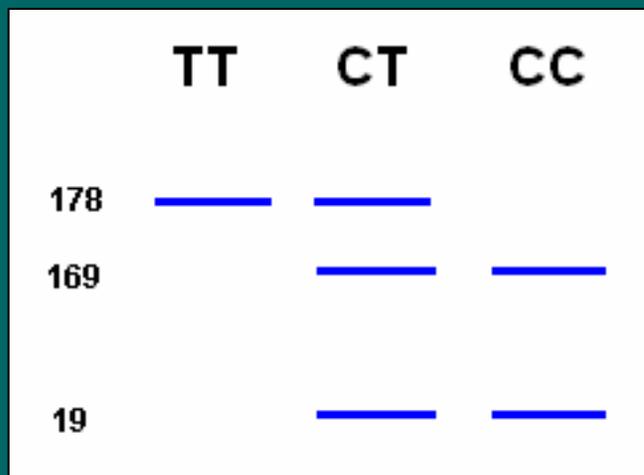
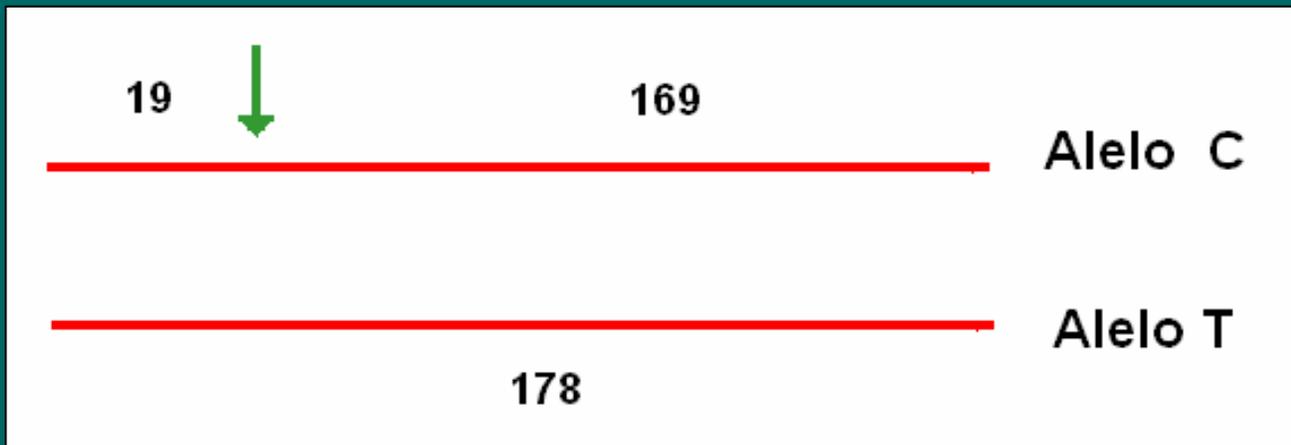


Oligonucleótidos (Weikard, *et al.*, 2005):

- PPAR-9F: AGGTAATGATGCACGTTGGC¹
- PPAR-9R: CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC

(1) El primer forward tiene una sustitución en el antepenúltimo nucleótido para crear un sitio *Hae*III

RFLP: Con *Hae*III (GG↓CC)



Análisis del SNP del intrón 9 de PPARGC1 α en novillos

| GENOTIPO | Grupo / Raza | | | | TOTAL | FRECUENCIA GENOTÍPICA | FRECUENCIA ALÉLICA |
|----------|--------------|------------|------------|------------|-------|-----------------------|--------------------|
| | ANGUS (n=21) | BR1 (n=20) | BR2 (n=20) | BR3 (n=20) | | | |
| TT | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0,02 | T = 0,2 C = 0,8 |
| CT | 7 | 9 | 5 | 8 | 29 | 0,36 | |
| CC | 13 | 10 | 15 | 12 | 50 | 0,62 | |

✓ Este polimorfismo no mostró efecto significativo sobre RC ni sobre extracto etéreo al realizar la comparación de genotipos ($P > 0,05$)

✓ White et al, (2007) hallaron resultados semejantes en razas *B. Taurus* y *B. Indicus* cuando analizaron terneza

Organización del ARNm de PPARGC1 α

| Exón | Secuencia de cerdo | Posición de la Secuencia de cerdo | ARNm bovino (AY321517) | Tamaño del exón (pb) | Observaciones |
|--------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------|
| Exón 1 | AY484494 | 583 – 719 | 1 – 138 | 138 | 1–90 NT, 91-138 |
| Exón 2 | AY484495 | 478 – 657 | 139 – 318 | 180 | |
| Exón 3 | AY484496 | <1 – 102 | 319 – 513 | 195 | |
| Exón 4 | AY484497 | 600 – 722 | 514 – 636 | 123 | |
| Exón 5 | AY484498 | 494 – 698 | 637 – 841 | 205 | |
| Exón 6 | AY484499 | 246 – 291 | 842 – 887 | 46 | |
| Exón 7 | AY484499 | 400 – 473 | 888 – 961 | 74 | |
| Exón 8 | AY484500 | 262 – 1177 | 962 – 1880 | 919 | |
| Exón 9 | AY484500 | 1692 – 1796 | 1881 – 1982 | 102 | |
| Exón 10 | AY484500 | 1936 – 2056 | 1983 – 2103 | 121 | |
| Exón 11 | AY484501 | <1 – 68 | 2104 – 2225 | 122 | |
| Exón 12 | AY484501 | 399 – 550 | 2226 – 2377 | 152 | |
| Exón 13 | AY484502 | 521 ->620 | 2378 ->2478 | >101 | |
| Región NT 3' | | | | 840 | 700-850 |

SNP en el exón 8 de PPARGC1 α por comparación de secuencias propias

SNP A/G en posición 1181 de la secuencia AY321517

| | | |
|-----------|---|-----|
| | . : . : | |
| 1-Angus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 160 |
| 2-Angus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 154 |
| 3-Angus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 160 |
| 4-Brangus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 146 |
| 5-Brangus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 146 |
| 6-Brangus | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 146 |
| 7-Brahman | CAAGACCTCTGTGCTCACCA A TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 155 |
| 8-Brahman | CAAGACCTCTGTGCTCACCA A TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 154 |
| 9-Braford | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 147 |
| AY321517 | CAAGACCTCTGTGCTCACCA G TGGACACGAGGAAAGGAAGGCCAAACGGCCCAGTCTCCG | 170 |

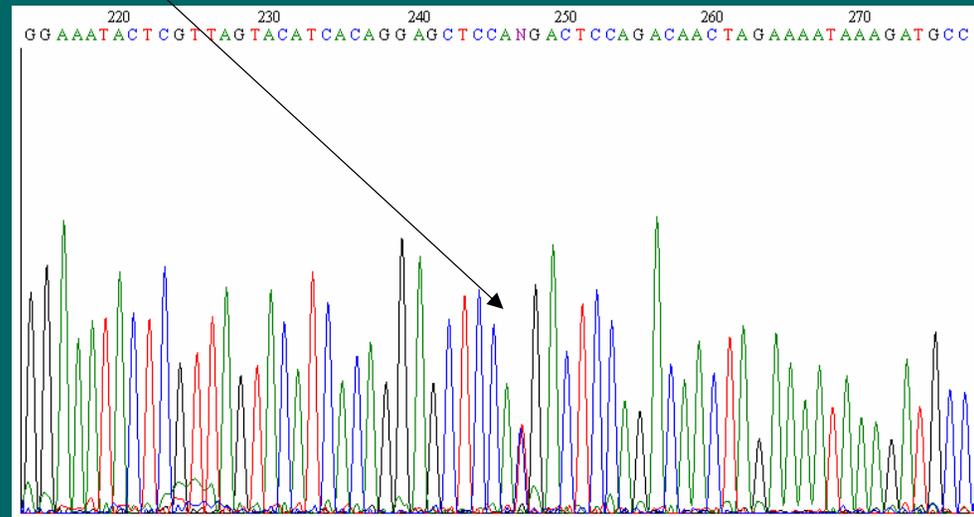
AGT : Serina → **AAT**: Asparagina
(Aminoácido 364)

Búsqueda de SNP en el exón 8 de PPARGC1 α por comparación de secuencias propias

SNP T/C en posición 1299 de la secuencia AY321517

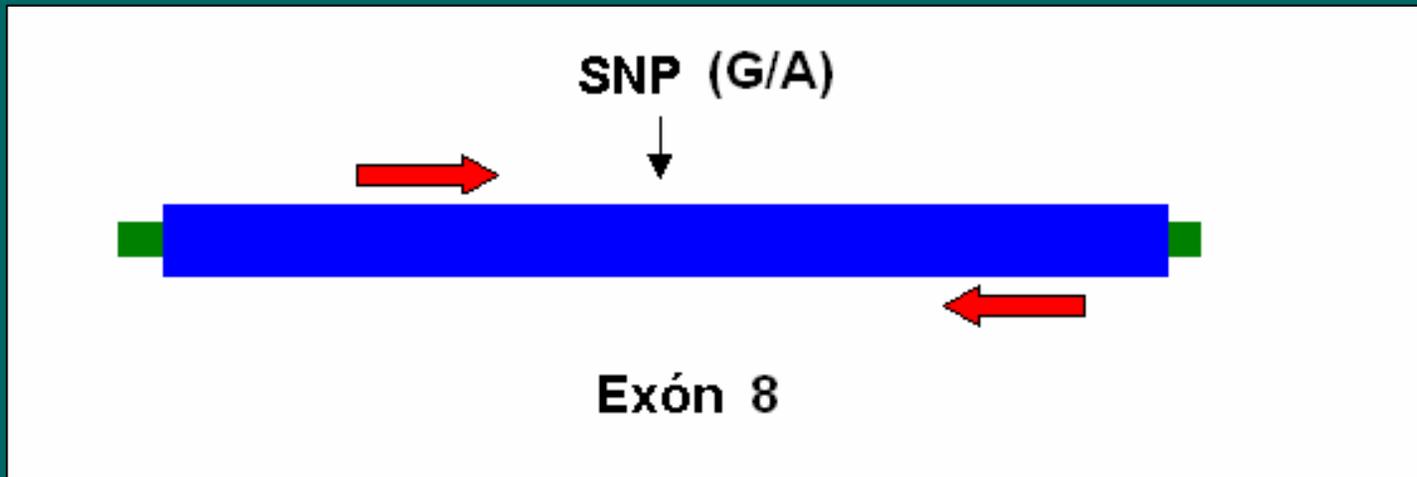
| | | |
|-----------|--|-----|
| | . : . : . : . : . : . : . : | |
| 1-Angus | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 280 |
| 2-Angus | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 274 |
| 3-Angus | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 280 |
| 4-Brangus | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 266 |
| 5-Brangus | TACATCACAGGAGCTCCA A GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 266 |
| 6-Brangus | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 266 |
| 7-Brahman | TACATCACAGGAGCTCCA C GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 275 |
| 8-Brahman | TACATCACAGGAGCTCCA C GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 274 |
| 9-Braford | TACATCACAGGAGCTCCA C GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 267 |
| AY321517 | TACATCACAGGAGCTCCA T GACTCCAGACAACCTAGAAAATAAAGATGCCCCCTCCTCCAA | 290 |

CAC: Histidina → CAU: Histidina



Análisis del SNP del Exón 8 de PPARGC1 α

Técnica: PCR-RFLP

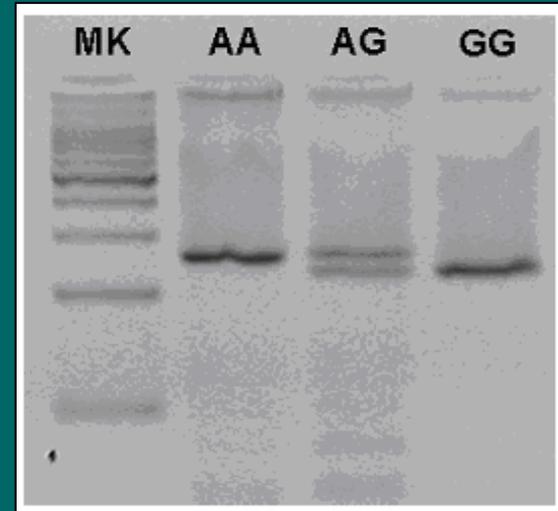
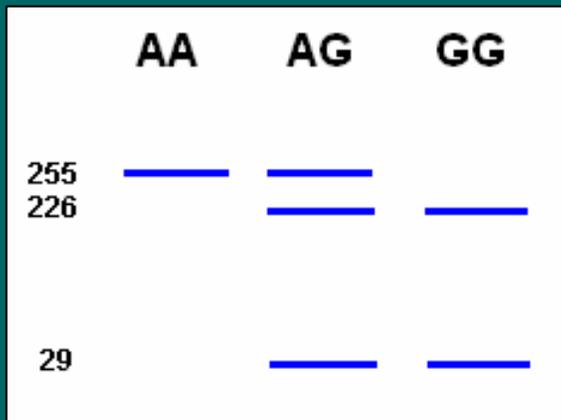
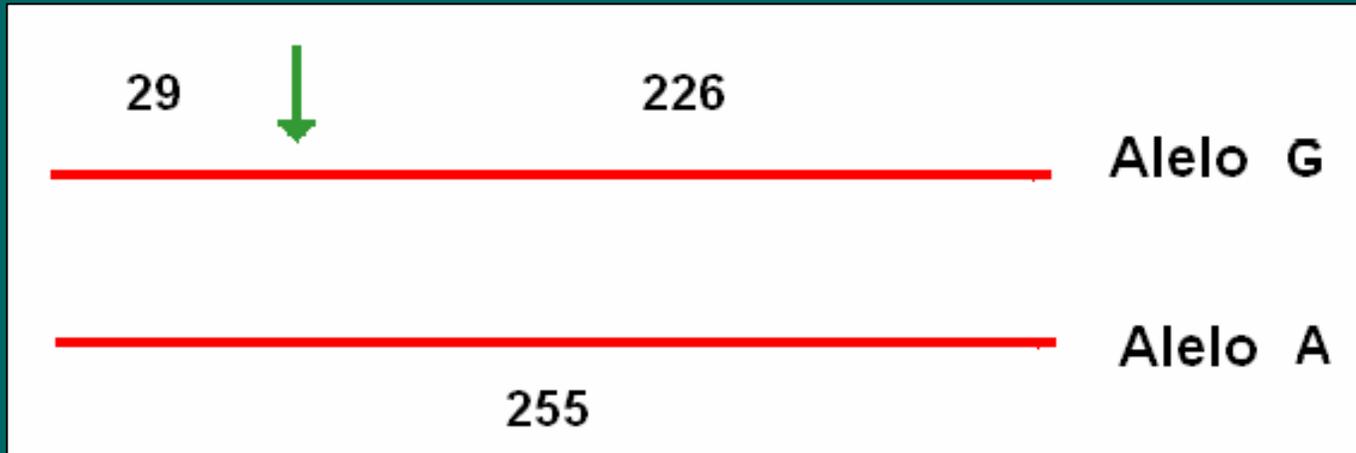


Oligonucleótidos (AY321517 Weikard, *et al.*, 2005):

- PPAR-8F: TCAGCAAGACCTCTGTGCTCAGCA¹
- PPAR-8R: TGCTCACCTCCGCGGTCTCT

(1) El primer forward tiene una sustitución en el antepenúltimo nucleótido para crear un sitio *Hae*III

RFLP: Con *Bst*I (GCA**G**TG↓NN↓)



Análisis del SNP del exón 8 de PPARGC1 α en toros y novillos

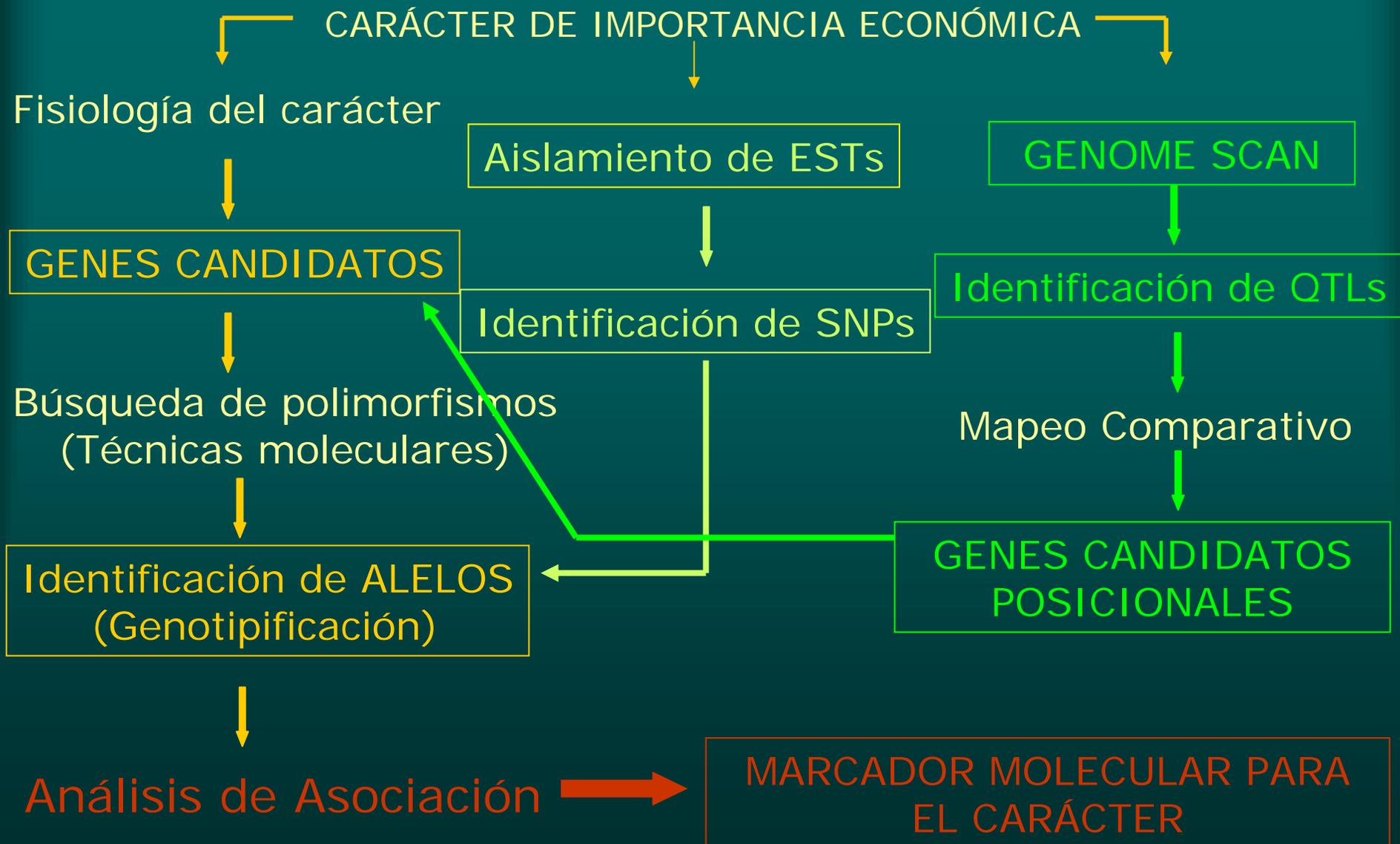
| Categoría / Raza | n | AA | AG | GG | |
|------------------|---------|-----|----|----|-----|
| TOROS | Angus | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | Brahman | 10 | 3 | 6 | 1 |
| | Nelore | 6 | 0 | 1 | 5 |
| | Brangus | 47 | 1 | 13 | 33 |
| NOVILLOS | Angus | 21 | 0 | 0 | 21 |
| | Brangus | 247 | 4 | 50 | 193 |

Medias y errores estándar del SNP del exón 8 de PPARGC1 α en novillos Brangus

| GENOTIPO | GG | AG |
|----------------------|------------------|------------------|
| n | 193 | 50 |
| PV (kg) | 449 \pm 3 | 450 \pm 6 |
| EGD (mm) | 6,62 \pm 0,12 | 6,45 \pm 0,22 |
| PGR (g) | 3,09 \pm 0,08 | 2,98 \pm 0,16 |
| %GR | 1,21 \pm 0,29 | 1,15 \pm 0,05 |
| RC (kg) | 7,10 \pm 0,08 | 6,97 \pm 0,15 |
| Color (parámetro L*) | 37,70 \pm 2,12 | 37,72 \pm 2,25 |
| Color (parámetro b*) | 20,74 \pm 2,53 | 21,31 \pm 1,85 |

No se hallaron diferencias significativas entre genotipos para cada característica analizada ($P > 0,05$)

ESTRATEGIAS PARA IDENTIFICAR MARCADORES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA



PARTICIPANTES:

Investigadores:

- ✓ Ing. Agr. Pablo M. Corva, PhD (Unidad Integrada Balcarce)
- ✓ Ing. Carlos Mezzadra, MSc (Unidad Integrada Balcarce)
- ✓ Ing. Lilia Melucci, MSc (Unidad Integrada Balcarce)
- ✓ Ing. Agr. María Cristina Miquel, PhD (Fac. Veterinaria. UBA)
- ✓ Vet. Mariana Motter (Fac. Veterinaria. UBA)
- ✓ Med Vet Liliana A. Soria, MSc (Fac. Veterinaria. UBA)
- ✓ Ing. Edgardo Villarreal (Unidad Integrada Balcarce)

Becarios:

- ✓ Lic. Georgina Fernández Macedo
- ✓ Lic. Juliana Papaleo

Tesista:

- ✓ Lic. Andrea Branda Sica

Alumnos:

- ✓ Srta. Carolina Silvestro

FINANCIAMIENTO:

- ✓ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyecto BID 1728 OC/AR PICTR 00177)
- ✓ Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (Proyecto V046)
- ✓ Los animales fueron provistos por EEA-INTA Balcarce y la Asociación Argentina de Brangus

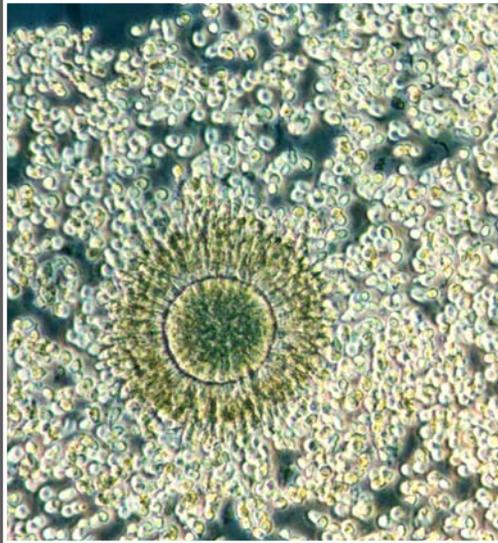
GENÉTICA CITOPLASMÁTICA

Meirelles et al.

Fernando Biase

FZEA - USP



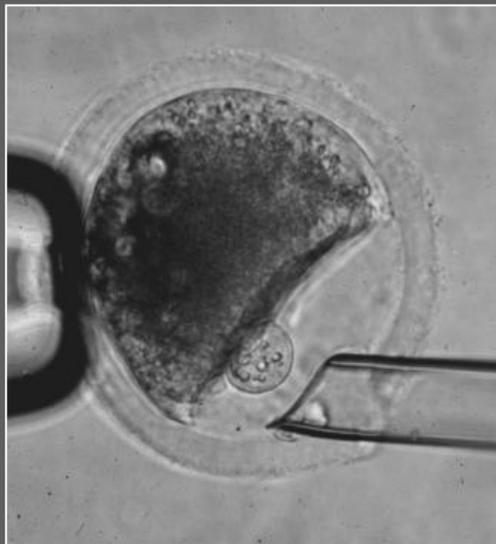


- ***Porque estudar embriogênese?***
- ***Porque a espécie Bovina?***
- ***Qual a importância?***

• *Porque estudar gametas e embriões*



- *Germoplasma*
- *Totipotência*
- *Vida Unicelular de um organismo pluricelular*
 - *Potencial de modificar todo um organismo.*



- ***Porque estudar embriogênese?***
- ***Porque a espécie Bovina?***
- ***Qual a importância?***

A PROXIMIDADE GENÉTICA COM HUMANOS

Distância calculada
por DNA mitocondrial

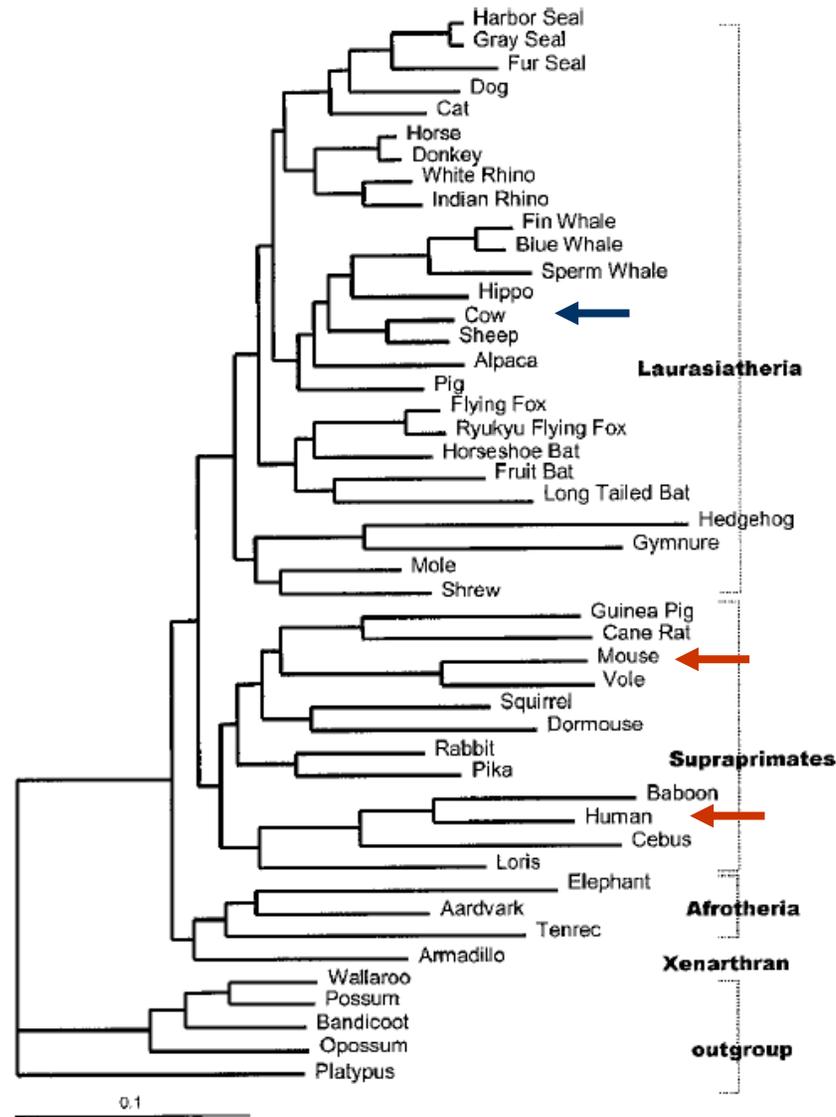


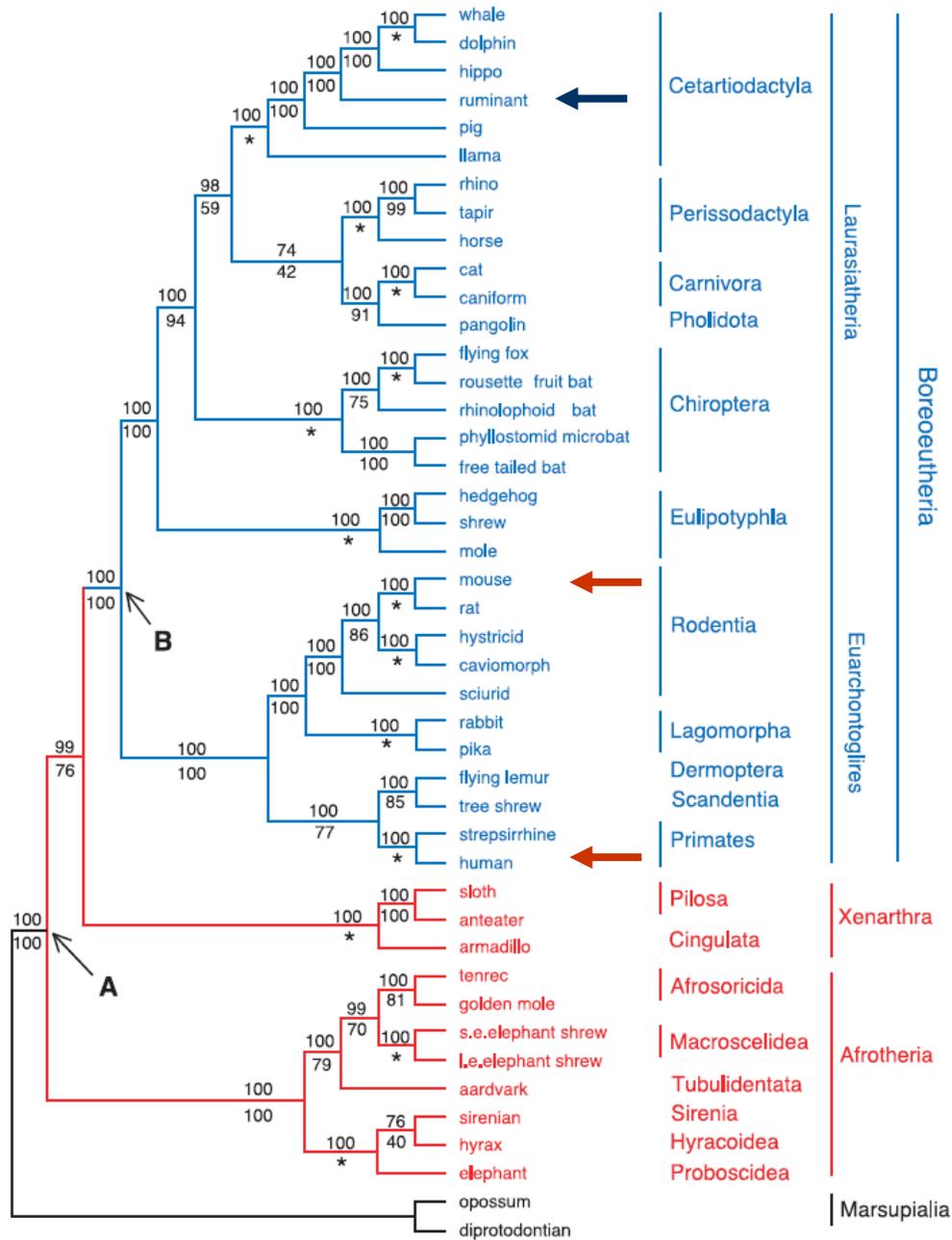
FIG. 5.—The tree with hedgehog–gymnure–mole–shrew constrained together. The eutherian root now separates the Xenarthran (armadillo) and the three Afrotherians from the Laurasiatherians and Supraprimates, and the ingroup tree is consistent with figure 3.

Lin et al. 2002.
Mol. Biol. Evol.
19 (12): 2060-2070



A PROXIMIDADE GENÉTICA COM HUMANOS

Distância calculada por DNA nuclear & mitocondrial

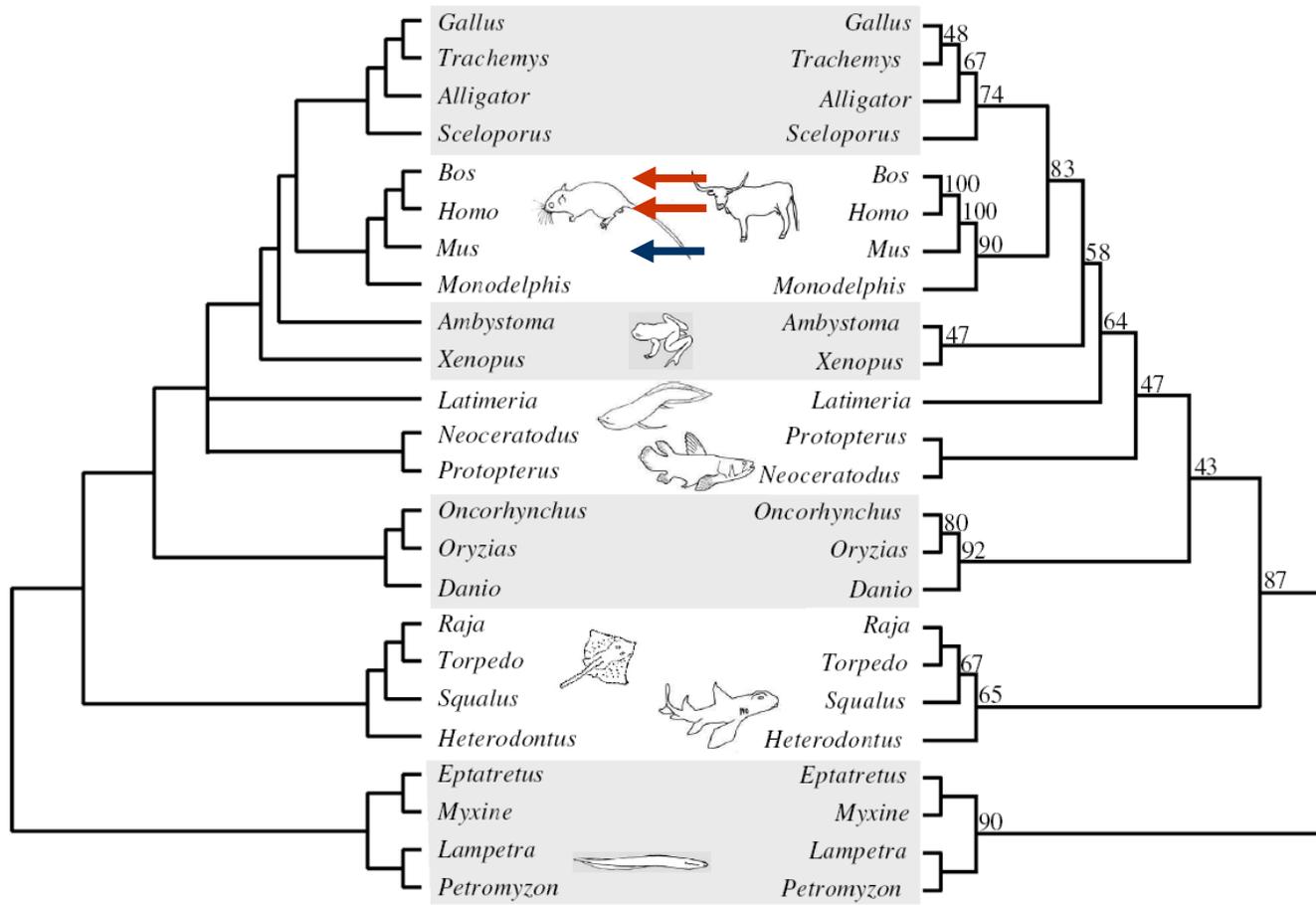


Murphy et al. 2001.
Science. 294:2348



A PROXIMIDADE GENÉTICA COM HUMANOS

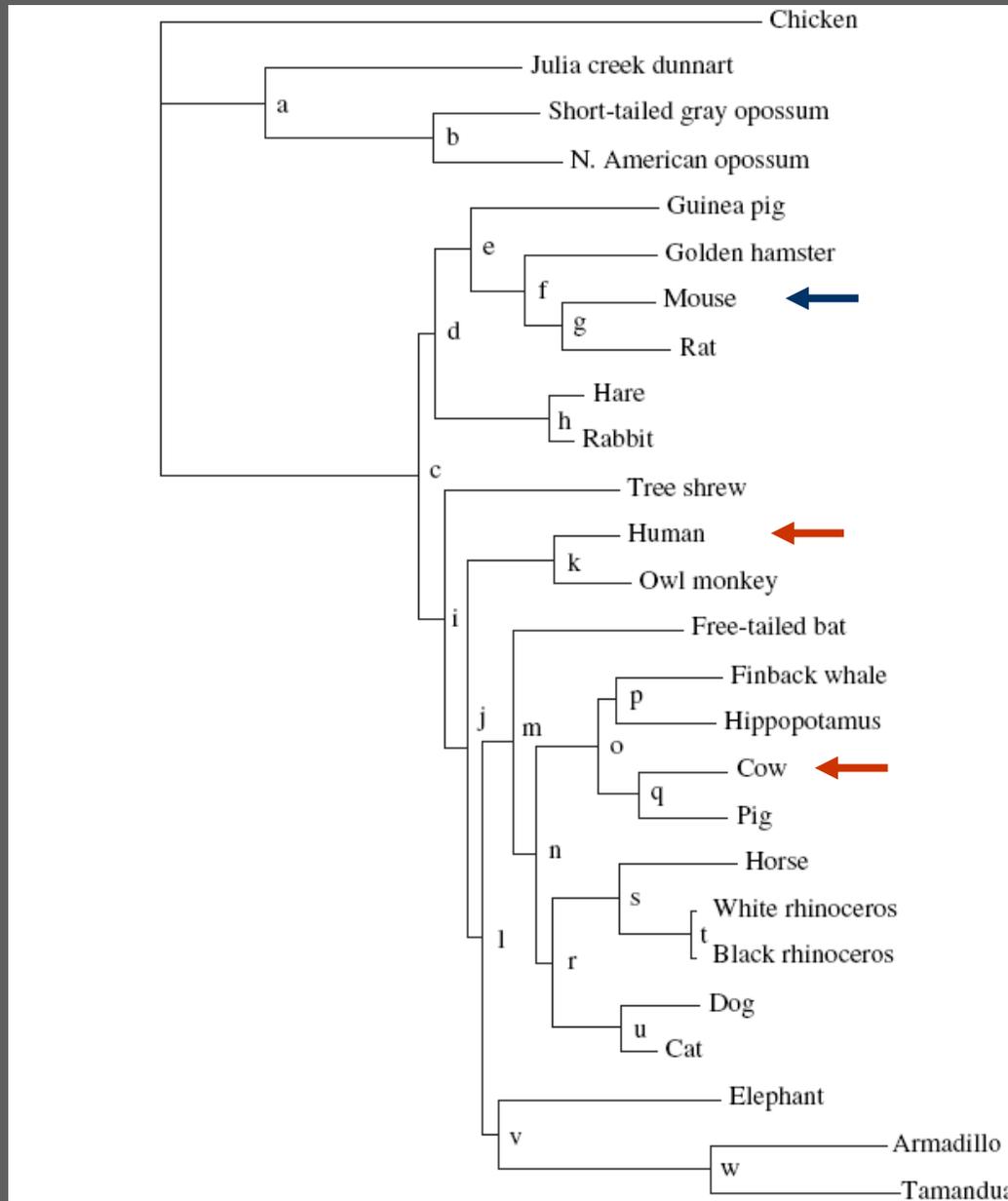
Distância calculada
por DNA nuclear



Cotton & Page. 2002.
Proc. R. Soc. London
269: 1555-1561

Figure 4. Phylogenies of vertebrates reconstructed using gene tree parsimony on a set of 118 nuclear genes. Alternate bands of shading and non-shading identify traditional higher taxonomic groups of vertebrates. (a) The strict consensus of three most parsimonious trees, each requiring 1380 gene duplications to fit the gene family trees. (b) The majority-rule consensus of 100 bootstrap replicates as described in § 2c. Figures on nodes are bootstrap percentages from this analysis.

A PROXIMIDADE GENÉTICA COM HUMANOS



Distância calculada
por DNA nuclear

Kullberg et al. 2006.
Mol. Biol. Evol. 23(8):
1493-1503





- *Porque estudar embriogênese?*
- *Porque a espécie Bovina?*
- *Qual a importância?*

Balança do Agronegócio Brasileiro

- Saldo de US\$ 25,8 bi em 2003
- Exportações somaram US\$ 30,6 bi
- Principais itens:
- Complexo soja – R\$ US\$ 8,1 bi;
- **Bovinos – US\$ 4,1 bi**;
- Suínos e aves – US\$ 2,5 bi
- Cana e sacarídeas – US\$ 2,3 bi

Fonte: IEA

Balança do Agronegócio Paulista

- Saldo de US\$ 4,5 bi em 2003
- Exportações somaram US\$ 7,67 bi
- Principais itens:
 - **Bovinos – US\$ 1,61 bi**
 - Cana e sacarídeas – US\$ 1,52 bi
 - Laranja – US\$ 1,22 bi
 - Produtos florestais – US\$ 1,10 bi
 - Cereais e leguminosas – US\$ 470 mi

Fonte: IEA



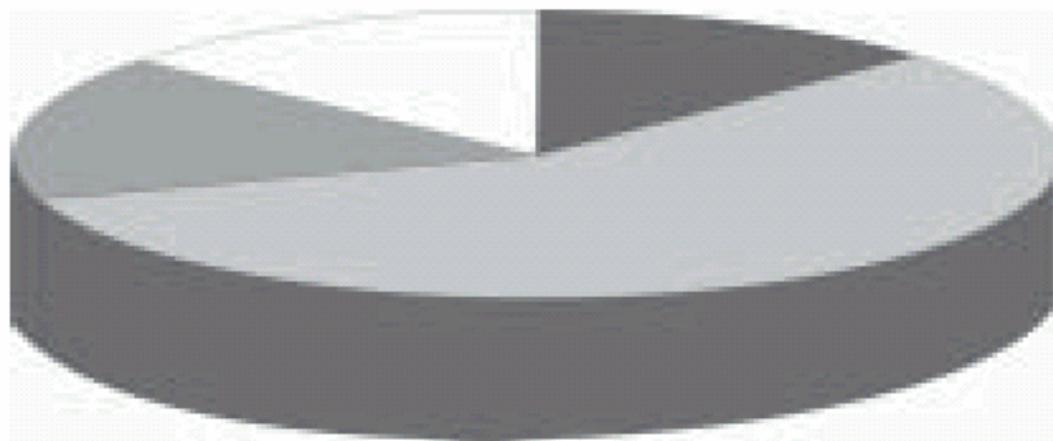


Fig. IV.1 — *Distribuição do crescimento da demanda de proteína de origem animal no mundo, adaptado de Roberts., 2001.*

• **MODALIDADE DE HERANÇA CITOPLASMÁTICA**



- **Herança mitocondrial**
- **Herança Citoplasmática germinal**



• **CONTEÚDO**

• **Herança mitocondrial**

1. Introdução

**2. Modo de herança
mitocondrial**

3. Modelo de herança relaxado

**4. Segregação e o gargalo
genético**

**5. Transferência de citoplasto e
carioplasto**

6. Modelo Murino

7. Modelo Bovino

**8. Efeito do mtDNA na produção
zootécnica**

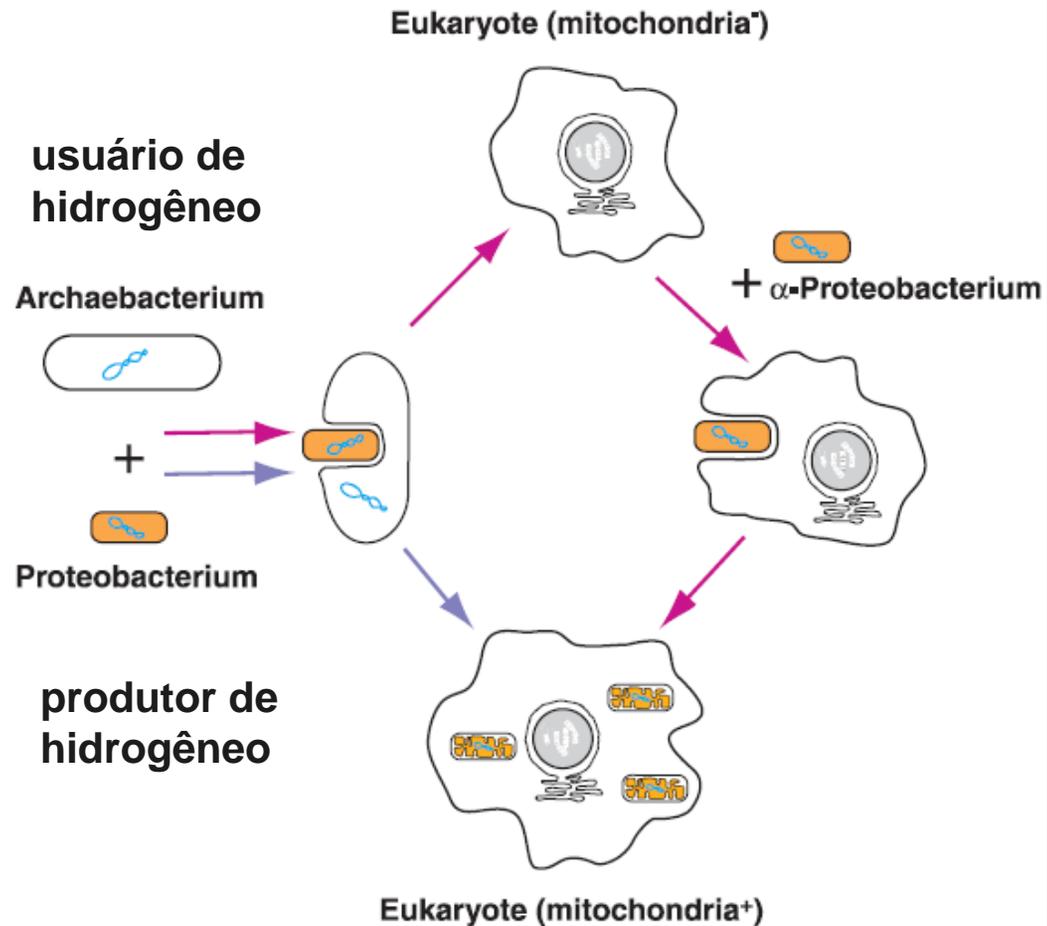
9. Conclusões



ORIGEM DA MITOCÔNDRIA

Hipótese da origem endossimbiótica

Fig. 3. Alternative hypotheses describing the origin of eukaryotic cell. Lavender arrows, simultaneous creation of the eukaryotic nucleus (gray) and mitochondrion (orange) by fusion of a hydrogen-requiring, methanogenic Archaeobacterium (host) with a hydrogen-producing α -Proteobacterium (symbiont) (58). Magenta arrows, two-step scenario, initially involving formation of an amitochondriate eukaryote by fusion of an Archaeobacterium and a Proteobacterium (46) followed by acquisition of the mitochondrion through endosymbiosis with an α -Proteobacterium. Bacterial and mitochondrial genomes are blue.



HIPÓTESE QUE JUSTIFICARIA A HERANÇA MATERNA

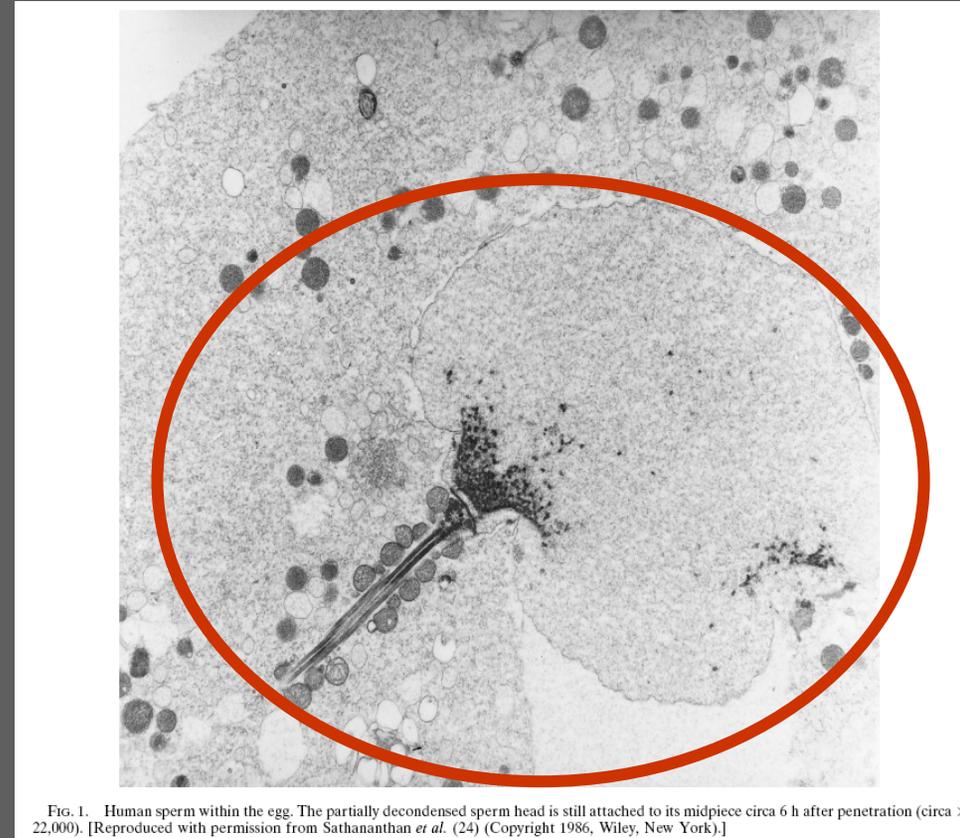
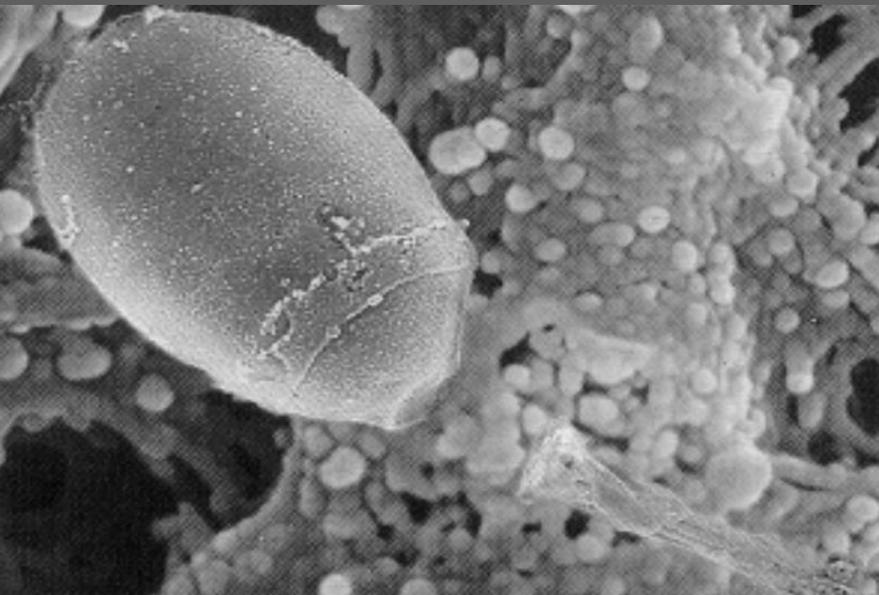
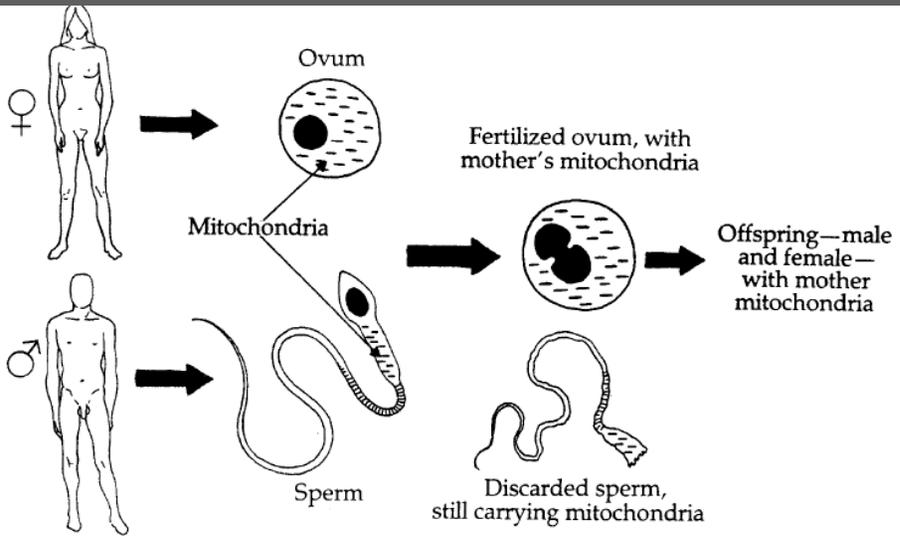
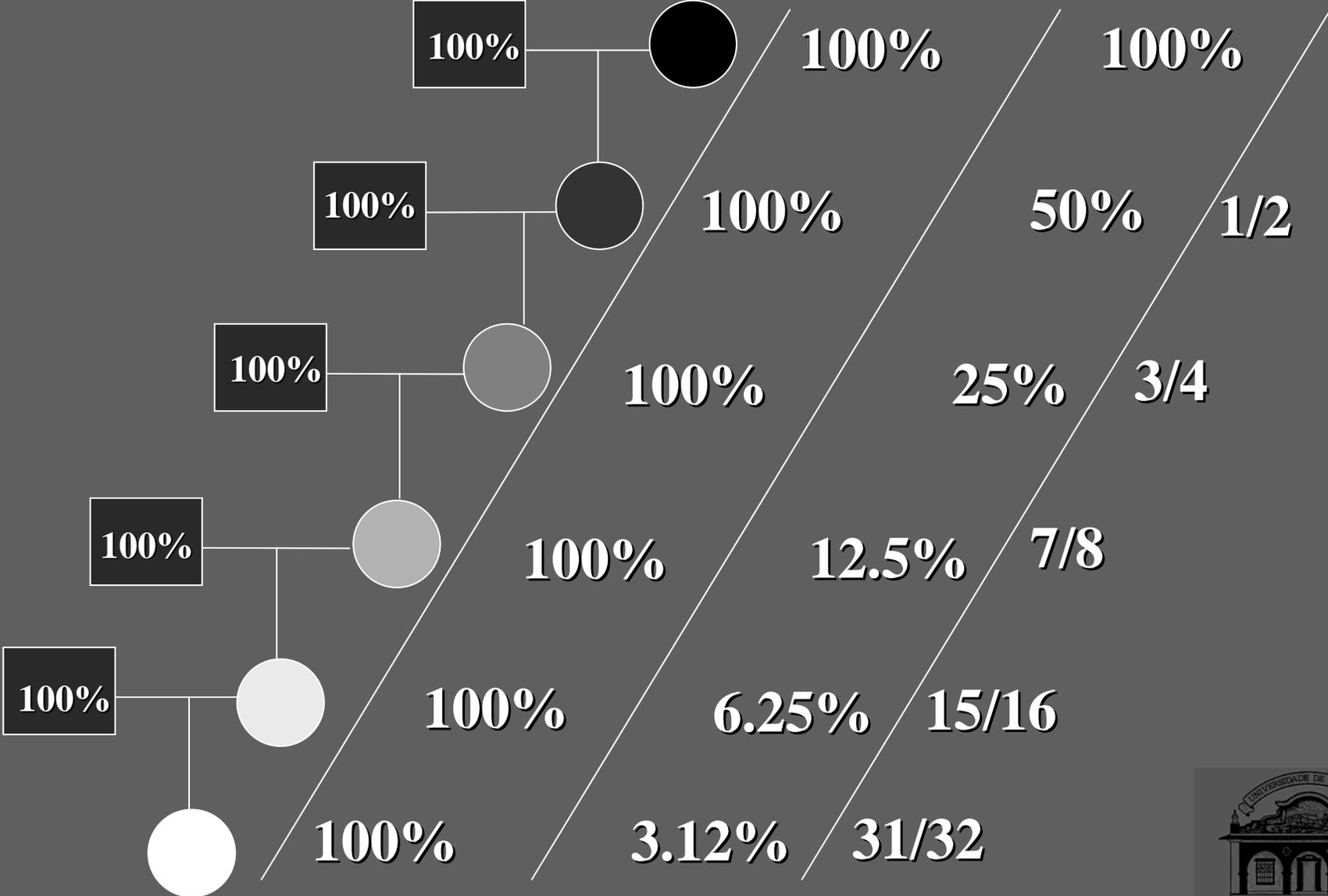


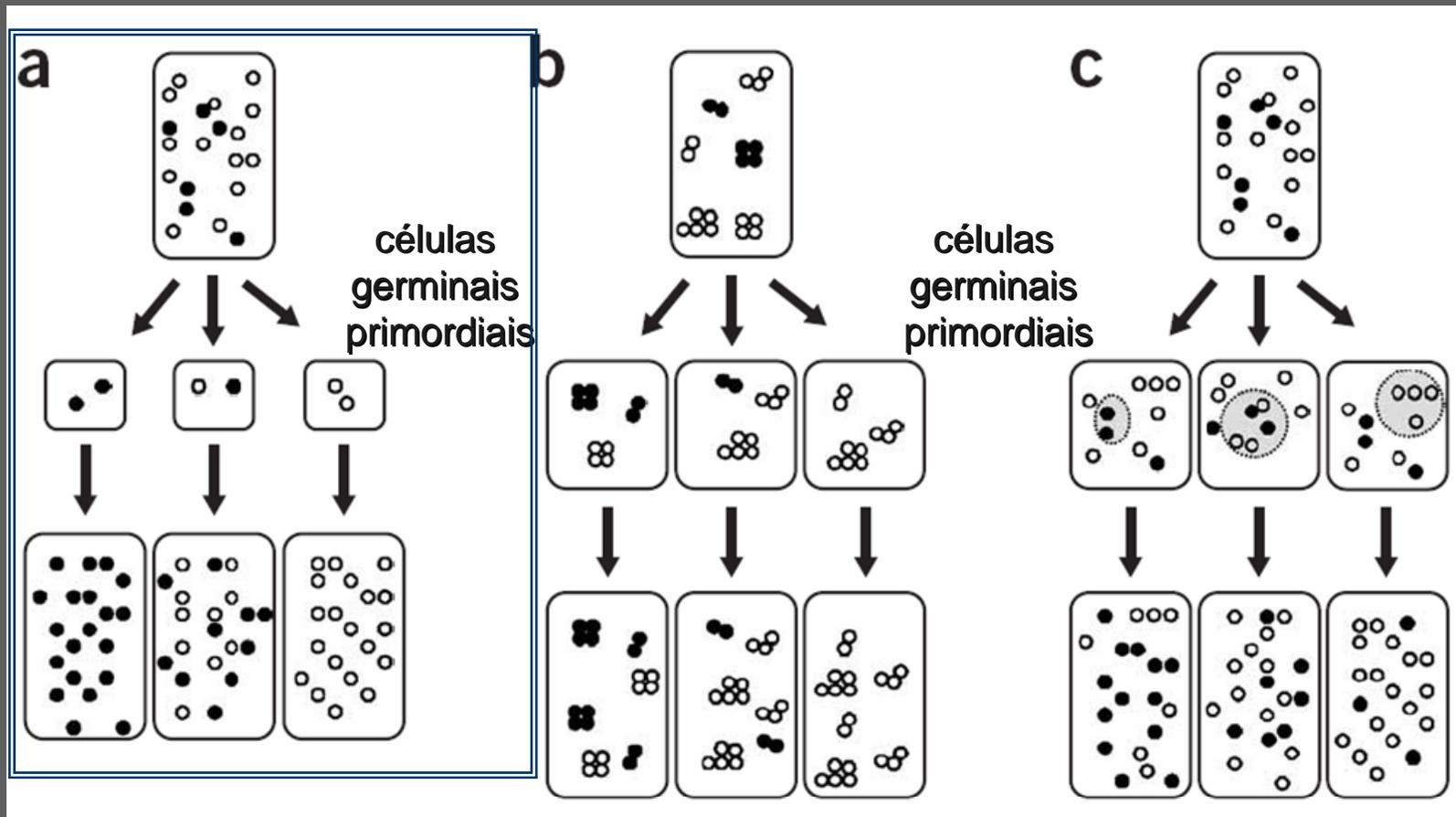
FIG. 1. Human sperm within the egg. The partially decondensed sperm head is still attached to its midpiece circa 6 h after penetration (circa $\times 22,000$). [Reproduced with permission from Sathanathan *et al.* (24) (Copyright 1986, Wiley, New York).]

*Ankel-Simons & Cummins, 1996.
Proc Natl Acad Sci U S A. 93(24):13859-63.*

Citoplasma Núcleo



GARGALO GENÉTICO

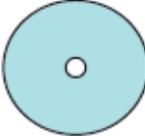


REDUÇÃO MASSIVA NA
QUANTIDADE DE mtDNA
SEGREGAÇÃO ESTOCÁSTICA

SEGREGAÇÃO ESTOCÁSTICA
DE NUCLEÓIDES DE mtDNA

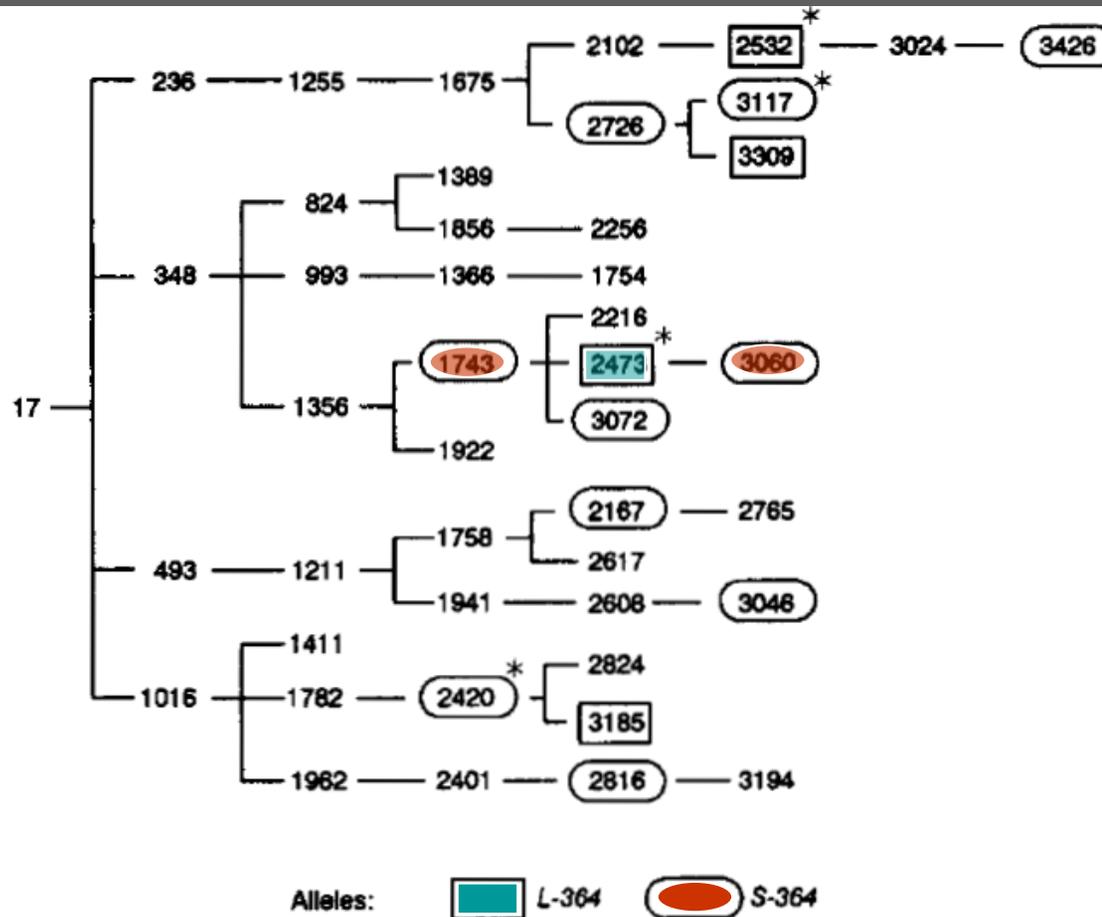
REPLICAÇÃO RELAXADA
DE SUBGRUPOS DE mtDNA

GARGALO GENÉTICO

| | | Number of cells | Number of mitochondria per cell | Developmental stage |
|----------------------------|---|-----------------|---------------------------------|---------------------|
| Primordial germ cell |  | ~45 | 10 | 3 week fetus |
| Oogonium |  | ~520 000 | 200 | 9 week fetus |
| Diplotene primary oocyte |  | ~7 000 000 | 5000 | 20 week fetus |
| Primordial follicle |  | ~ 2 000 000 | 10 000 | Neonate |
| Mature preovulatory oocyte |  | ~300 000 | > 100 000 | Adult |

mtDNA replacement in mother-daughter pairs

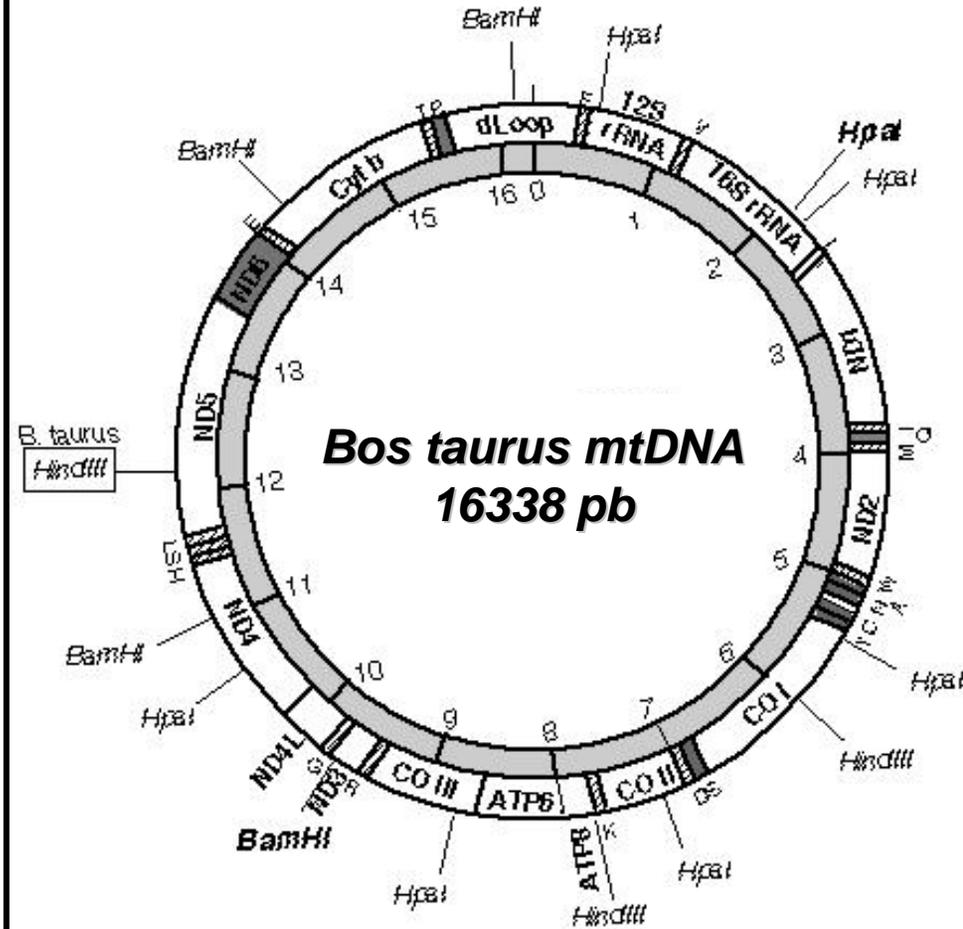
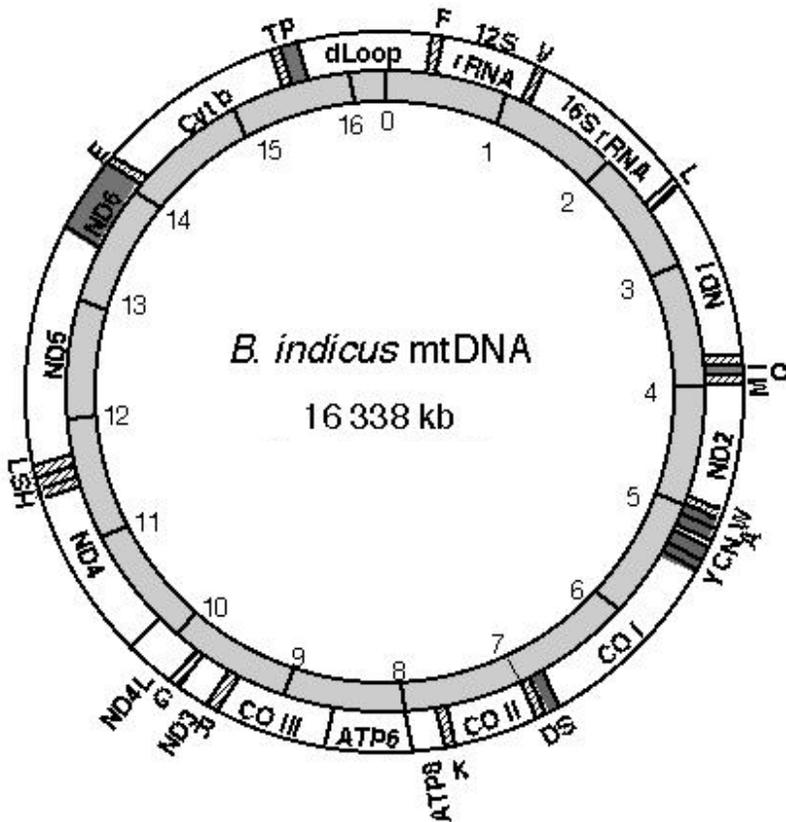
| Genotype of mother | No. of daughters | |
|--------------------|------------------|----------------|
| | Genotype L-364 | Genotype S-364 |
| L-364 | 9 | 5 |
| S-364 | 8 | 10 |



Koehler et al., 1991. Genetics. 129: 247-55.

Hauswirth et al., 1984. Cell. 37: :1001-7.

DNA MITOCHONDRIAL (mtDNA) BOVINOS



Andersen et al., 1981. Nature 290: 457-465

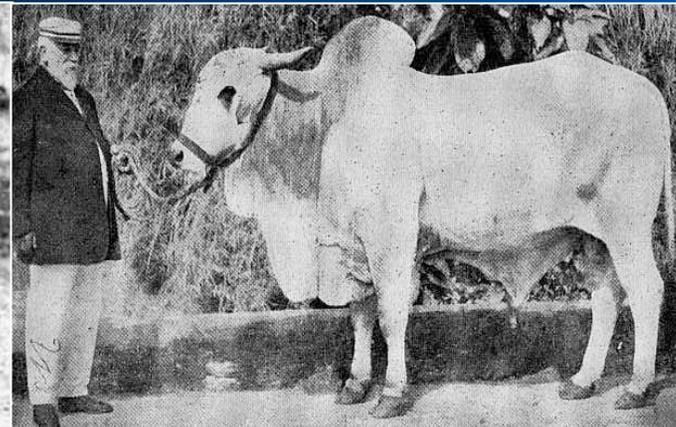
Bibb et al., 1981. Cell 26:167-180

Attardi, 1985. Int Rev. Cytology 93:93-145

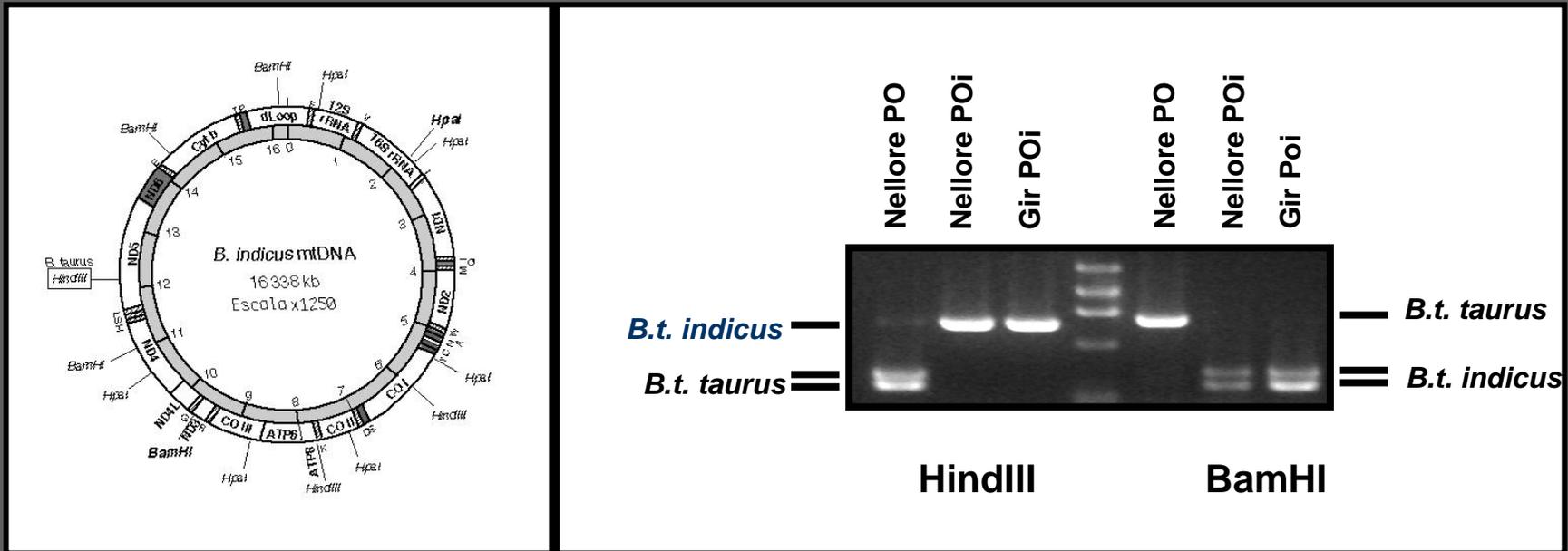
Anderson et al., 1982. J Mol Biol. 156:683-717

Meirelles et al., 1999. G&MB 22 (4) 543-546

A VINDA DO ZEBU



MTDNA EUROPEU/ZEBU



FREQÜÊNCIA DO GENOMA INDICUS NA POPULAÇÃO ZEBU

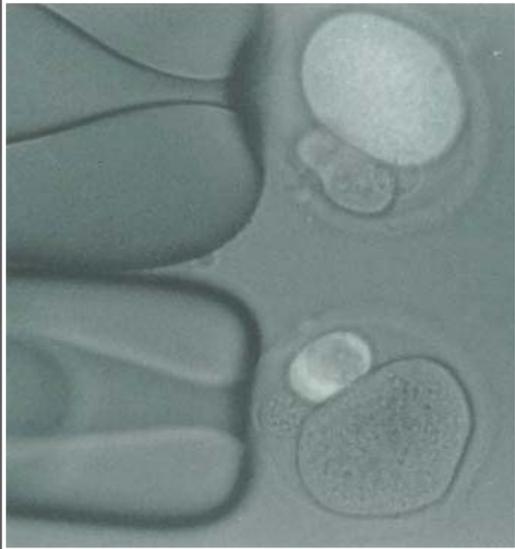
| Raça | Registro | Número | mtDNA | |
|--------------|----------|------------|------------------|-----------------|
| | | | taurus | indicus |
| Nelore | PO | 48 | 38 (79%) | 10 (21%) |
| | POI | 35 | 09 (26%) | 26 (74%) |
| Gir | PO | 15 | 11 (73%) | 04 (27%) |
| | POI | 04 | 01 (25%) | 03 (75%) |
| Brahman | n.a.* | 23 | 23 (100%) | ∅ |
| Total | | 124 | 81 (65%) | 43 (35%) |

n.a. = Não aplicável; PO = Puro de origem; POI = Puro de origem importada.



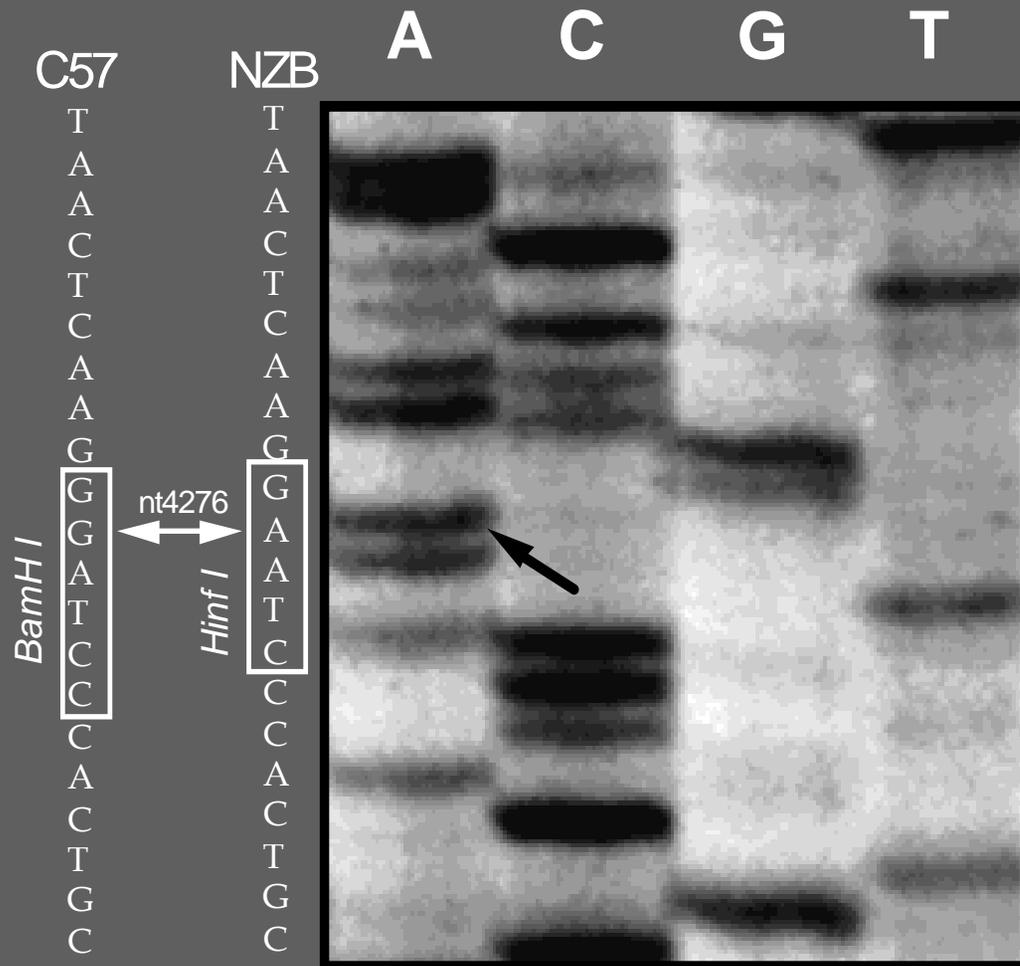
- *O DNA mitocondrial se presta para estudos de filogenética e determinação da formação dos animais B. indicus na América*
- *Uma raça formada com duas origens mitocondriais é um excelente modelo de estudo de segregação mitocondrial no período embrionário e adulto.*

TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASTO



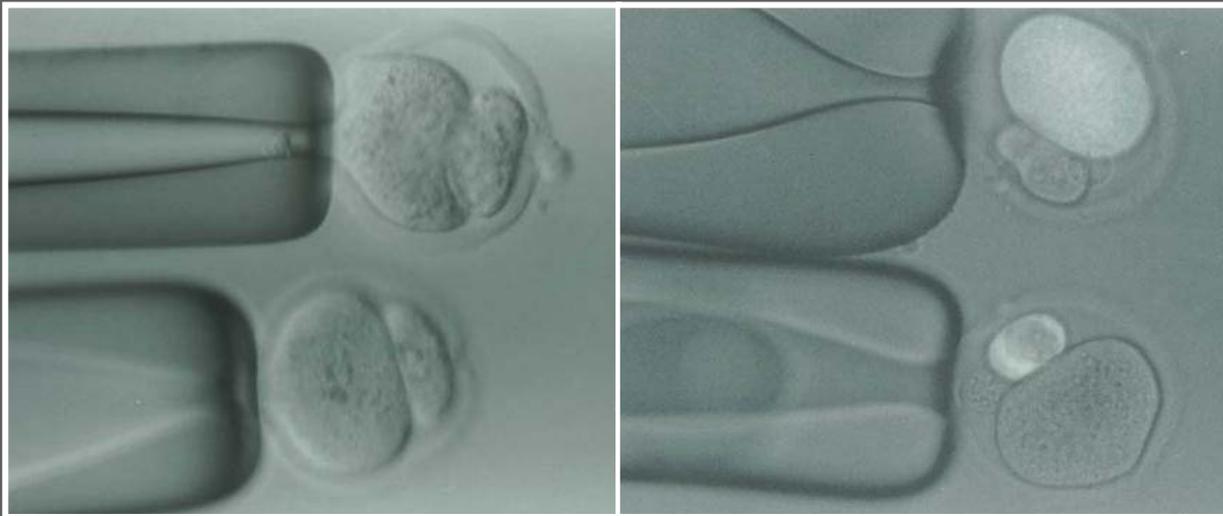
MODELO CAMUNDONGO

POLIMORFISMO NO NZB/BINJ



ESTUDOS DA HERANÇA MITOCONDRIAL

- **Produção de modelos de estudo**
- **Efeito do citoplasma sobre a produção dos embriões**
- **Biotecnologia citoplasmática**



***Meirelles & Smith 1997; 1998. Genetics
McGrath & Solter, 1984. Science 226:1317***

MURINOS PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA DE CARIOPLASTO

TABLE 1

Percentage karyoplast-origin mtDNA in tissues of adult animals derived from reconstituted zygotes

| Reconstructed animals | Brain | Heart | Lung | Liver | Muscle | Tail |
|-----------------------|-------|-------|------|-------|--------|------|
| Female 1 | 17.4 | 69.0 | 0.6 | 58.3 | 63.5 | 21.0 |
| Female 2 | NA | NA | NA | NA | NA | 5.3 |
| Male 1 | None | None | None | 7.0 | None | None |
| Male 2 | NA | 4.1 | 9.8 | 4.5 | 1.4 | NA |
| Male 3 | None | None | None | None | 4.0 | NA |
| Male 4 | None | None | NA | None | 10.8 | NA |

NA, tissue was not analyzed.

LINHAGEM F1NZNZB

mtDNA-NZB/BINJ Mitochondrial Genotype Segregation in Mice

449

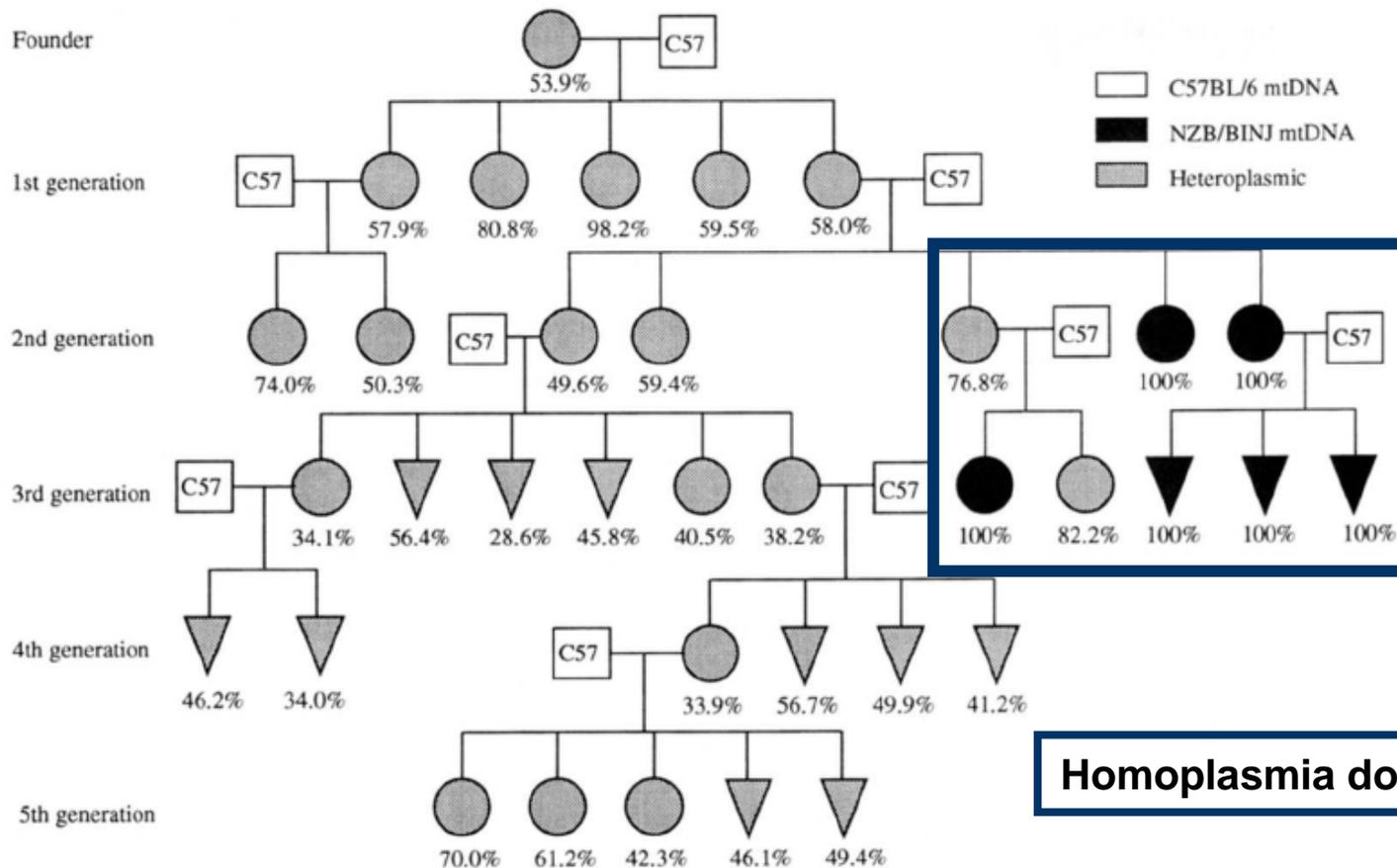
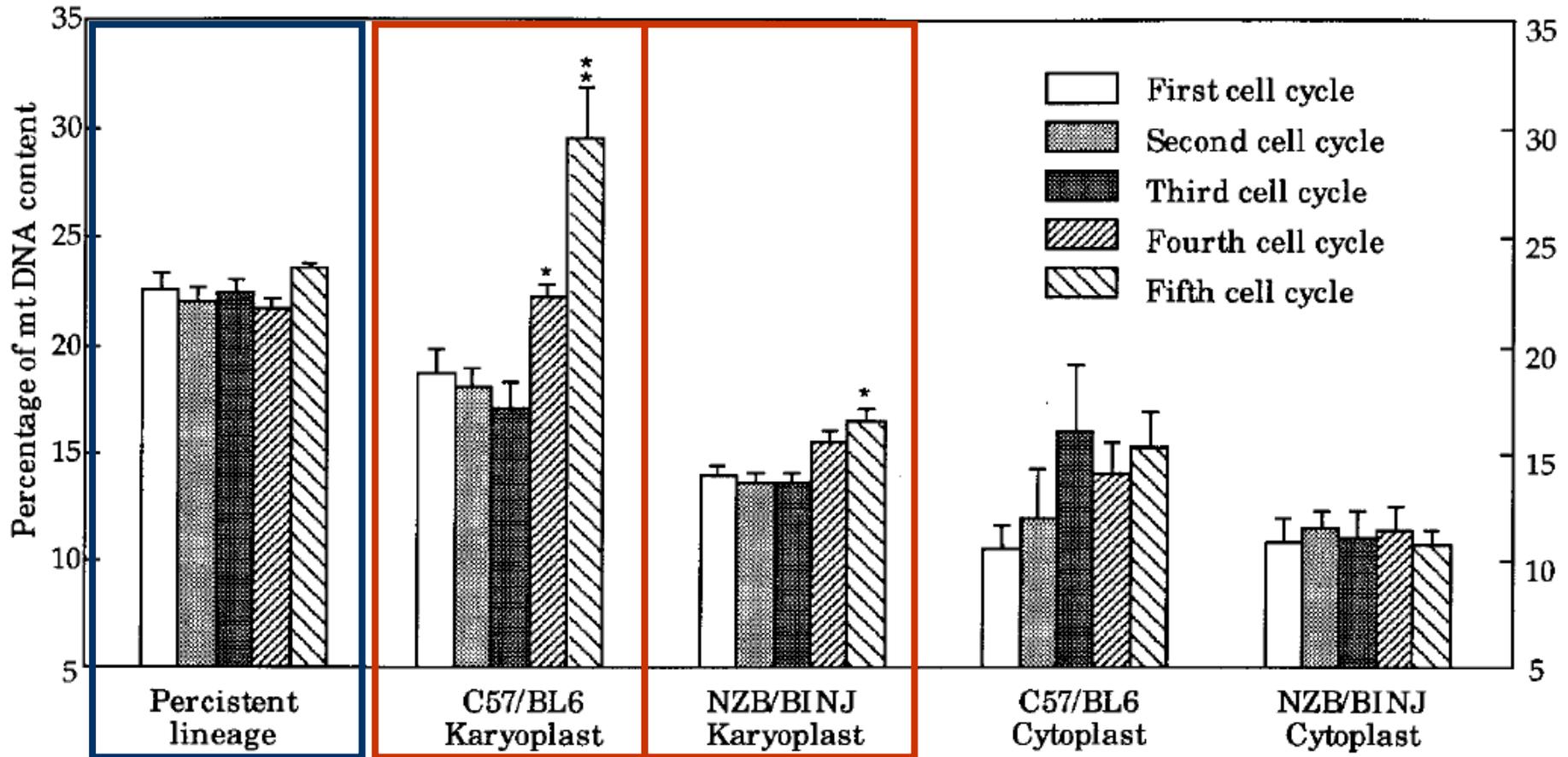


FIGURE 4.—Matrilinal pedigree of heteroplasmic female obtained from NZB-C57BL/6 reconstituted zygote. Average NZB/BINJ mtDNA percentages values for several tissues are given beneath gray (heteroplasmic) and black (homoplasmic for NZB/BINJ mtDNA) circles. Females were always mated to pure C57BL/6 (homoplasmic C57BL/6 mtDNA) males (squares).

Homoplasma do mtDNA transferido



SEGREGAÇÃO INICIAL

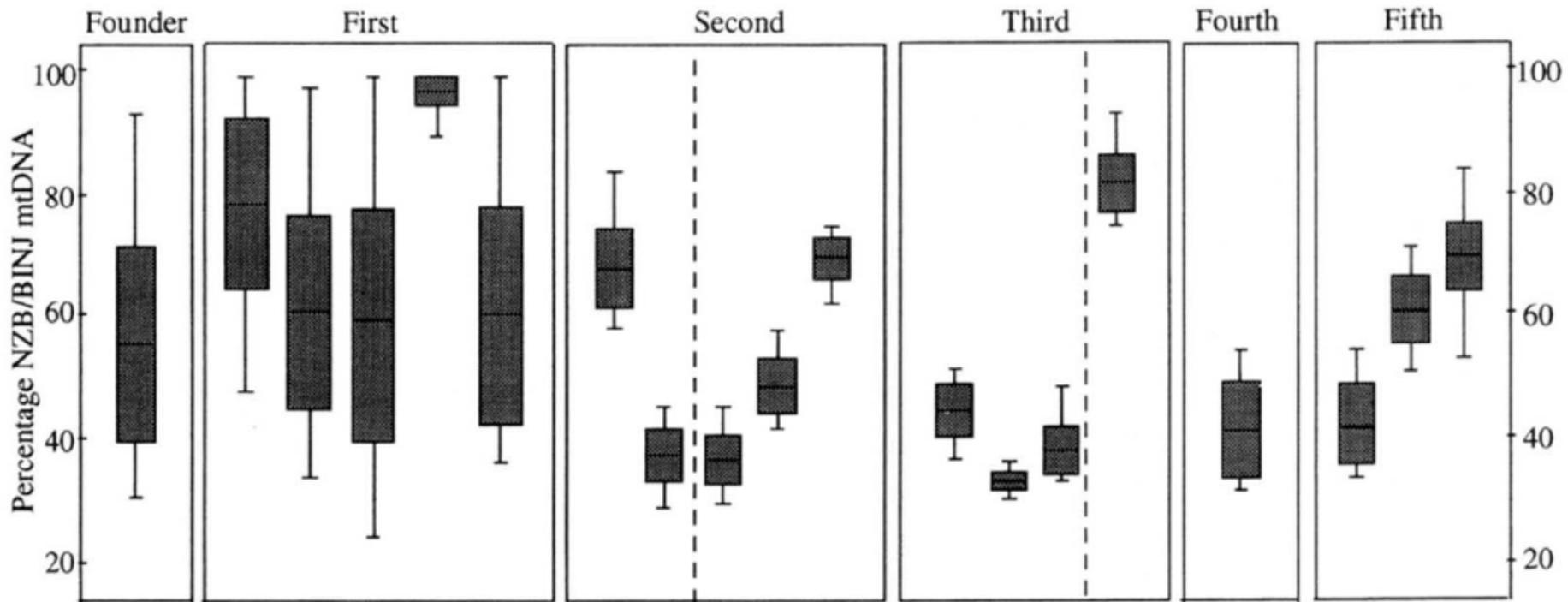


Nos primeiros ciclos celulares, existe preferência replicacional das mitocôndrias peri-nucleares.

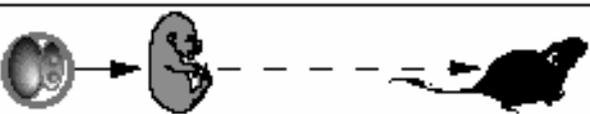
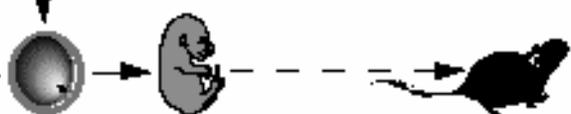
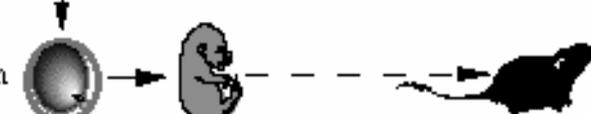


SEGREGAÇÃO DO MTDNA ENTRE TECIDOS E PROGÊNIE

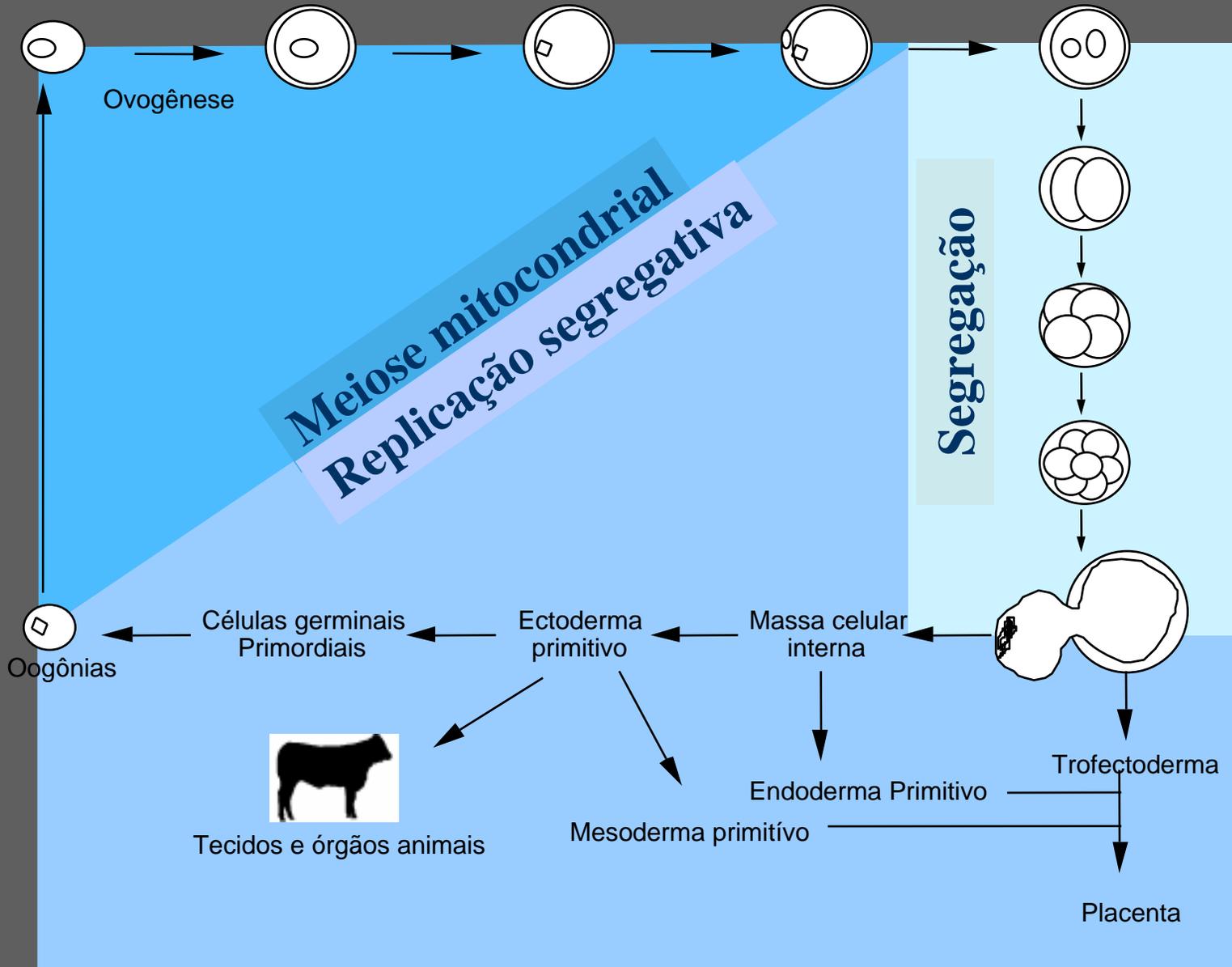
mtDNA-NZB/BINJ



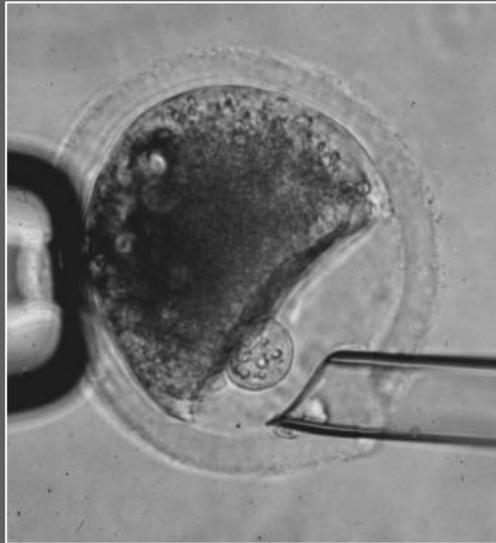
HIPÓTESE

| Mitochondrial segregation in heteroplasmic lineage | Heteroplasmy | | Whole animal homoplasmy |
|---|----------------------|----------------------|-------------------------|
| | Tissue heterogeneity | Litter heterogeneity | |
| <p>Founder</p>  | + | n.a. | - |
| <p>1st generation</p>  | + | + | - |
| <p>2nd generation</p>  | - | + | + |
| <p>3rd generation</p>  | - | - | + |

HERANÇA MITOCONDRIAL

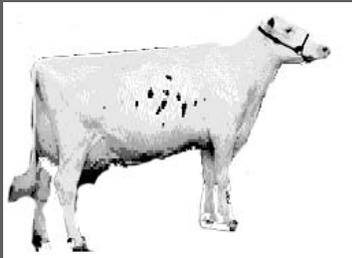
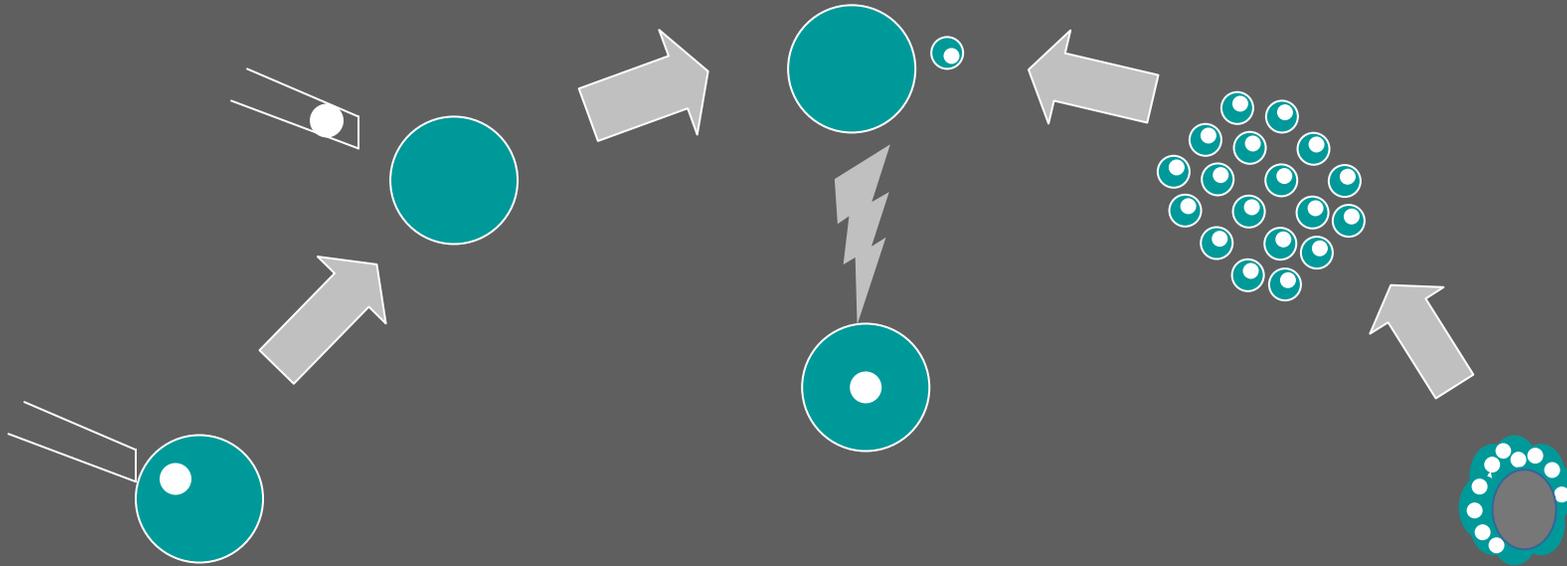


TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASTO



MODELO BOVINO

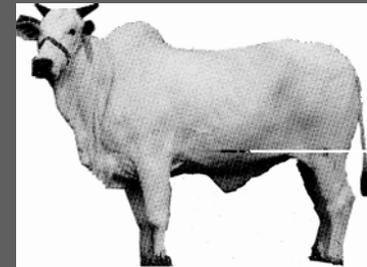
RECONSTRUÇÃO INTERESPECÍFICA



Bos taurus

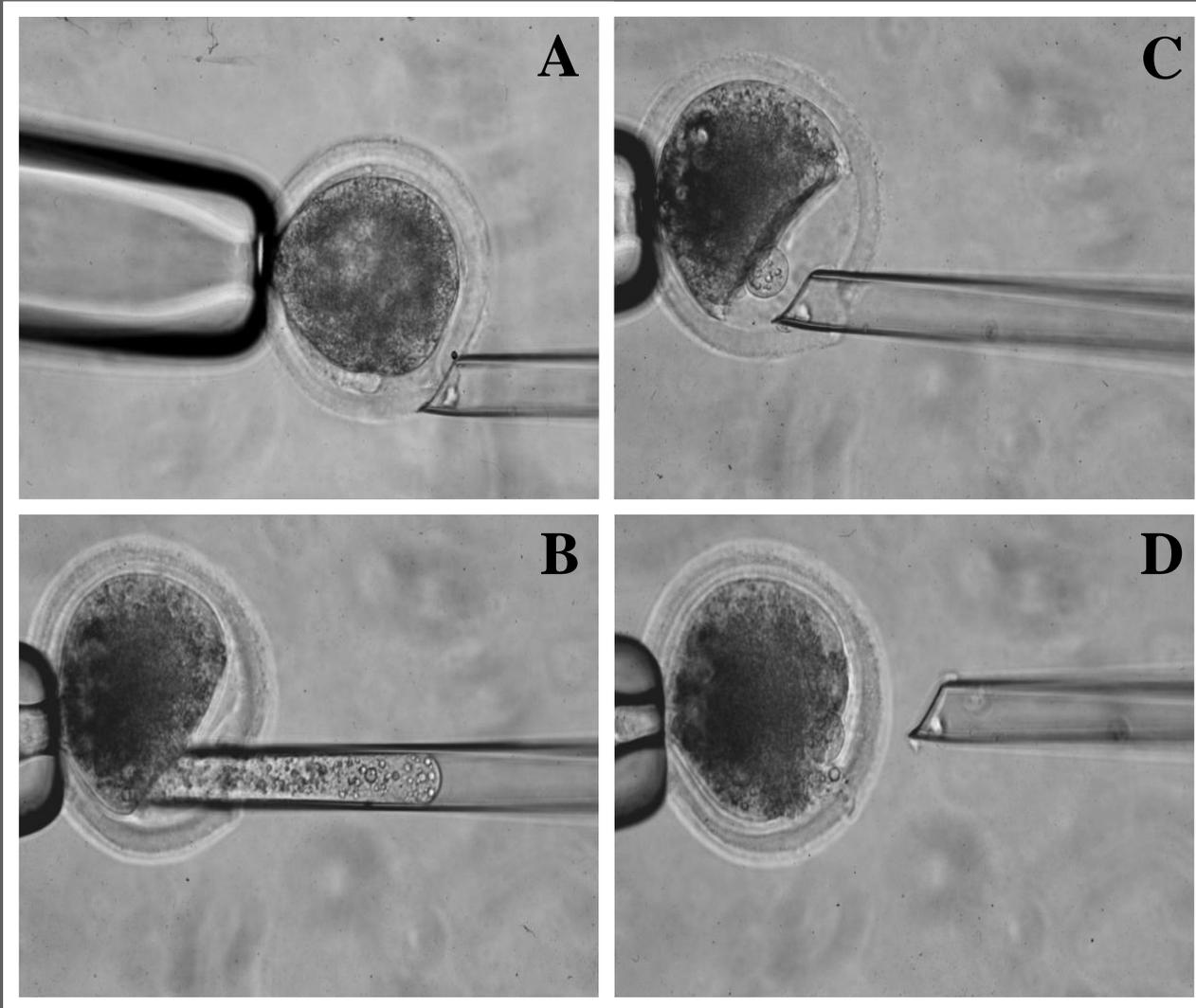
***Sobrevivência do
mt DNA B. indicus***

?

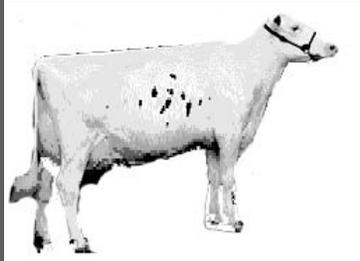


Bos indicus

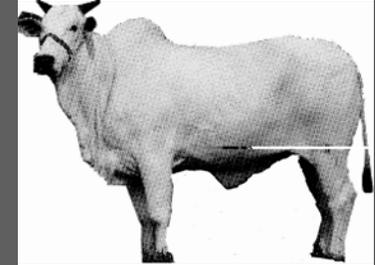
TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO



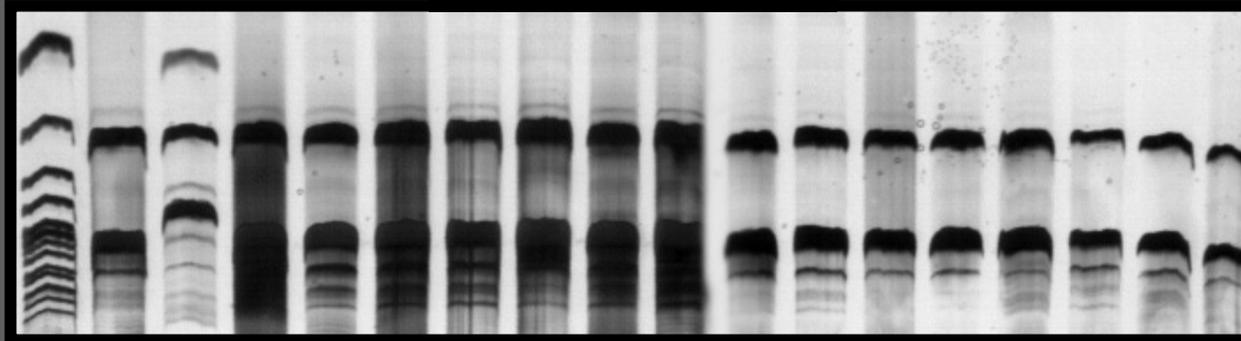
mtDNA B. taurus após gestação



Bos taurus
mtDNA



Bos indicus
nDNA



DNA ladder

Bos taurus

Bos indicus

Corium

Muscle

Lymphnode

Peritoneum

Spleen

Umbilical

Bladder

Corium

Cotiledon

Cotiledon

Amnion

Reticulum

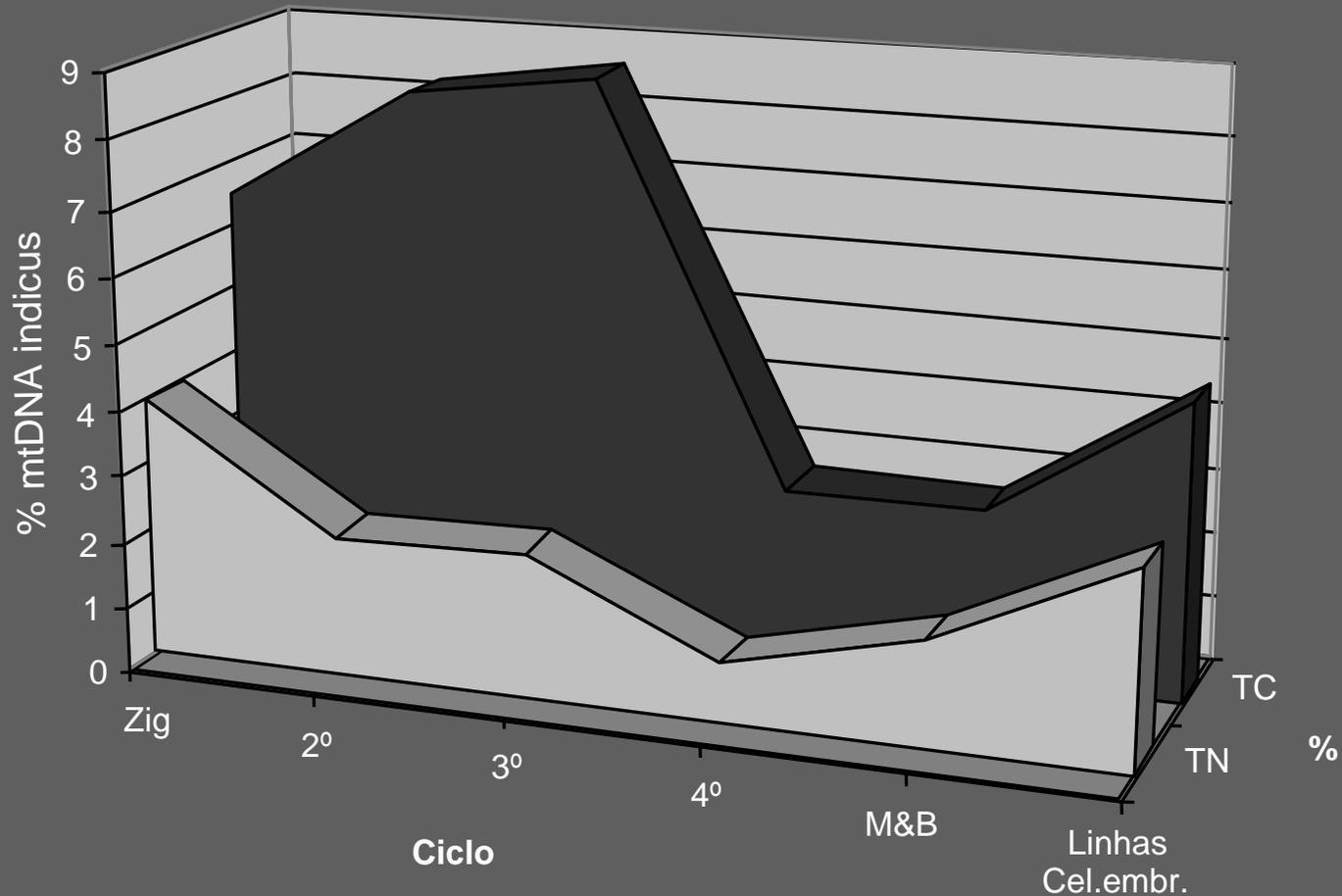
Amnion

Corium

Liver

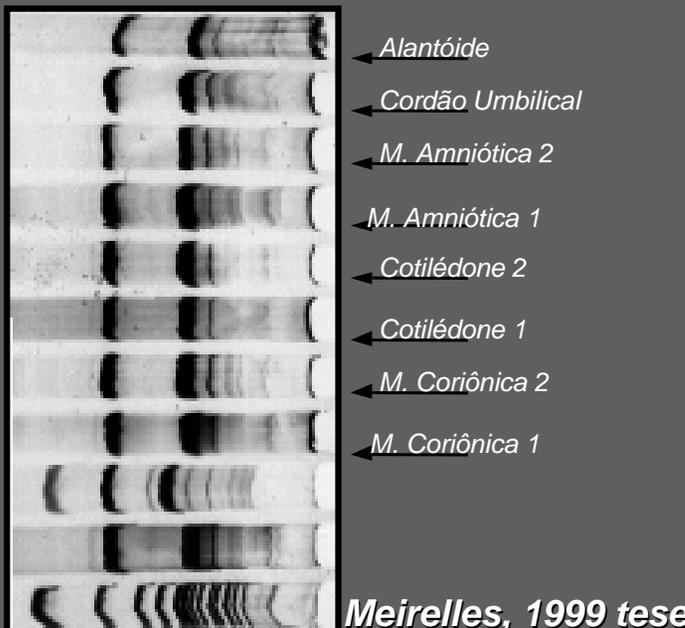
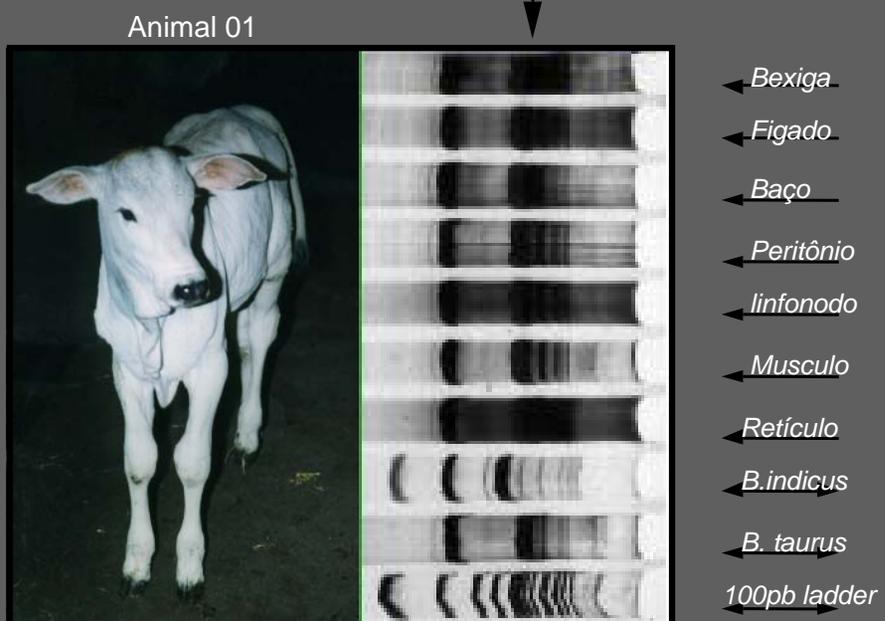
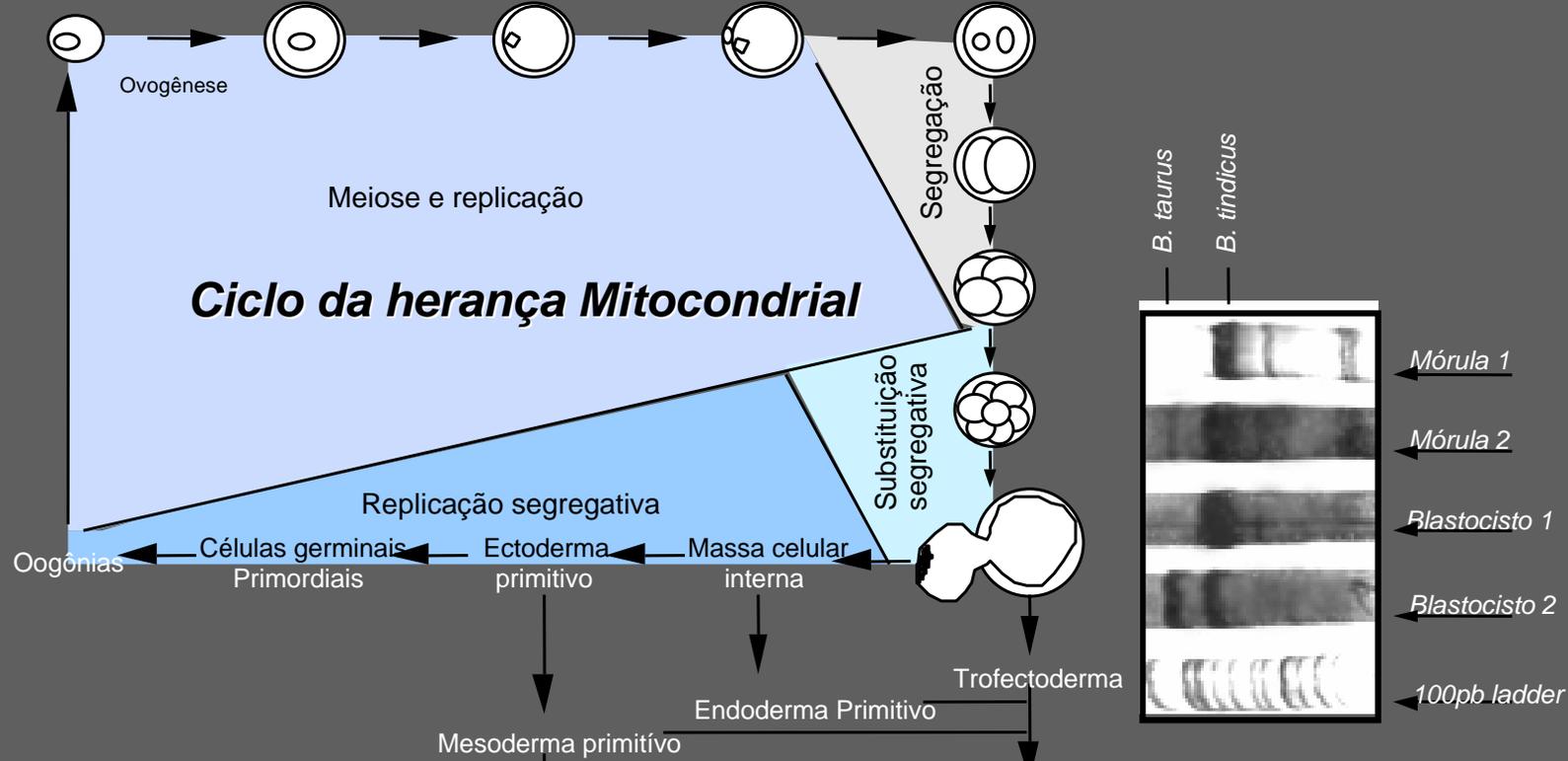


SEGREGAÇÃO INICIAL



- Transferência de núcleo
- Transferência de citoplasto



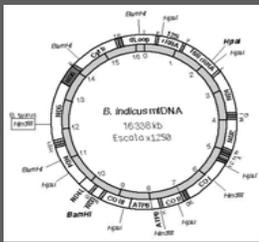


Meirelles, 1999 tese de doutorado

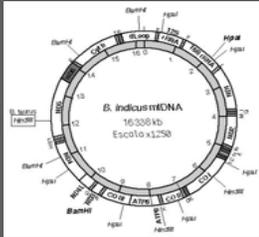
McConnell et al., 2004 Mitochondrial DNA turnover occurs during pre-implantation development and can be modulated by environmental factors. *Reprod Biomed Online*. 2004 4: 418-24

Conclusões

- *Embriões produzidos por transferência de núcleo são bons modelos para o estudo da herança mitocondrial*
- *A herança mitocondrial nos clones é capaz de reproduzir o gargalo genético mitocondrial*
- *Tendo em vista os resultados de transferência de núcleo é possível trocar o mtDNA de um indivíduo, é no entanto importante demonstrar que de fato existem variações na produtividade induzidas por este genoma.*



mtDNA *Bos indicus*



Alguns indivíduos com mtDNA indicus possuem variações em relação ao mtDNA taurus

Existe variações intrínsecas ao mtDNA do tipo indicus?

Outros indivíduos com mtDNA indicus não possuem variações em relação ao mtDNA taurus

| RNA ^t | Primer sequence 5'—3' | Annealing Temperature | Base substitution ^a | Enzyme Restriction |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---|-----------------------|
| Asparagine | | | 72.46% possuíam nucleotídeo da mtDNA taurus | |
| Cysteine | | | Monomórfico mtDNA indicus | |
| Glycine | | | Monomórfico mtDNA indicus | |
| Leucine | | | 95.23 % possuíam nucleotídeo da mtDNA taurus | |
| Proline | | | 90.62% possuíam nucleotídeo da mtDNA taurus | |

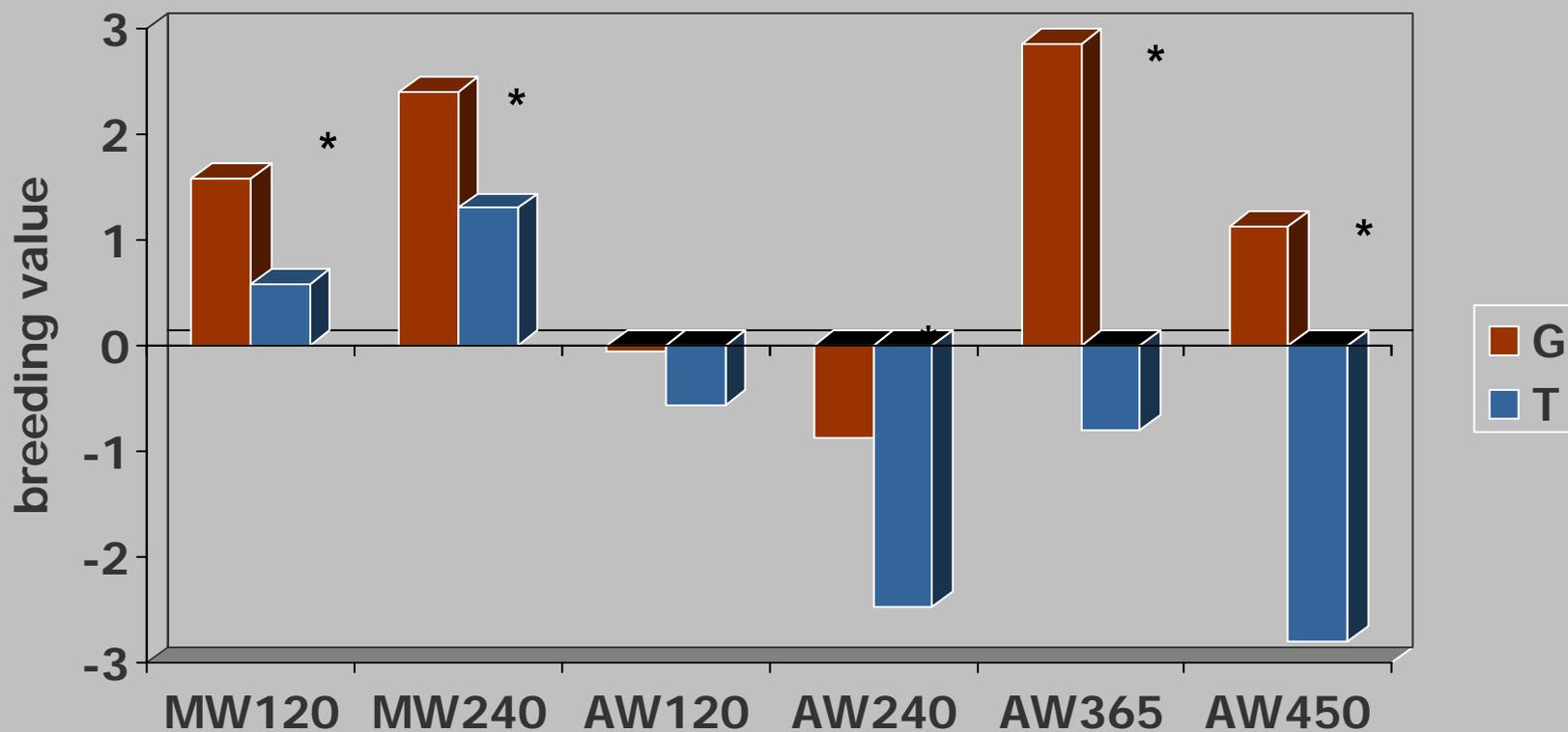
tRNA
Asparagina

69

50 animais tRNA tipo taurus (nucleotídeo G)

X Valores genéticos para peso

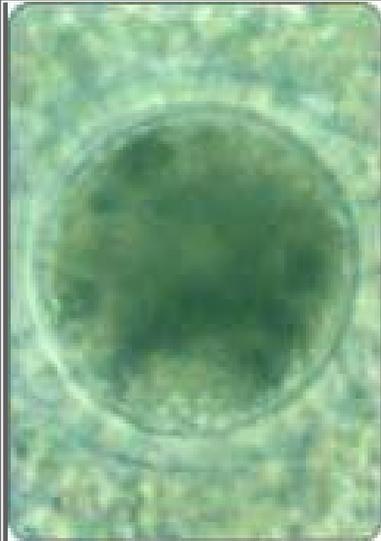
19 animais tRNA tipo indicus (nucleotídeo T)



A variabilidade intrínseca ao mtDNA indicus pode favorecer esses animais.



• **MODALIDADE DE HERANÇA CITOPLASMÁTICA**



- **Herança mitocondrial**
- **Herança Citoplasmática germinal**



• **CONTEÚDO**

• **Herança Citoplasmática germinal**

1. *Introdução*

2. *Dinâmica do RNAm no desenvolvimento embrionário*

3. *Herança paterna*

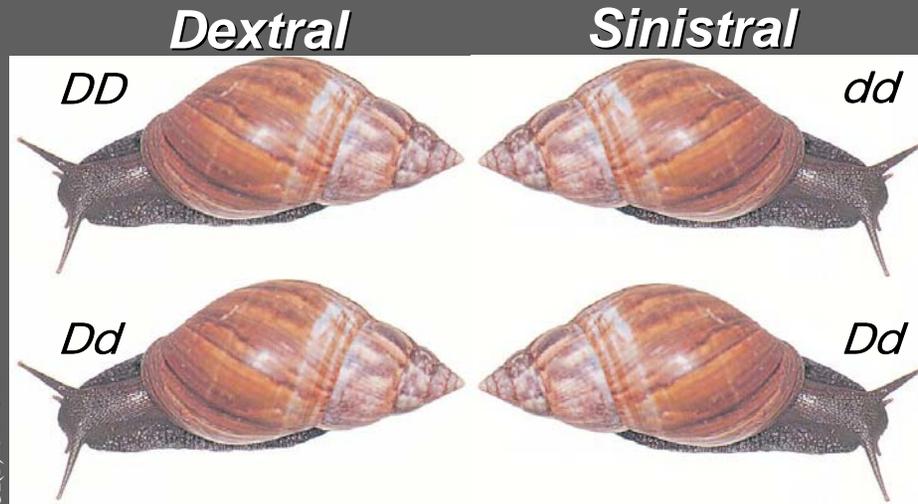
4. *Herança materna*

5. *A relação do RNA e a competência de desenvolvimento de um oócito*

HERANÇA CITOPLASMÁTICA GERMINAL

Caramujos
do gênero
Limnaea

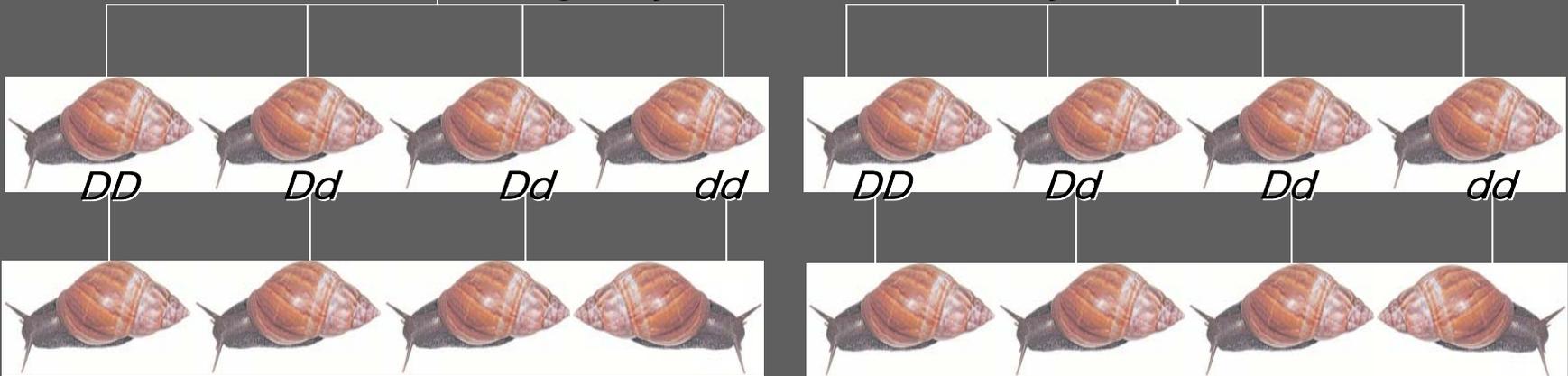
Teles et al., 1997. Revista de Saúde Pública
31(3): 310-312.



1ª geração
Fecundação cruzada

2ª geração
Auto fecundação

3ª geração - auto fecundação

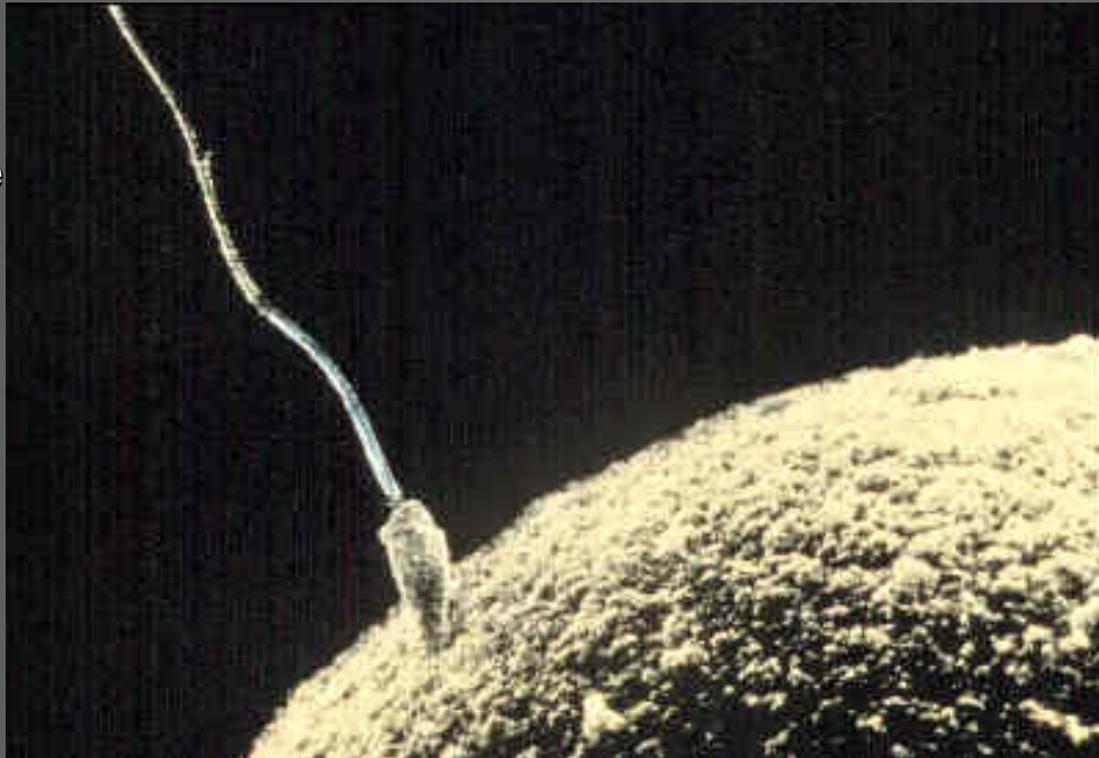


4ª geração - auto fecundação

Sturtevant 1923. Science. 58:269-270.

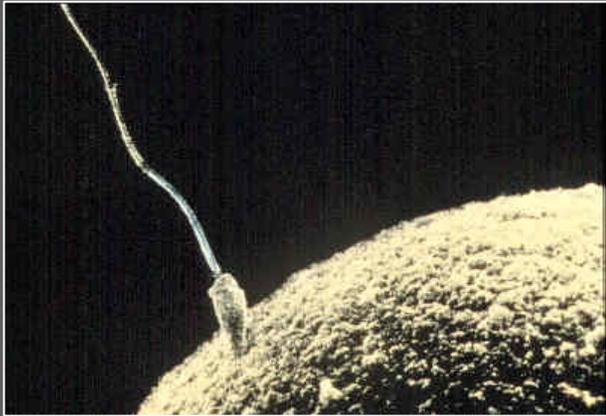
Contribuição de duas células para a formação de um indivíduo

Espermatozóide

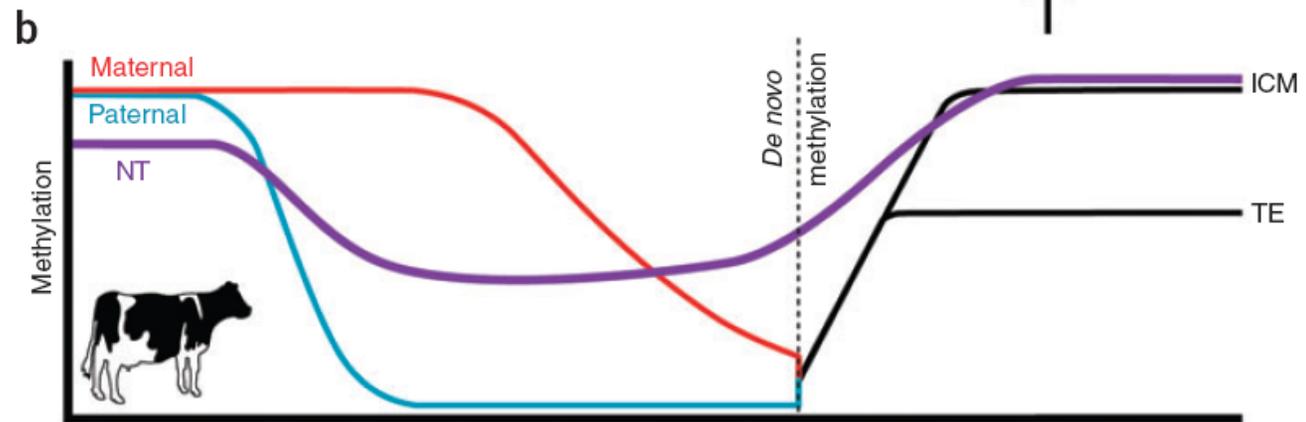
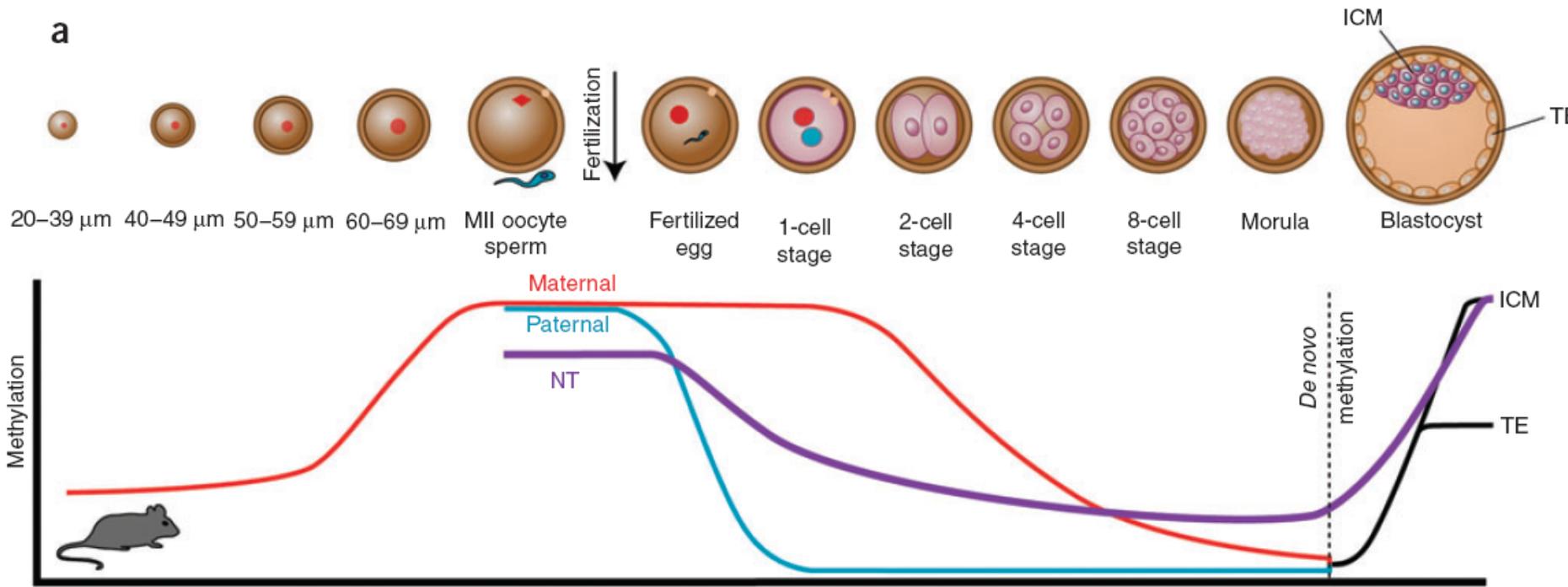


Oócito

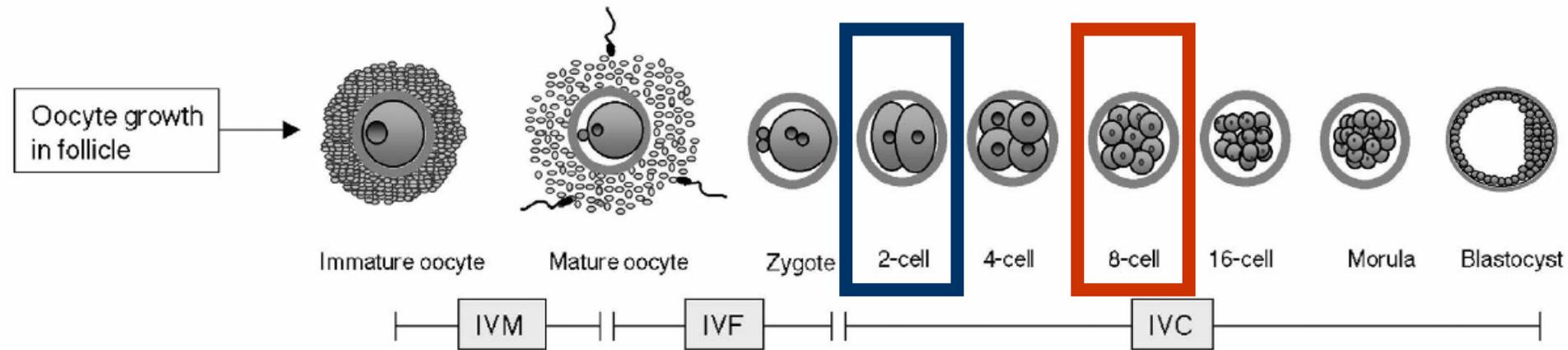
Contribuição de duas células para a formação de um indivíduo



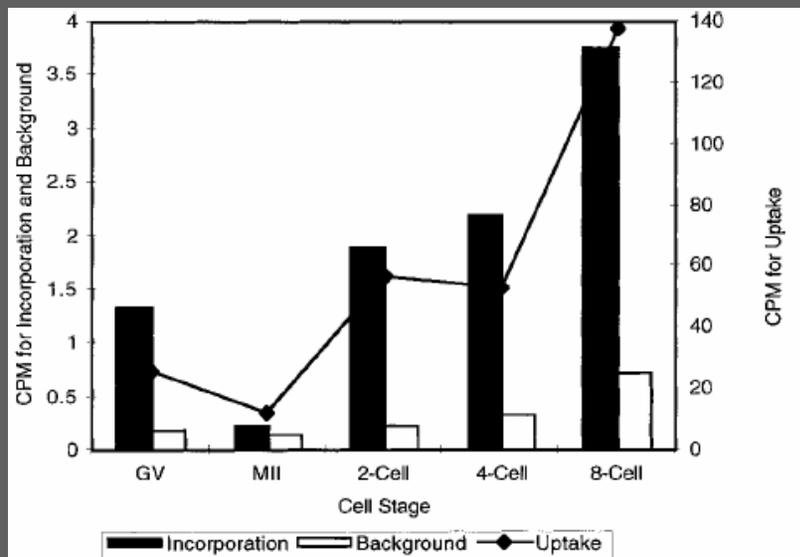
Contribuição de duas células para a formação de um indivíduo para a formação de um indivíduo



Dinâmica do RNAm no desenvolvimento embrionário



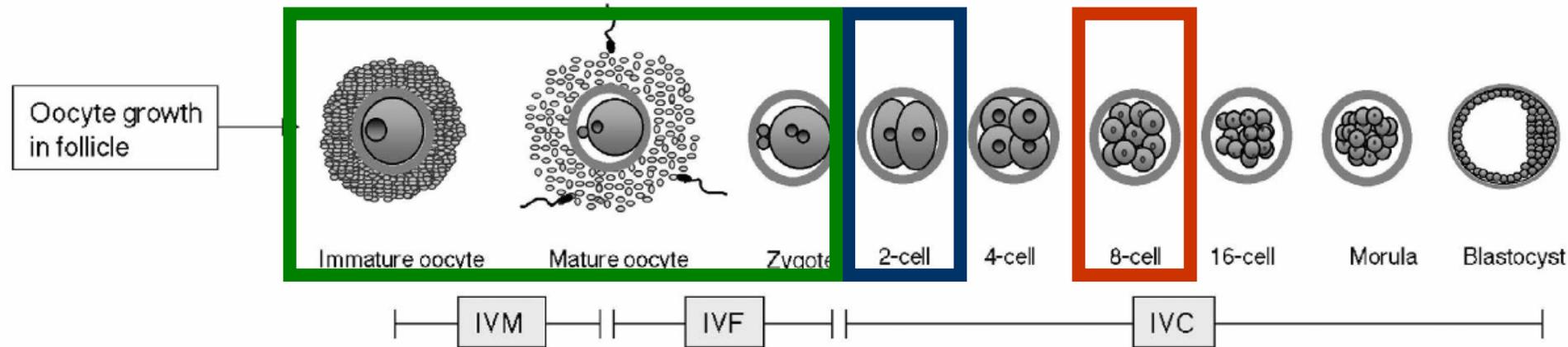
Lonergan 2003. *Reprod. Biomed Online*. 7(6):657-663



Memili et al., 1998. *Mol. Reprod. Devel.* 51:36-41



Dinâmica do RNAm no desenvolvimento embrionário



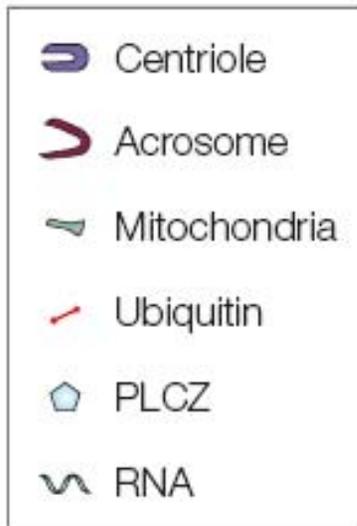
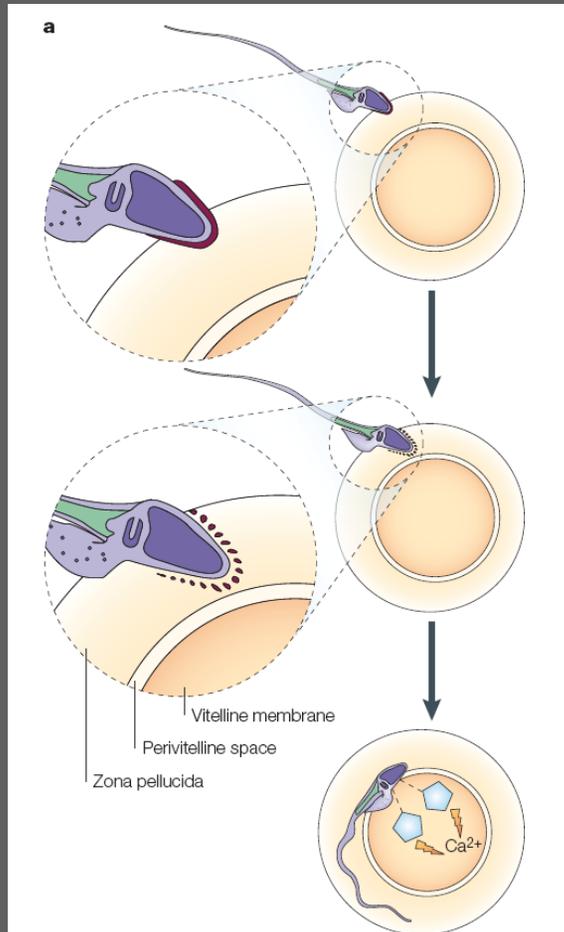
Lonergan 2003. *Reprod. Biomed Online*. 7(6):657-663

Quais RNAs governam o desenvolvimento embrionário até a transcrição do seu próprio genoma?

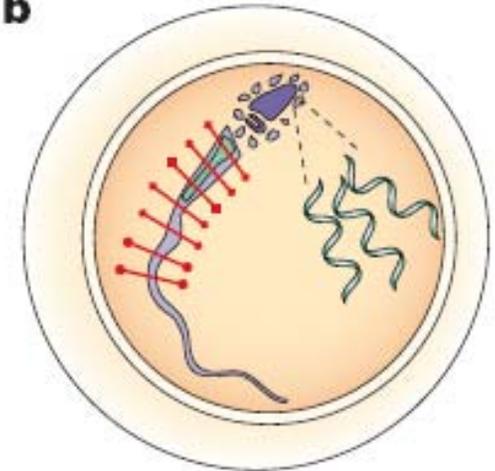
A quantidade geral de RNA é importante?

Quem são os genes determinantes para o desenvolvimento?

Contribuição paterna para o desenvolvimento embrionário



b

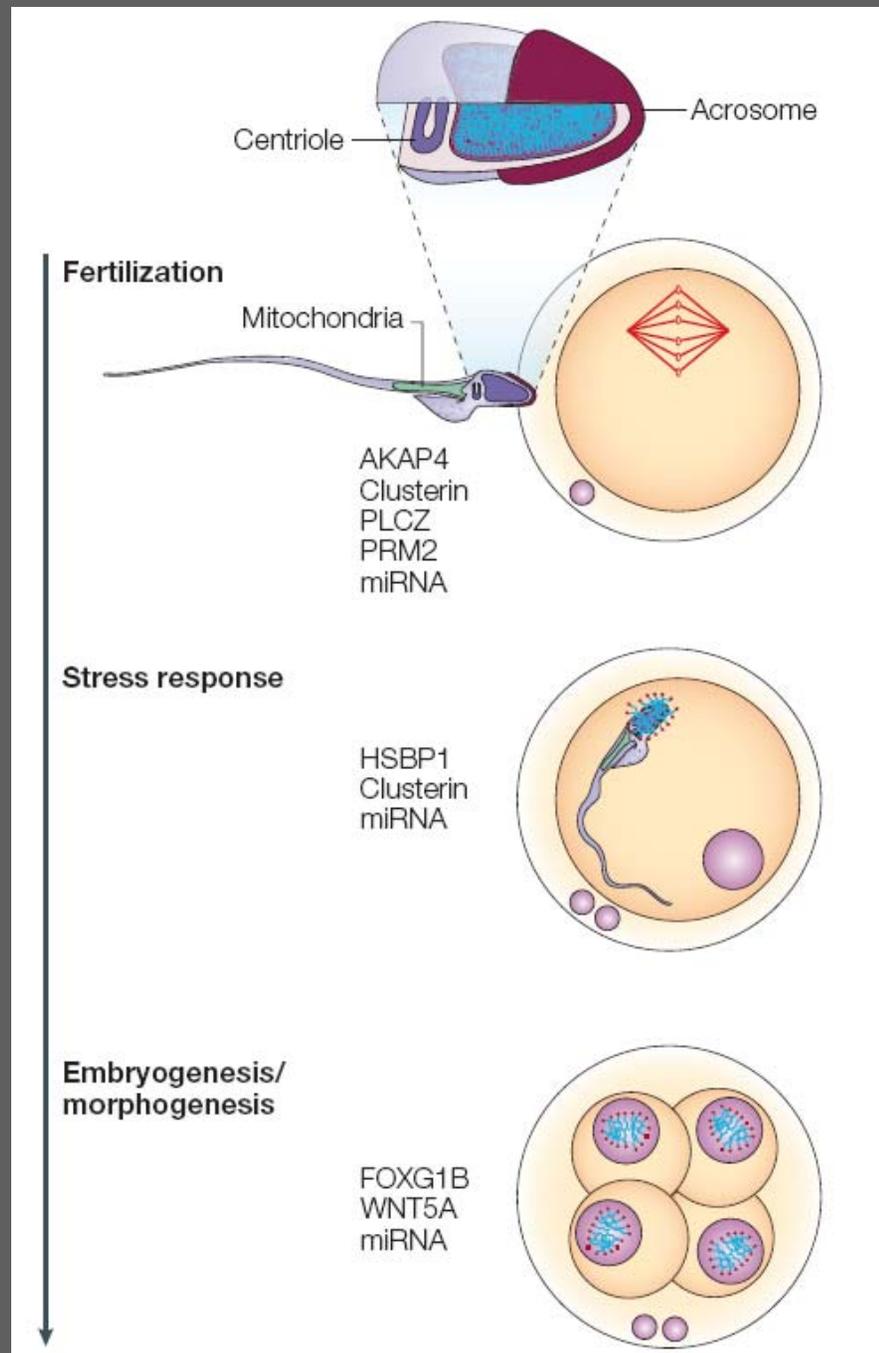
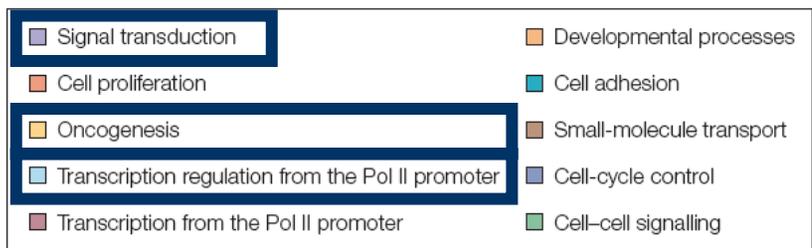
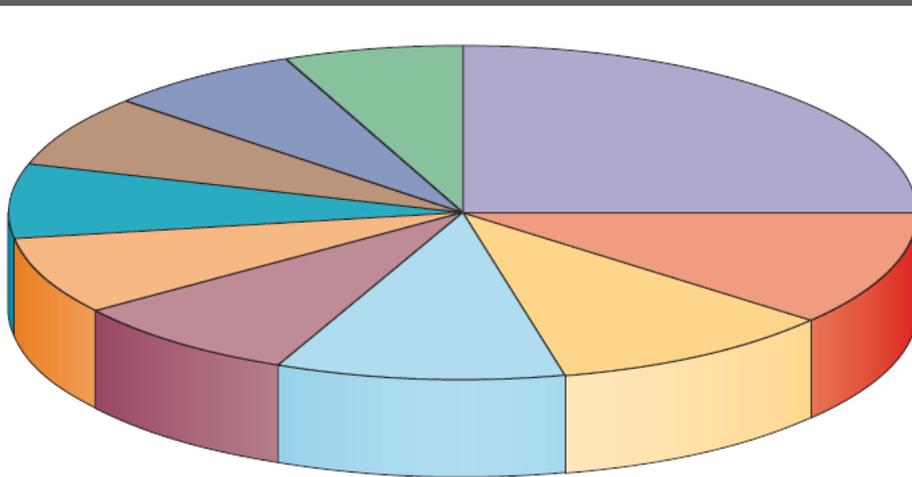


O SPTZ contribui para o desenvolvimento embrionário com RNAm

Herança citoplasmática paterna

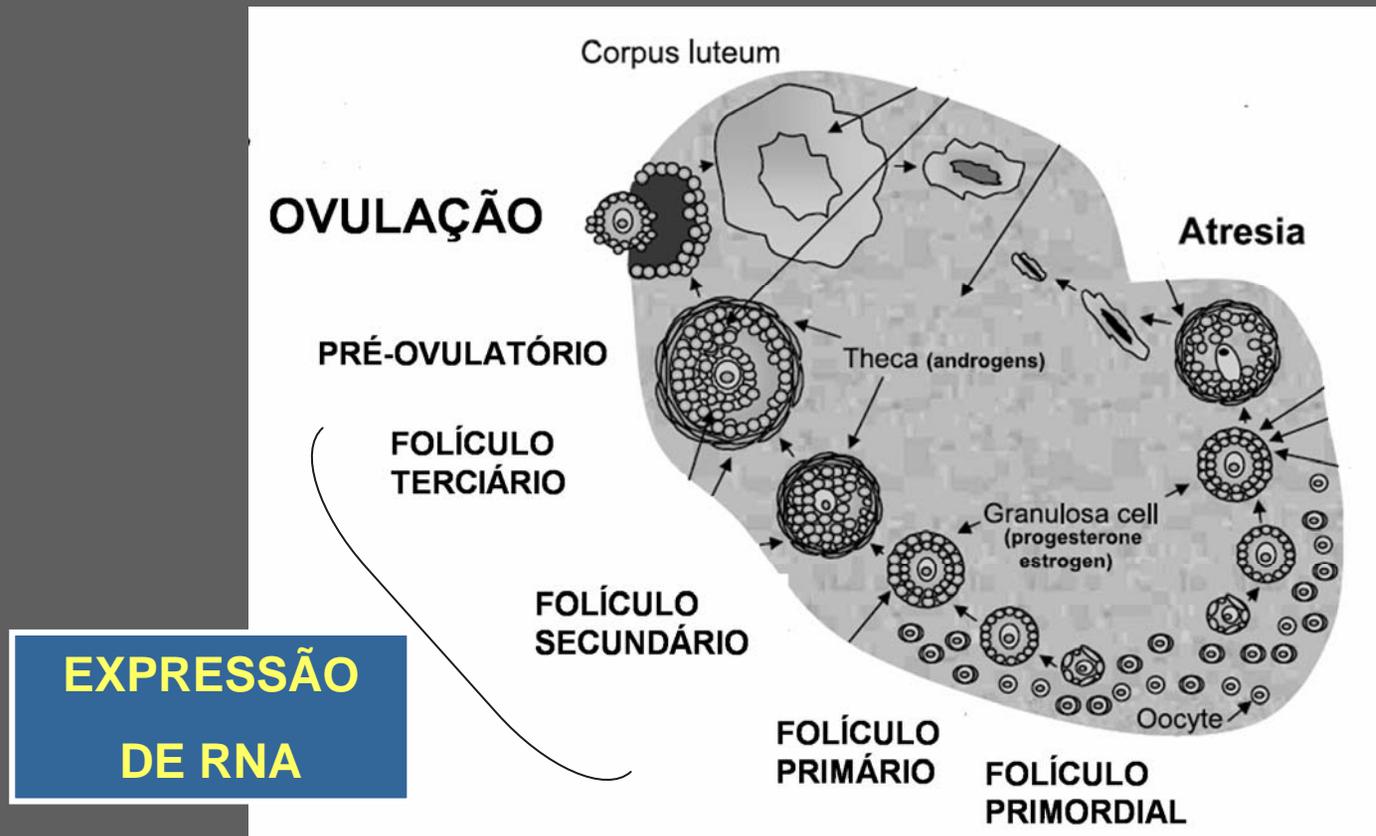
10 – 100 fg RNA

3281 transcritos



Herança citoplasmática materna

A transcrição gênica em oócitos é retomada no estágio de folículo secundário, mantendo-se até o estágio de folículo terciário, quando a expressão tende a se encerrar (Fair et al., 1995; Hyttel et al., 1997).

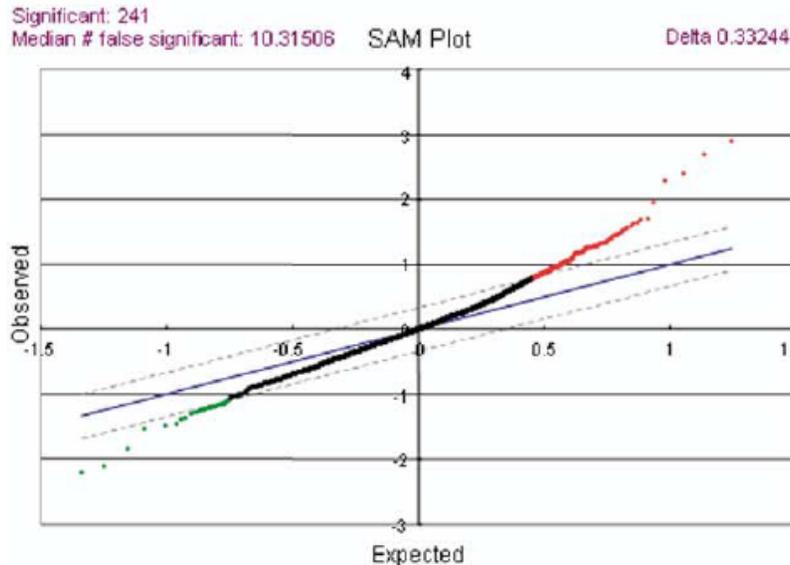


Herança citoplasmática materna

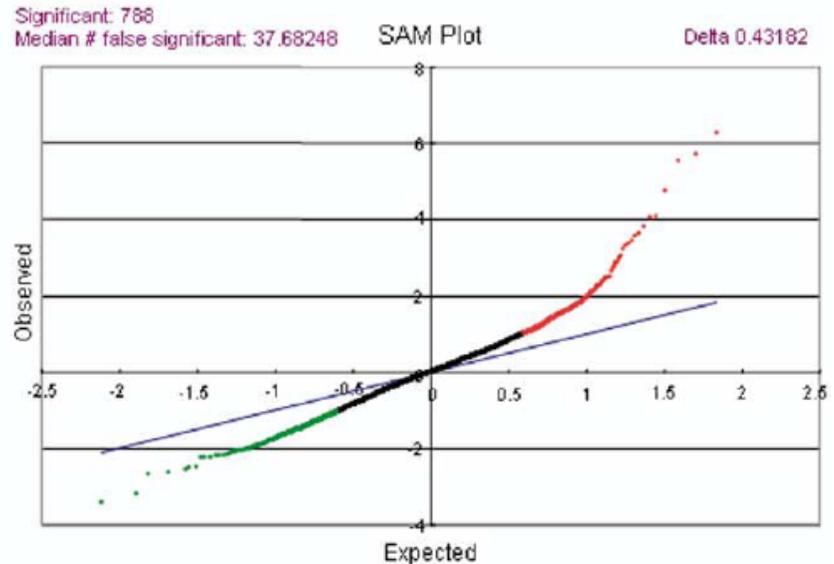
FIGURE 2

Identification of genes displaying significant changes in expression. The graph represents a scatter plot of the observed relative difference, $d(i)$, versus the expected relative difference, $dE(i)$. The solid line indicates the line for $d(i) = dE(i)$, where the observed relative difference is identical to the expected relative difference. *Red spots* (right upper area) signify genes with higher expression, and *green spots* (left lower area) represent genes with lower expression from primordial to primary (A) or primary to secondary follicles (B).

A. Between Primordial and Primary



B. Between Primary and Secondary



Yoon. mRNA profiles in early follicular development. *Fertil Steril* 2006.

Herança citoplasmática materna



TABLE 2. Maternal RNA content in oocytes of several animal species determined by direct measurement of homogenate-EtBr fluorescence

| Animal ¹ | RNA content |
|---------------------|-------------------------|
| Mammals | (ng/oocyte ± SD) |
| Mouse (7) | 0.47 ± 0.06 |
| Rabbit (3) | 15.0 ± 0.08 |
| Cattle (7) | 0.98 ± 0.18 |
| Pig (6) | 0.65 ± 0.23 |
| Sheep (2) | 0.76 ± 0.05 |
| Birds | (μg/oocyte ± SD) |
| Hen (11) | 2.1 ± 0.44 |
| Japanese quail (10) | 1.1 ± 0.33 |
| Quinea hen (5) | 1.9 ± 0.39 |
| Turkey (7) | 1.8 ± 0.28 |

¹Figures in parentheses indicate the number of separate determinations of pooled oocyte samples for mammals and of single oocytes for birds.

Olszanska & Borgul 1993.
J Exper Zoo. 265:317-320.

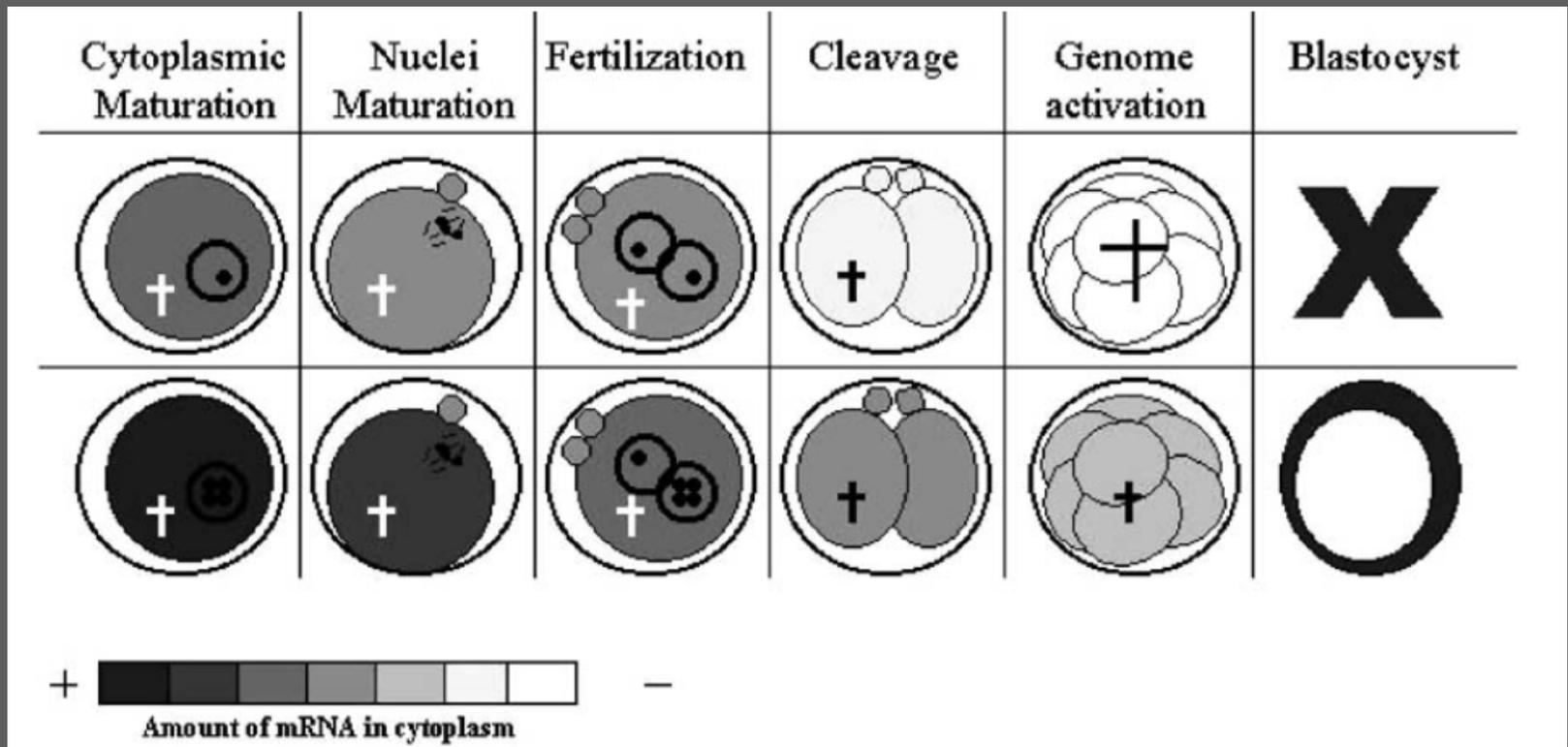
- ~ 2 ng RNA em bovinos (Lequarré et al., 2004)
- ~ 10 ng RNA em humanos (Neilson et. al., 2000)

Herança citoplasmática materna

Quem tem mais RNAm
tem mais competência de desenvolvimento?

- RNA

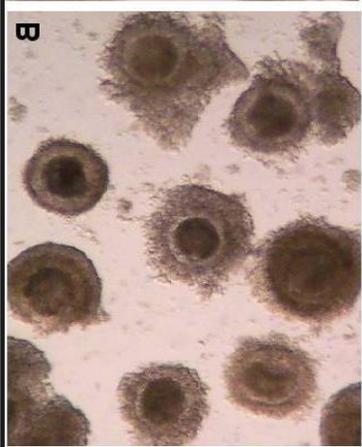
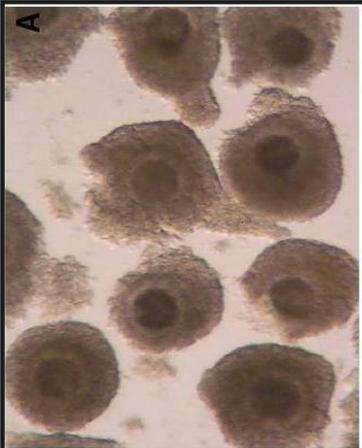
+ RNA



Meirelles et al. 2004. Animal Reprod Sci. 82: 13-20

Herança citoplasmática materna

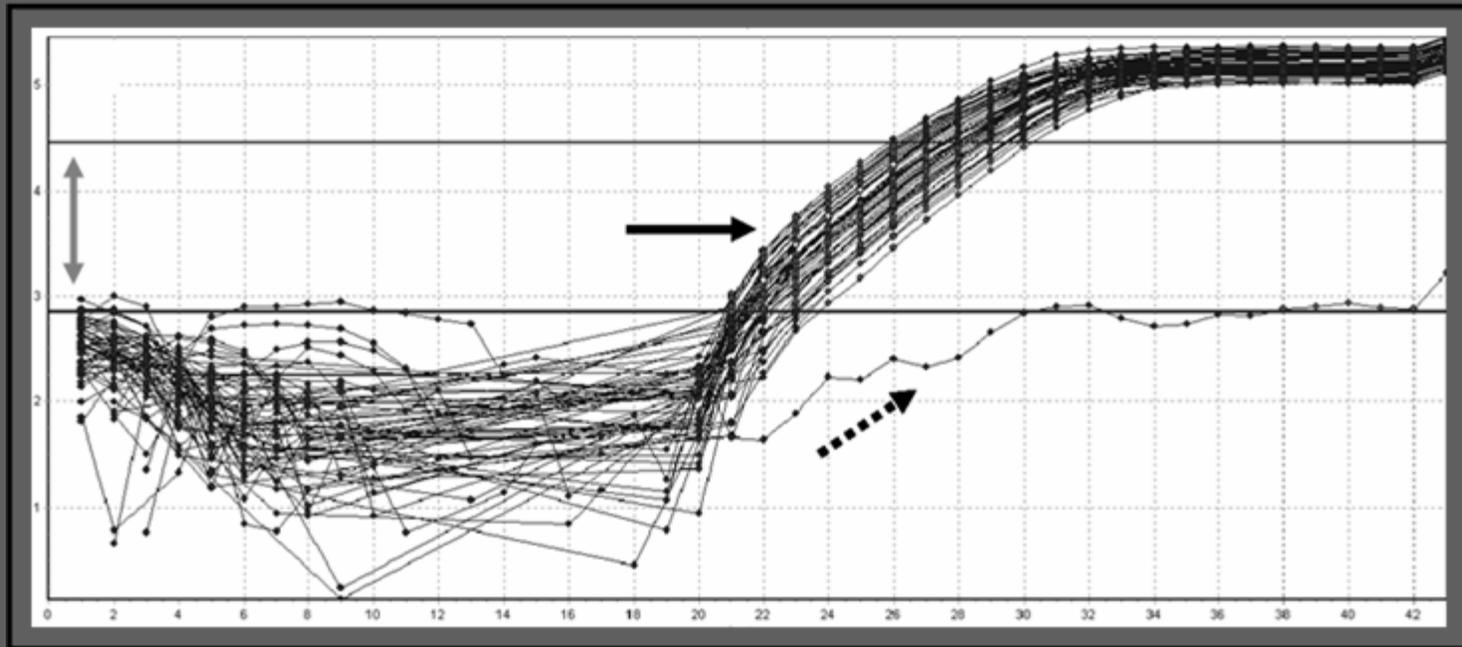
Quem tem mais RNAm
tem mais competência de desenvolvimento?



| Grupos | N | Clivagem (% ± EP) | Blastocisto (% ± EP) |
|--------|-----|--------------------------|--------------------------|
| COC-A | 205 | 70,7 ± 0,74 ^a | 20,6 ± 0,42 ^a |
| COC-B | 205 | 50,0 ± 0,71 ^b | 12,9 ± 0,14 ^b |

Herança citoplasmática materna

Quem tem mais RNAm
tem mais competência de desenvolvimento?



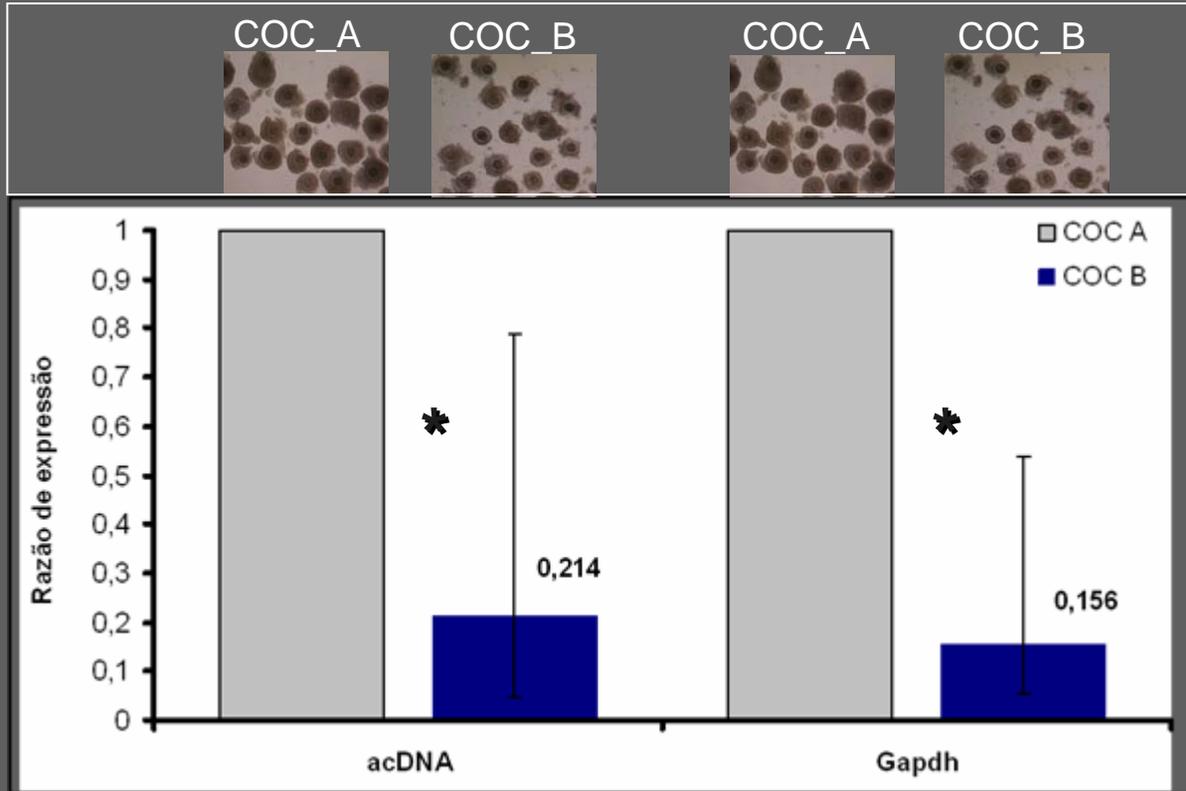
Amplificação de cDNA total

Quantificação relativa por PCR tempo real

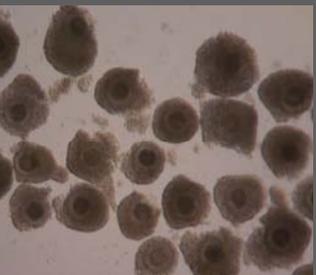
diferença = (eficiência média de PCR) $(Ct \text{ grupo controle} - Ct \text{ grupo teste})$

Herança citoplasmática materna

Comparação entre quantidade de RNAm poliA entre oócitos com diferentes potenciais de desenvolvimento

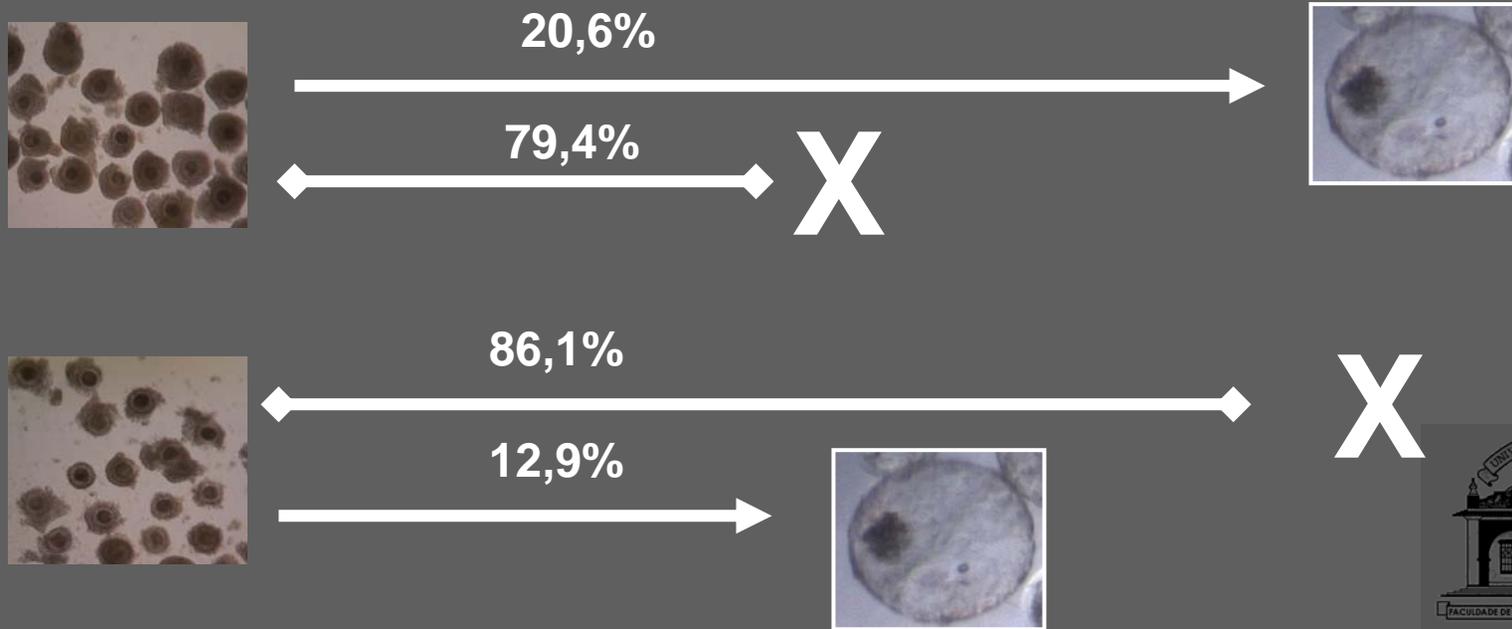


RNAm ↑ ↑ desenvolvimento



Herança citoplasmática materna

| Grupos | N | Clivagem (% ± EP) | Blastocisto (% ± EP) |
|--------|-----|--------------------------|--------------------------|
| COC-A | 205 | 70,7 ± 0,74 ^a | 20,6 ± 0,42 ^a |
| COC-B | 205 | 50,0 ± 0,71 ^b | 12,9 ± 0,14 ^b |



Herança citoplasmática materna

**Quem tem mais RNAm
tem mais competência de desenvolvimento?**

**Desenvolvimento de um modelo
que nos desse informação acurada do desenvolvimento**



Herança citoplasmática materna

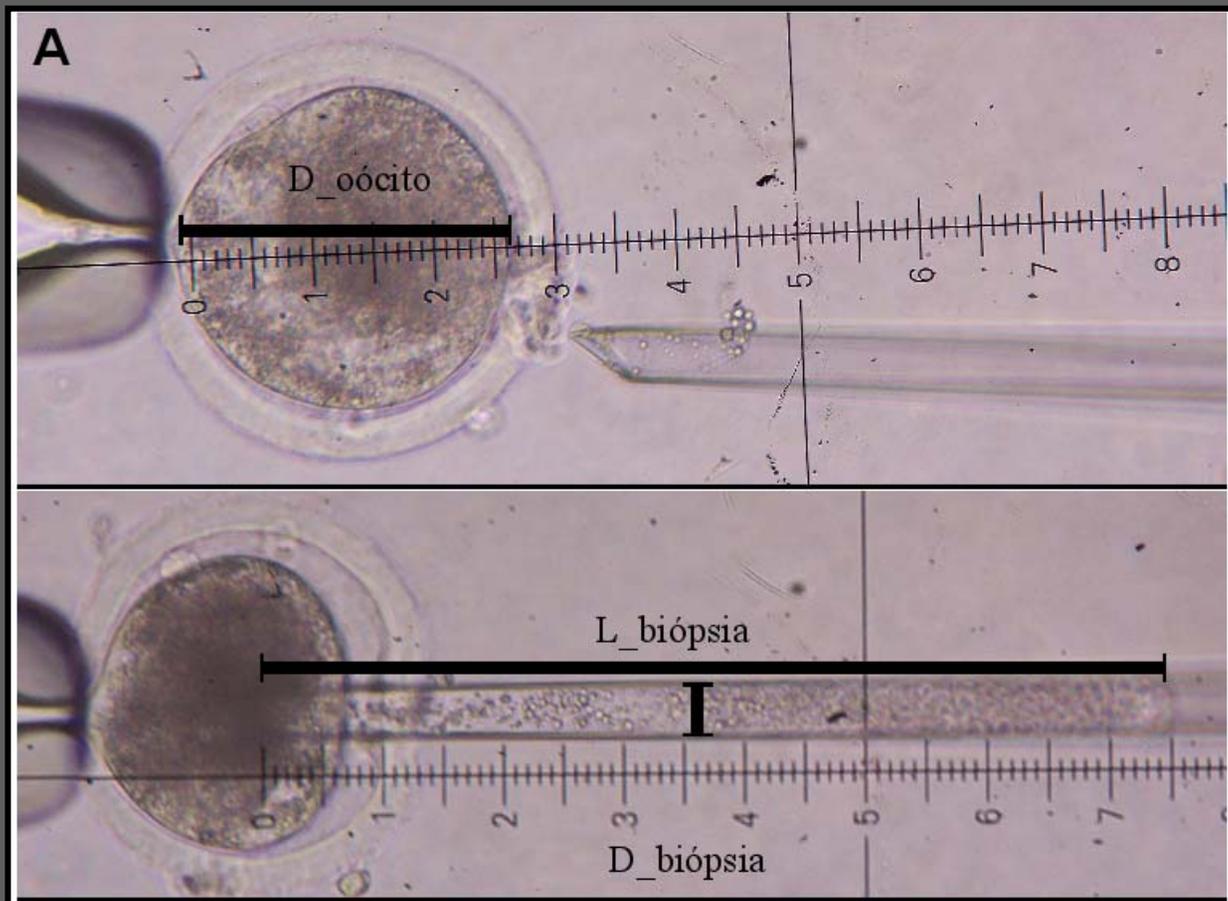
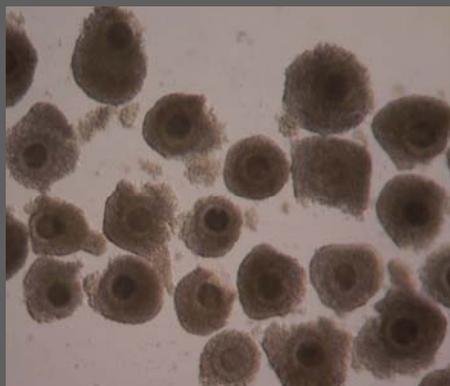
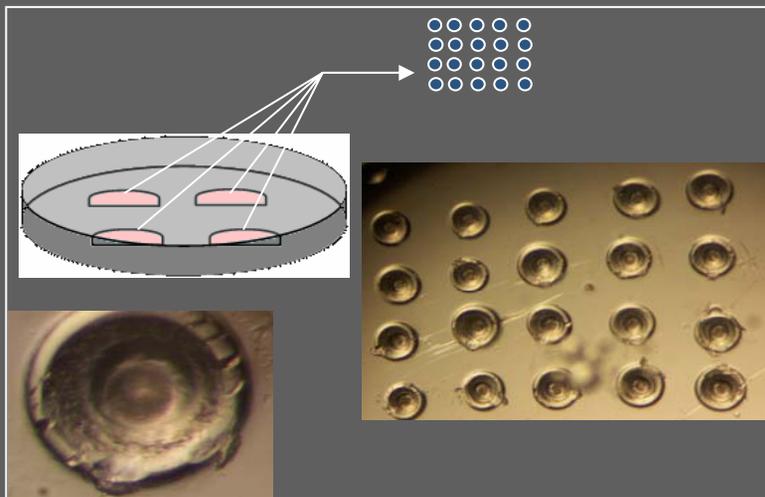


Figura 14. Foto ilustrativa da remoção da biópsia e cultivo dos embriões em poços separados. O diâmetro ($D_{\text{oócito}}$) de cada oócito foi anotado, o diâmetro da micro-pipeta de injeção ($D_{\text{biópsia}}$) é de 15 μm e o comprimento da biópsia dentro da micro-pipeta ($L_{\text{biópsia}}$) é de 300 μm (baseado na medição da ocular micro-métrica). Os volumes foram calculados de acordo com as seguintes equações: Volume do oócito (μm^3) = $(4/3) \times \pi \times R^3$ e Volume do citoplasma retirado (μm^3) = $\pi \times R^2 \times L_{\text{biópsia}}$. O volume do citoplasma removido de cada oócito foi de aproximadamente 10% citoplasma (aumento de 200 vezes).

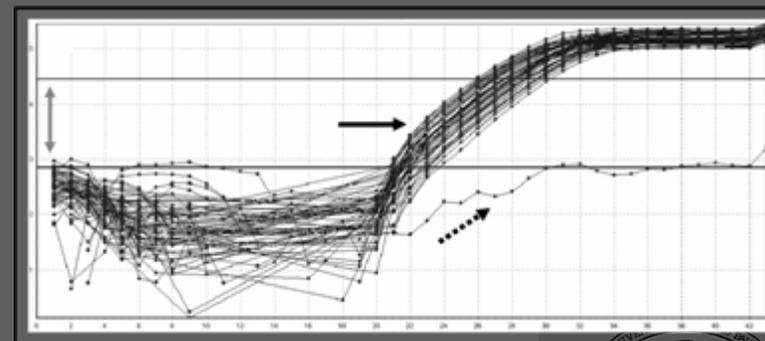
Herança citoplasmática materna



cultivo separado

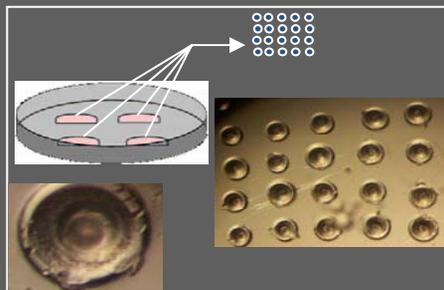


amplificação de cDNA



Herança citoplasmática materna

Avaliação do desenvolvimento



Início do cultivo

0h



90h



210h

Clivados

bloqueio
2 células

1

Clivados

bloqueio
8 células

2

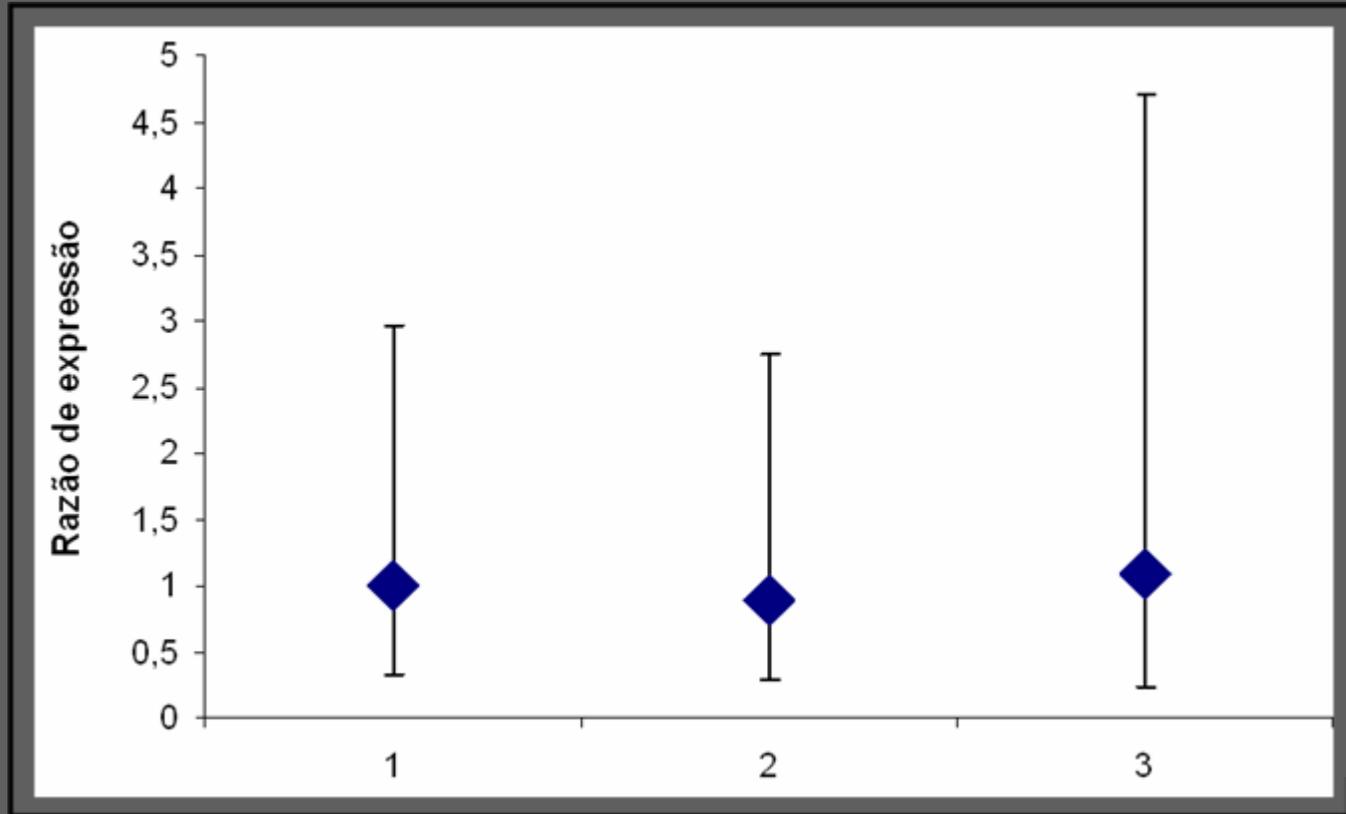
Desenvolvidos a blastocisto

3

GRUPOS
EXPERIMENTAIS

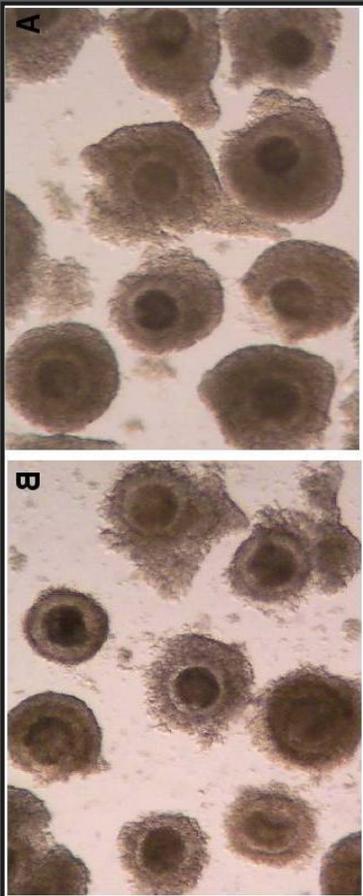
Herança citoplasmática materna

Comparação da quantidade de RNAm poliA

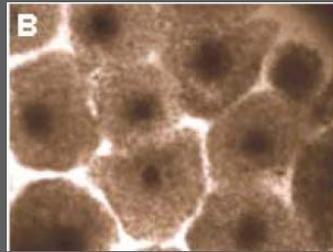


Herança citoplasmática materna

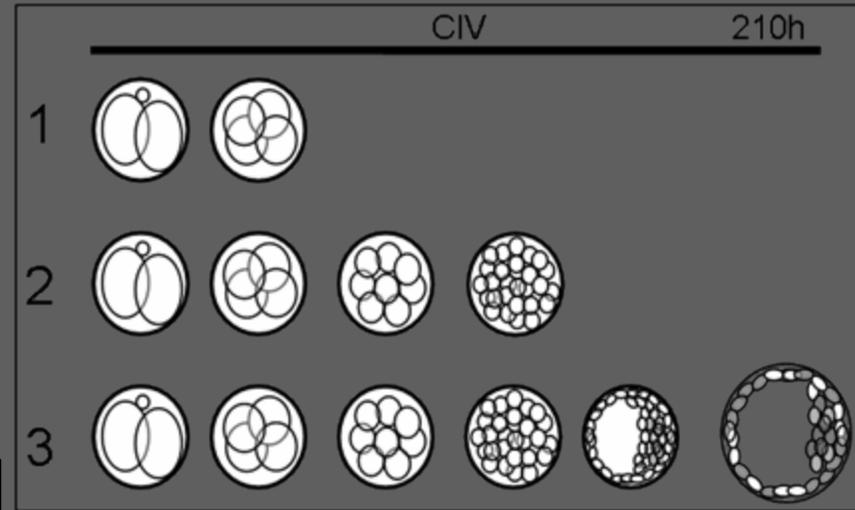
Comparação da quantidade de RNAm poliA



↑ RNAm
↓ ≠

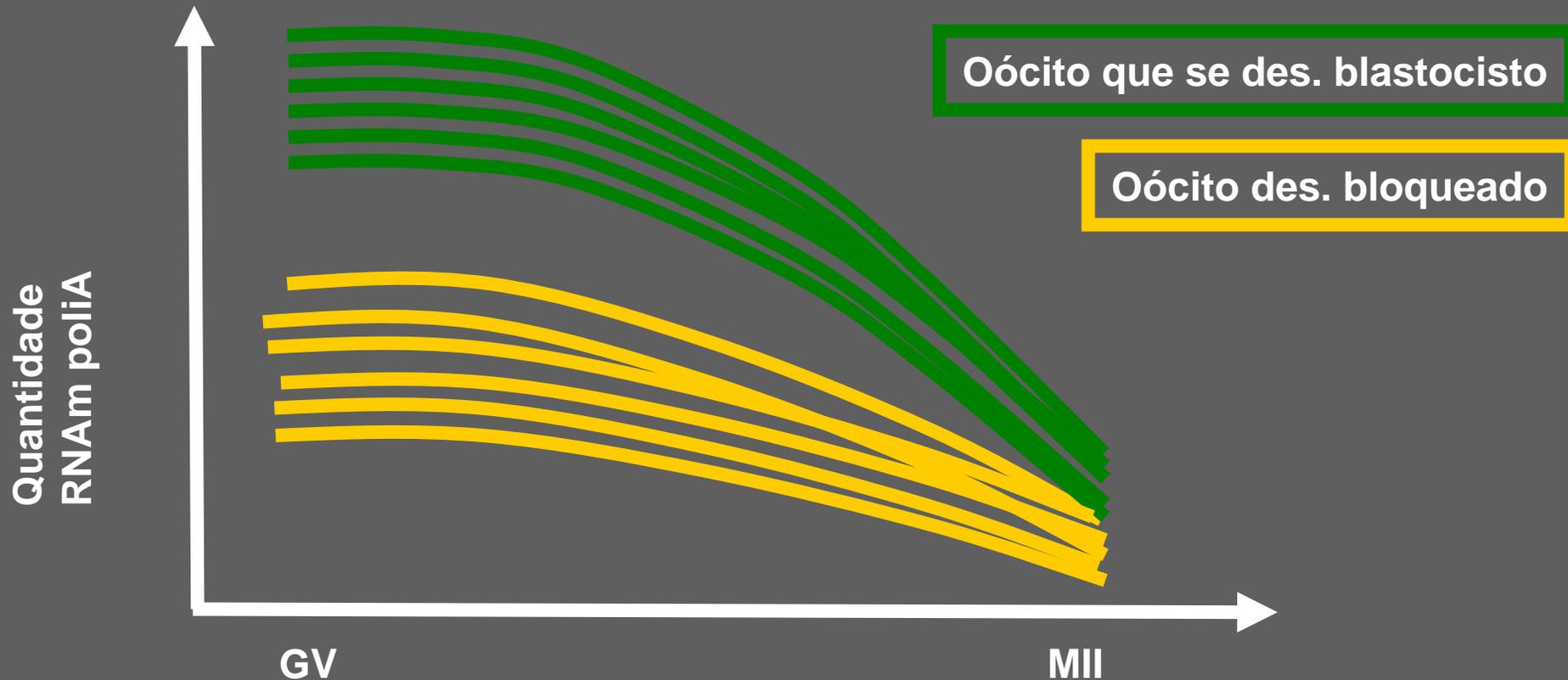


≈ RNAm



Herança citoplasmática materna

Modelo da dinâmica de RNAm global durante a maturação iv e a competência do oócito



Existe uma tendência de que os oócitos que desenvolvem a blastocisto têm maior quantidade de RNAm

Não há mais diferença de RNAm poliA entre os oócitos que se desenvolvem a blastocisto e os que têm o desenvolvimento bloqueado

Herança citoplasmática materna

Quais são os genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto?

Quantos são?



9.500-12.000

(Kocabas et al., 2006; Misirlioglu et al., 2006; Zeng et al., 2004)

Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Camundongos

Table 4
Selected biological processes overrepresented in major expression patterns

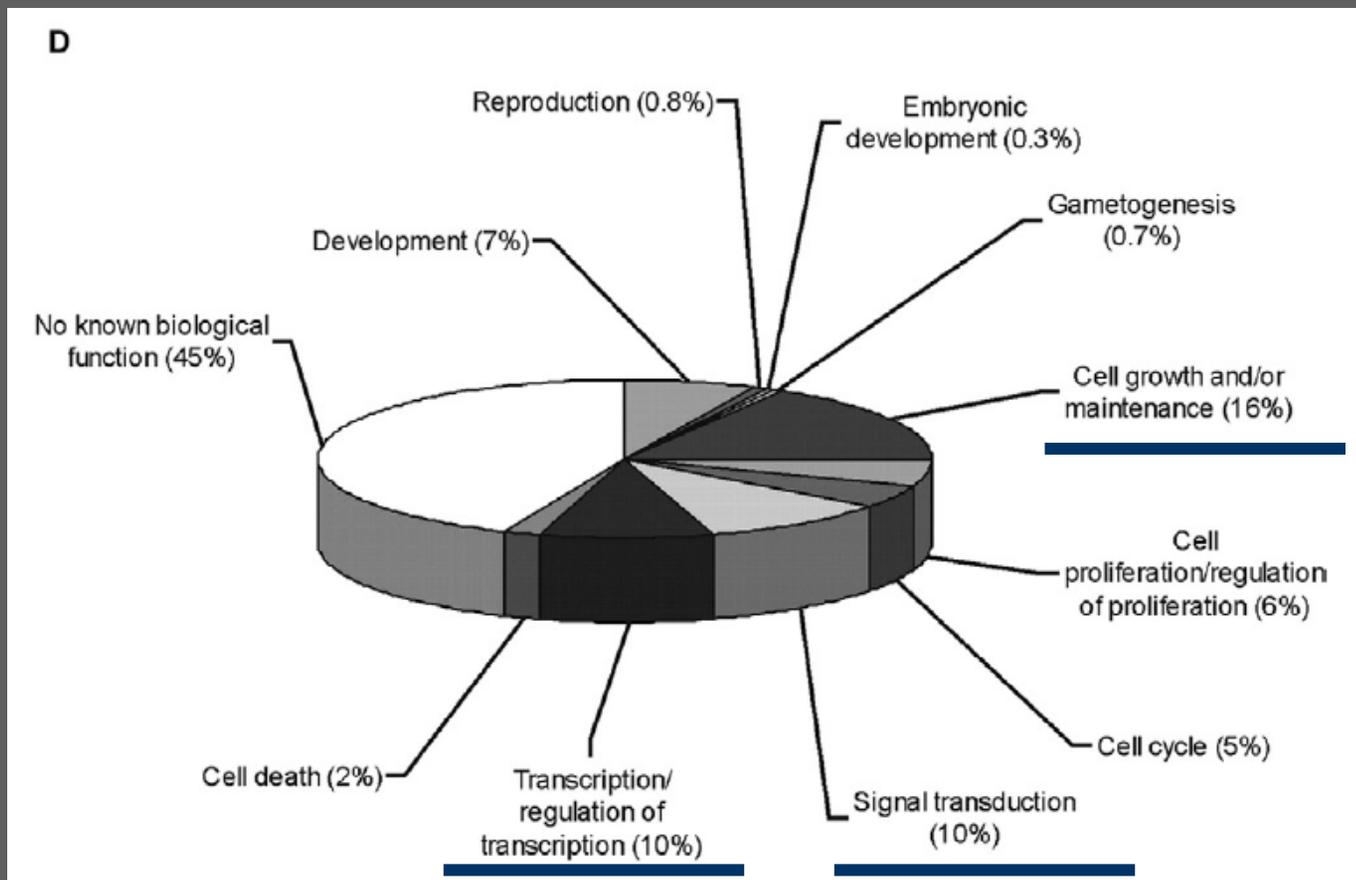
| Gene pattern | Overrepresented categories of biological processes | EASE score | No. of genes |
|------------------|---|------------|--------------|
| Maternal | Cell communication | 4.69E-05 | 81 |
| | A. Signal transduction | 4.07E-03 | 61 |
| | Cell surface receptor linked signal transduction | 3.71E-03 | 30 |
| | B. Cell adhesion | 6.91E-03 | 19 |
| Maternal-zygotic | Metabolism | 1.14E-03 | 400 |
| | A. Electron transport or oxidative phosphorylation | 3.09E-04 | 48 |
| | B. Coenzyme metabolism | 1.12E-05 | 25 |
| | C. Nucleotide metabolism—nucleoside triphosphate metabolism | 7.89E-03 | 10 |
| | D. Lipid metabolism | 3.56E-03 | 16 |

Zang et al. 2004. *Developmental Biology*. 272: 483-496.

Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Humanos

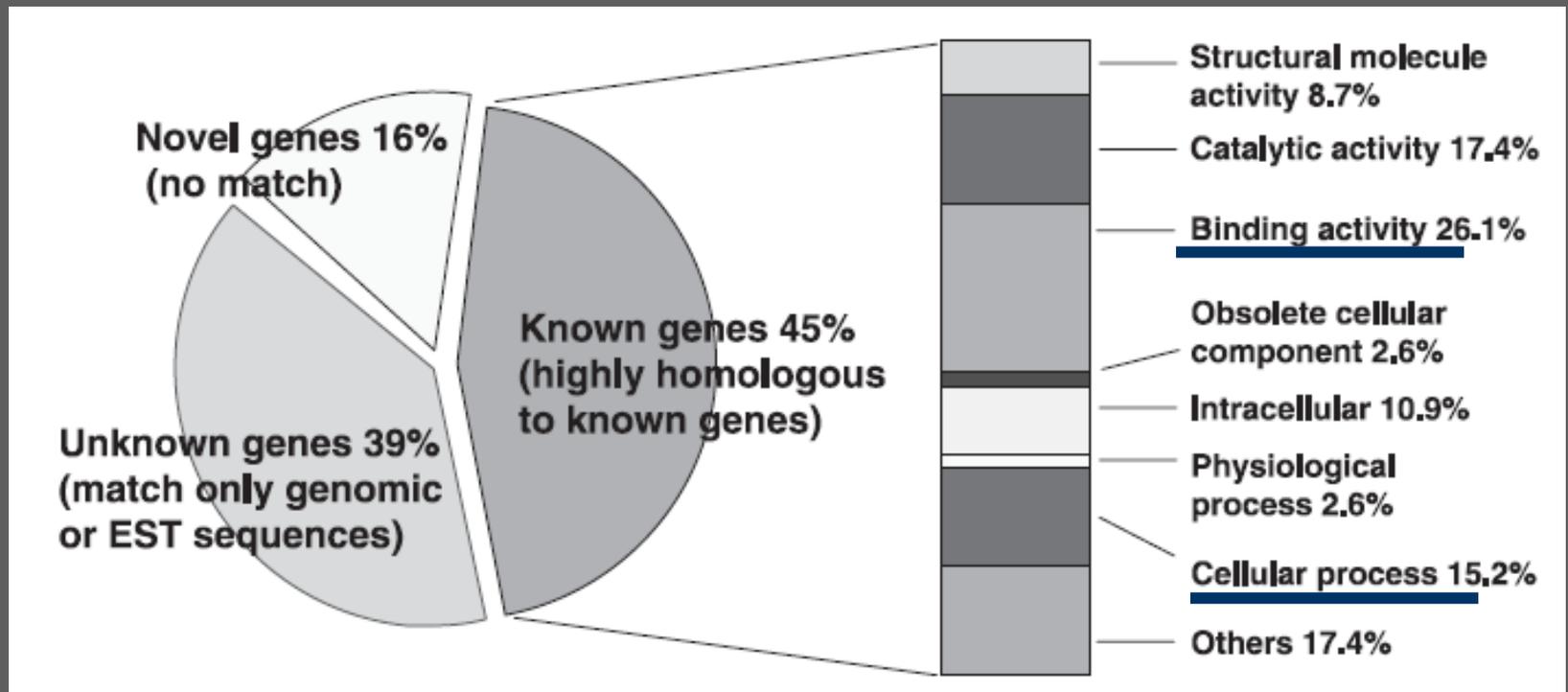


Zhang et al. 2006. Fertility and Sterility.

Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Bovinos



Yao et al. 2004. *Physiol Genomics*. 19: 84-92

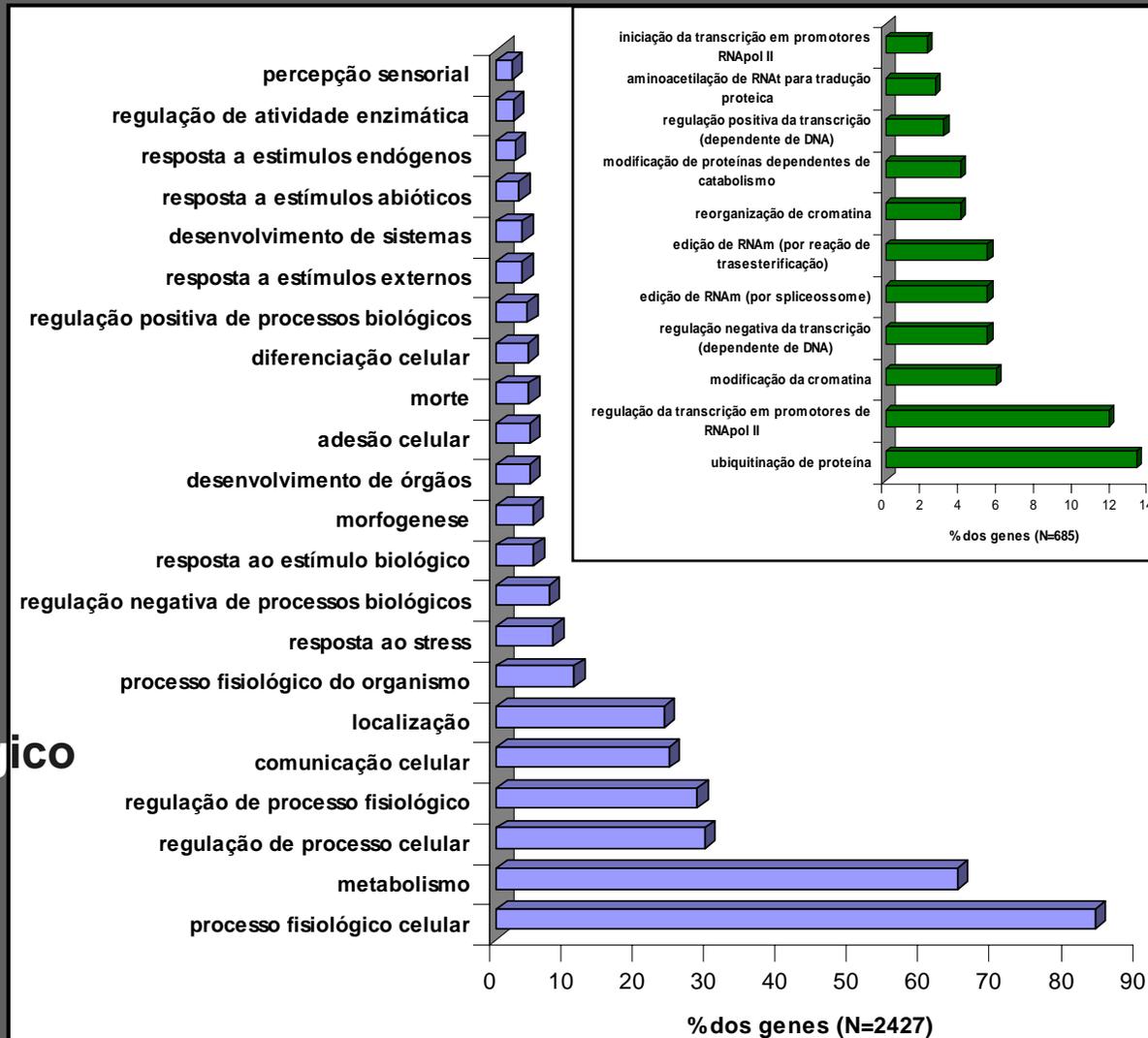
Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Bovinos

Análise funcional:
processos biológicos

Localização
Comunicação celular
Regulação de processo fisiológico
Regulação do processo celular
Metabolismo
Processo fisiológico celular



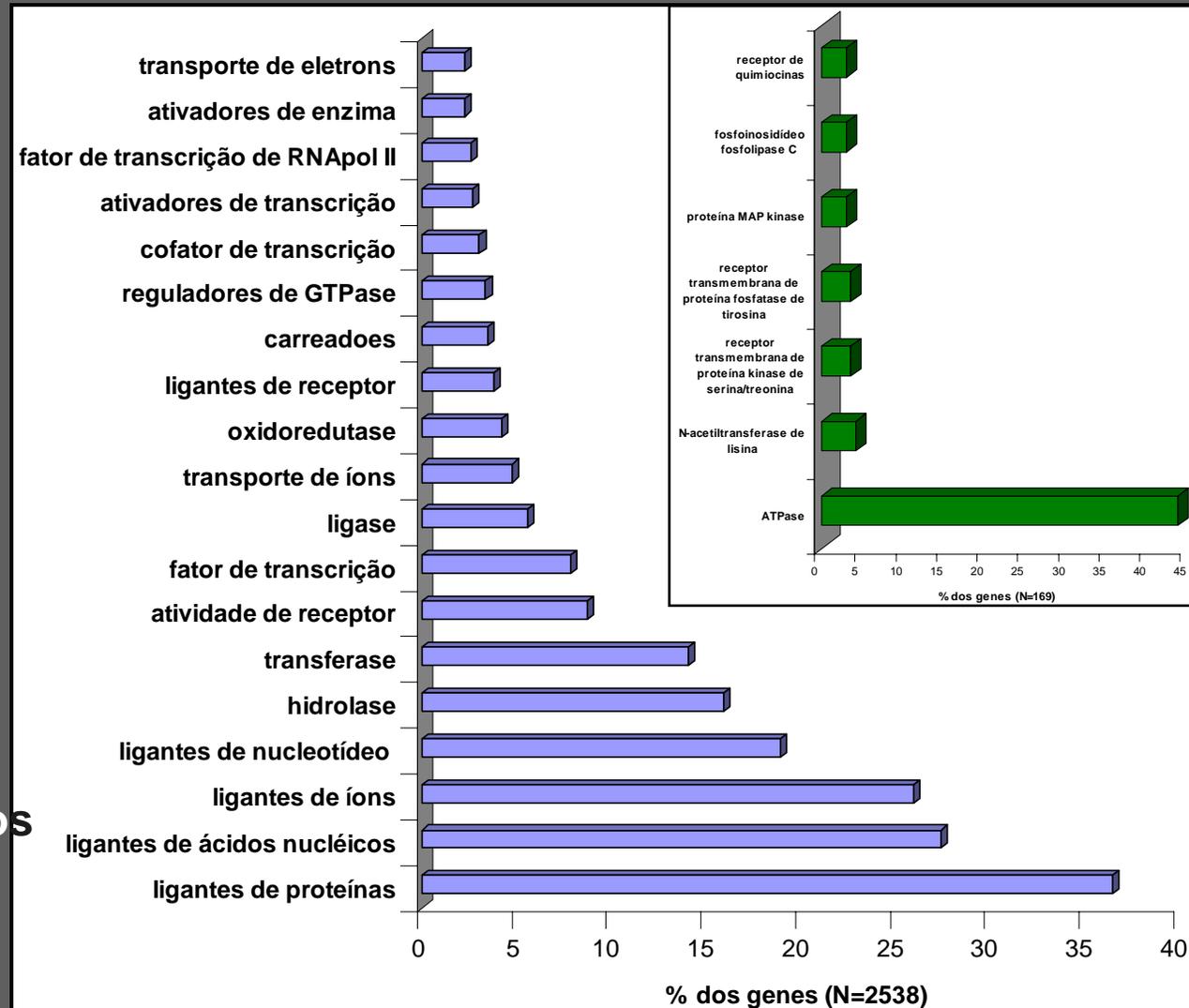
Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Bovinos

Análise funcional:
função molecular

Ligantes de nucleotídeos
Ligantes de íons
Ligantes de ácidos nucléicos
Ligantes de proteína



Herança citoplasmática materna

O que fazem?

Bovinos

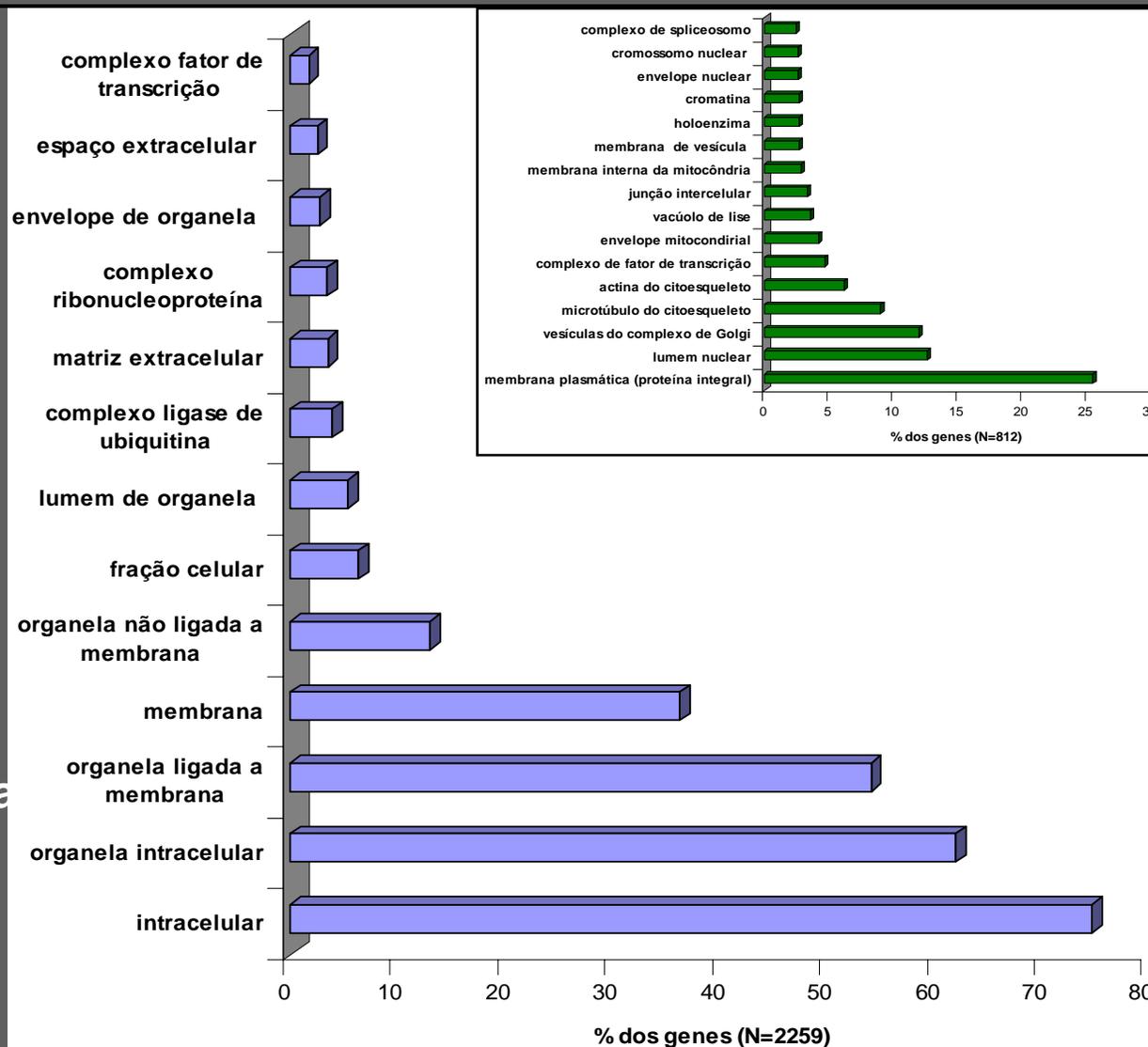
Análise funcional:
Localização celular

membrana

organela ligada a membrana

organela intracelular

intracelular



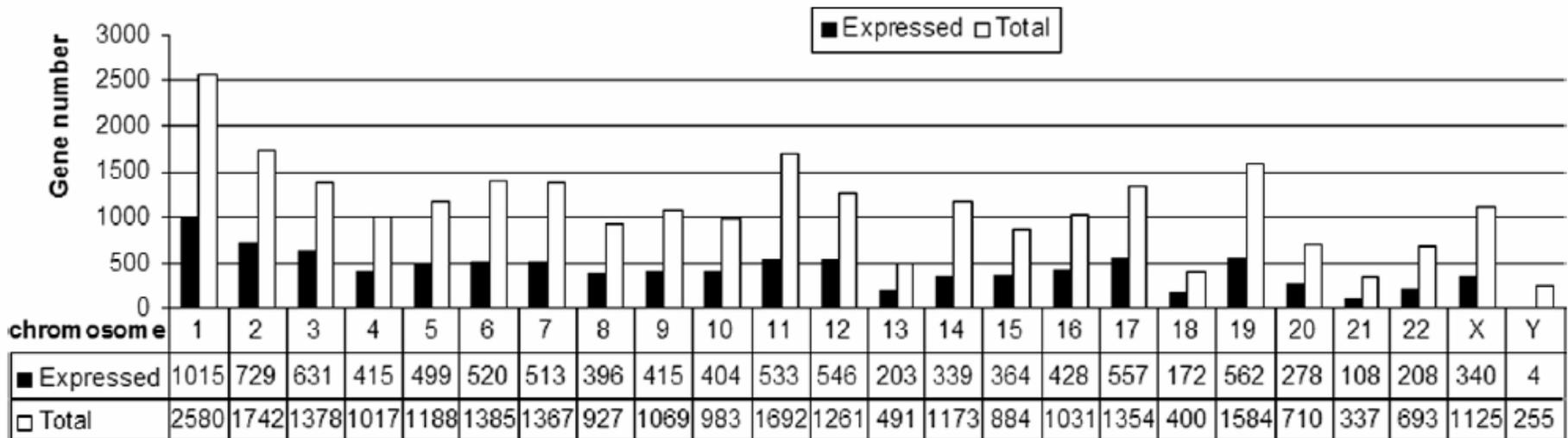
Herança citoplasmática materna

Onde estão?

Humanos

FIGURE 3

Gene distribution on chromosomes. The white column represents the total number of human genes that are mapped to each chromosome with NCBI human genome build 35.1. The black column represents the number of genes expressed in hGVO on each chromosome.

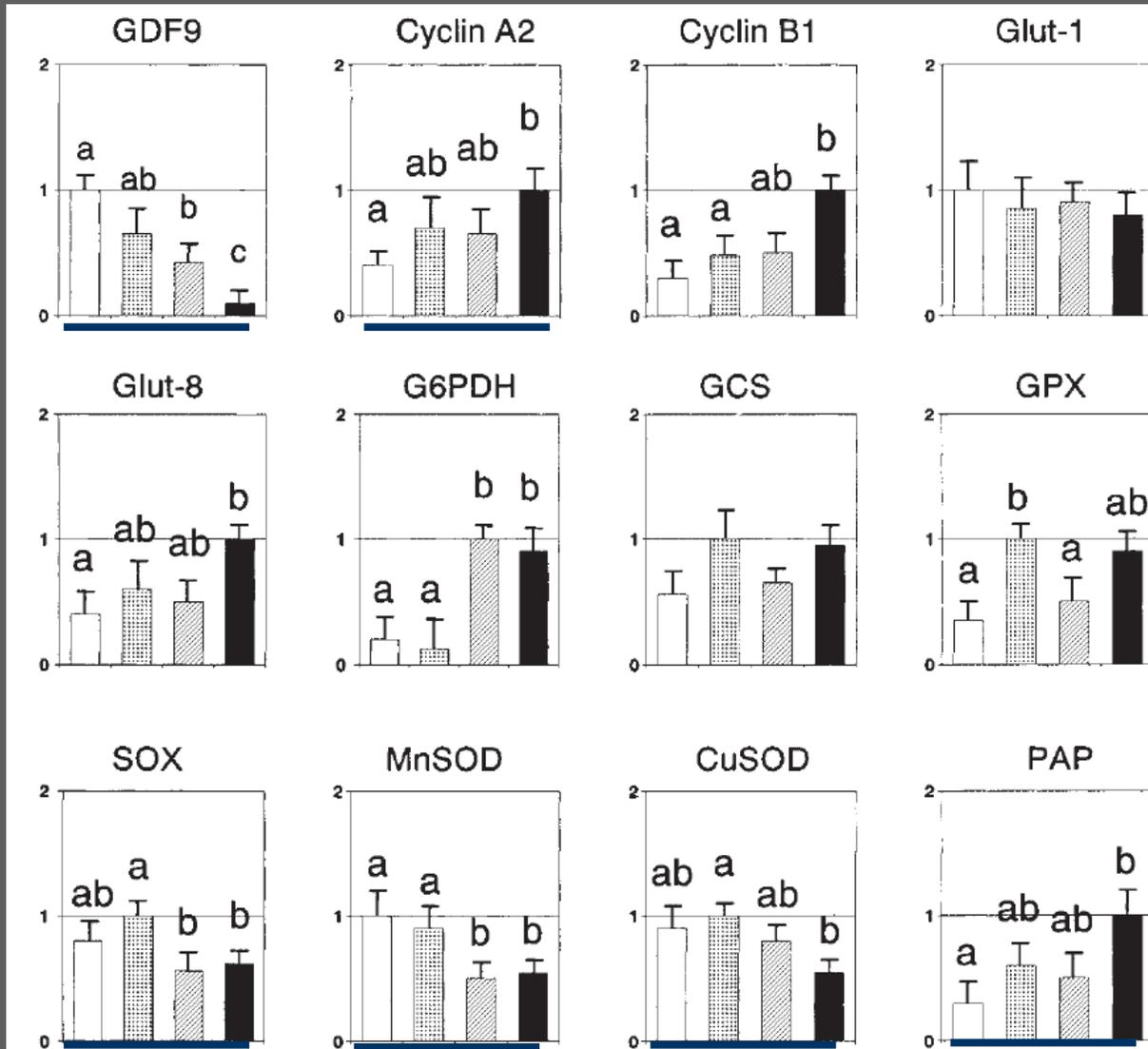


Zhang. Gene expression in human oocytes. Fertil Steril 2006.

Herança citoplasmática materna

A expressão gênica é diferente entre os maturados *in vivo* e maturados *in vitro*

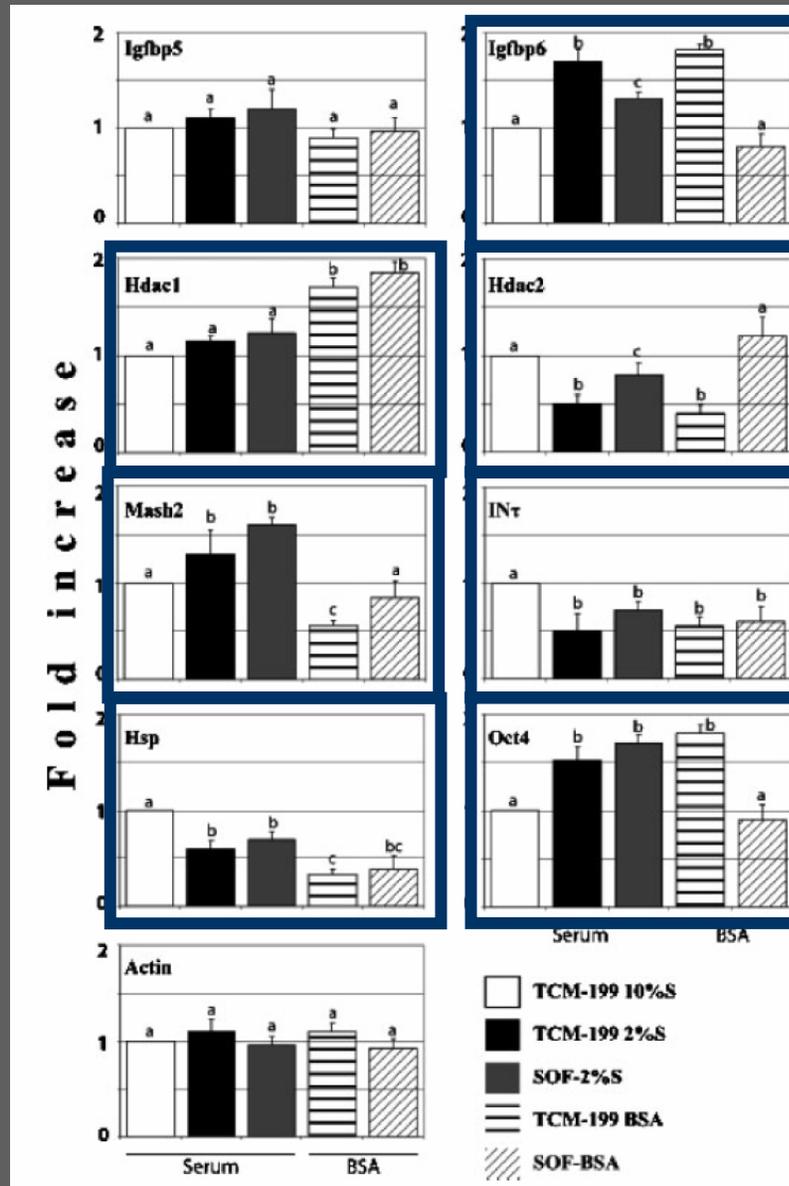
GV pos morten
MII post morten
GV OPU
MII OPU



Lonergan et al. 2003.
Mol Reprod Devel. 66:
297-305.

Herança citoplasmática materna

A expressão gênica é sensível ao meio de cultivo.



Russel et al. 2006.
Mol Reprod Devel.73:
1255-1270.

Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto

Table 1
Impact of different parameters on mRNA abundance in bovine oocytes and embryos

| Parameter | Abundance of gene transcripts (Increase ↑ or decrease ↓) | References |
|---|---|------------|
| Follicle size | RNApol1 ↓, PAP ↑ | [33] |
| | CycA ↑, Dja4 ↑, Msx1 ↑, NDFIP1 ↑, Oct4 ↑, SLBP ↑, Trappc ↑, Znf198 ↑, GDF9 ↑ | [14] |
| | DYNLL1 ↓, DYNC111 ↓ | [34] |
| | PSNB2 ↑, SKIIP ↑, CDC5L ↑, RGS16 ↑, PROX 1↑, H2A ↑, CKS1 ↑, PTTG1 ↑, CCNB2 ↑ | [20] |
| Stage of follicular growth | HSP ↓ (during in vivo maturation) | [35] |
| | PARN ↓, MSY2 ↓, PAP ↑, eIF-4E ↑, IP3R ↑, YY1 ↓ (in oocytes from persistent follicles) | [25] |
| Stage of meiotic maturation in vitro (GVBD-MII) | VEGF ↓, its receptors (flk-1 ↑ → ↓;flt-1 ↑ → ↓) | [36] |
| | PAT1 ↑ → ↓, uPA ↑ → ↓, MMP1 ↑ → ↓, bFGF ↑ → ↓, FGFR ↑ → ↓, TIMP1 ↑, TGFβ1 ↑ | [37] |
| | DYNLL1 ↓, DYNC111 ↓, PMSB1 ↓ | [34] |
| | GPX ↑ | [38] |
| | PGK ↓ | [39] |
| | YY1 ↓, HMGA1 ↓, RY-1 ↓ | [40] |
| | ZAR ↓, SUV39H1 ↓, G9A ↓ | [41] |
| Environment of maturation (in vitro vs in vivo) | GDF9 ↓, cyclin B1 ↑, G6PDH ↑, SOX ↓, MnSOD ↓, CuSOD ↓ | [38] |
| Supplementation of maturation medium | HSP ↑, PolyA ↓ (in serum-enriched medium) | [13] |
| | Na/K α1 ↓, cyclin A ↓ (in SOF without aa) | [42] |
| | FSHR ↓, Cx43 ↓, COX2 ↓, EP2 ↓, EP3 ↓ (in serum-enriched medium) | [19,43] |
| | FAS ↑, FASLG ↑, STAT3 ↑ (in leptin-supplemented medium) | [44] |
| Quality grade of COC | EP3 ↑ (in quality grade 1 COCs) | [43] |
| Timing of first cleavage | YEAFF ↑, IDH ↑, H2A ↑ (in early cleaving embryos) | [45] |
| | H3A ↑ (in early cleaving embryos) | [46] |
| | CCNB2 ↑, PTTG1 ↑ (in early cleaving embryos) | [20] |
| | FS ↑ (in early cleaving embryos) | [47] |
| Age of animals (calves vs. adult animals) | Glut1 ↓, eIF1A ↓ (in 8-16 cell embryos from calf oocytes) | [24] |
| | Subunits of inhibin (βA, βB) ↑, FS ↑ (in oocytes from adult animals) | [47] |

Wrenzycki et al. 2007. Theriogenology. In press



Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto

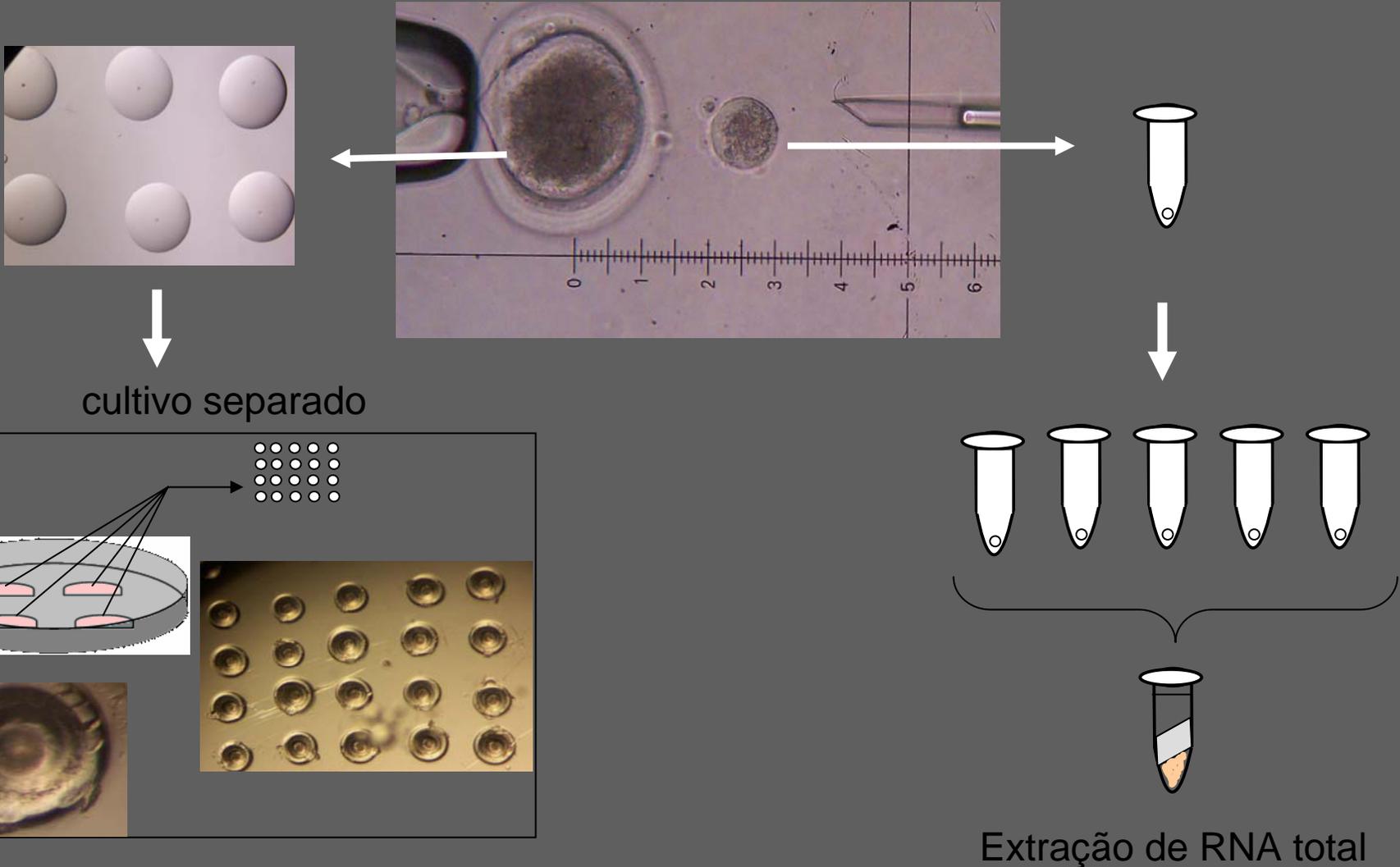
| Gene | Bloqueio | Organismo | Conseqüência |
|--------|----------------------|------------|----------------------------|
| Aatf | Mutação no gene | Camundongo | Não desenvolve blastocisto |
| Dppa3 | Mutação no gene | Camundongo | Bloqueio em 4 células |
| Pik3cb | Mutação no gene | Camundongo | Morte em E3.5 e E8.5 |
| Top2a | Funcional - RNA | Camundongo | Não desenvolve blastocisto |
| Top2a | Funcional - proteína | Camundongo | Bloqueio do zigoto |

Fonte: Gene ontology



Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto



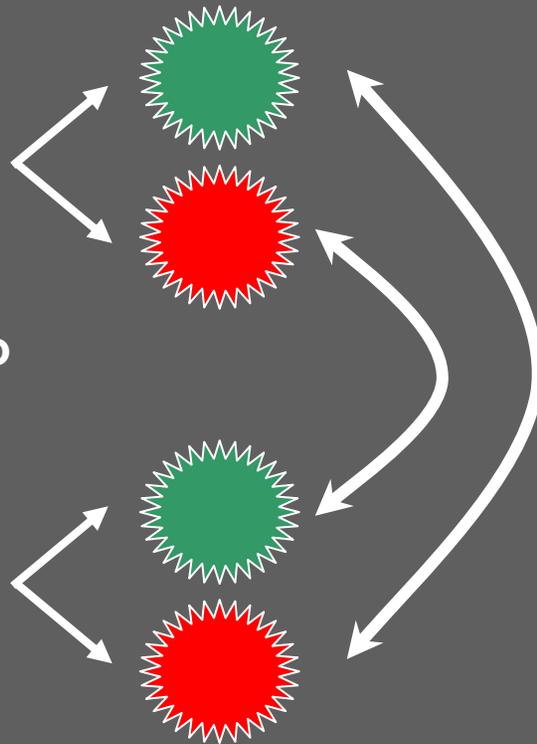
Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto

Oócitos cujos embriões tiveram o desenvolvimento bloqueado em 8-16 células



Amplificação de RNAm



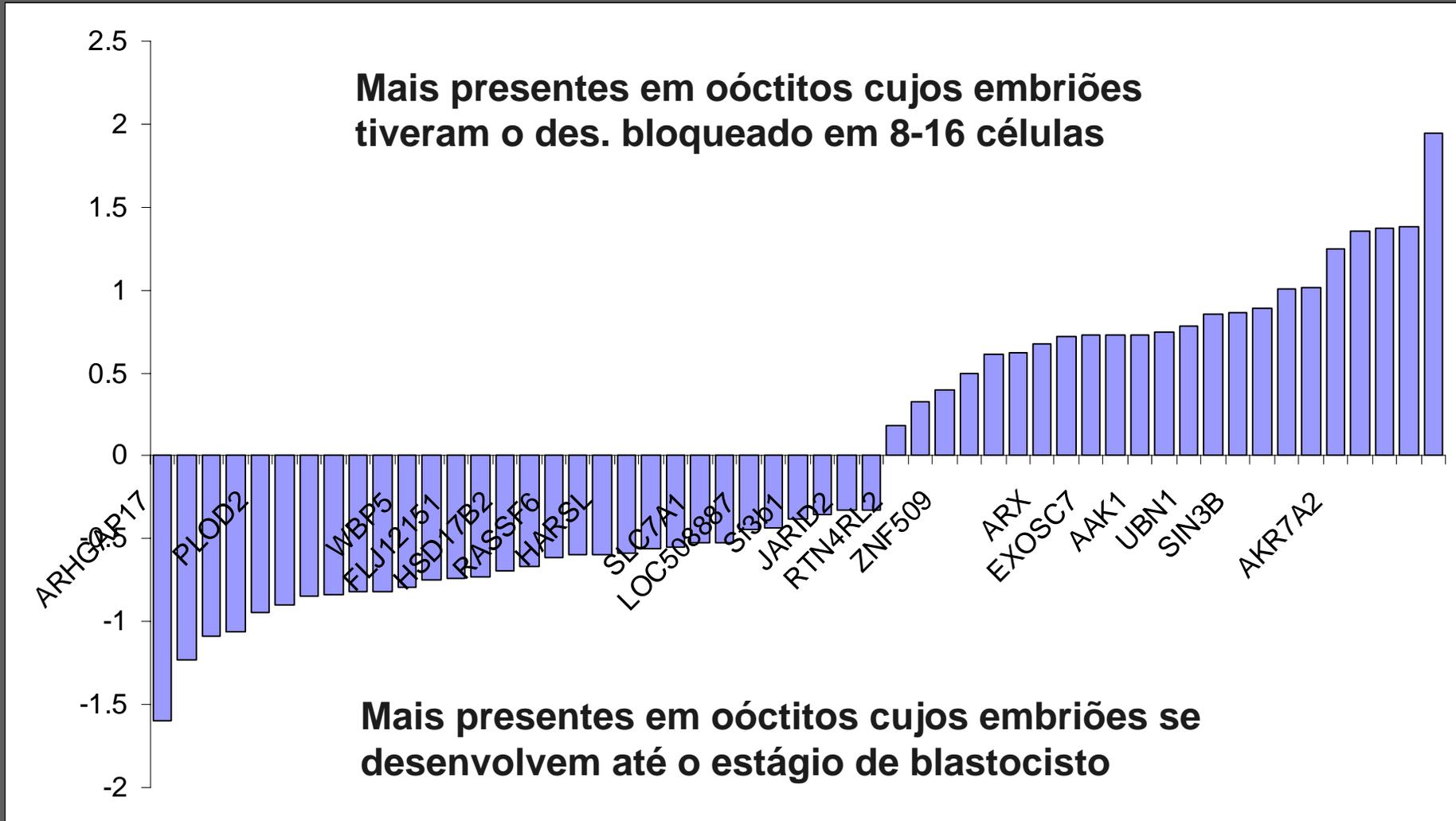
Oócitos cujos embriões se desenvolveram até o estágio de blastocisto



Análises de funcionalidade

Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto



Herança citoplasmática materna

Genes que tornam o oócito competente para o desenvolvimento de um blastocisto

| Gene Ontology : biological process. Level: 5 | Genes | N° genes | Percentage | Genes | N° genes | Percentage | Unadjusted pvalue | Adjusted pvalueFDR |
|--|---|----------|------------|---|----------|------------|-------------------|--------------------|
| intracellular signaling cascade | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A NRK | 2 | 20 | 1.778656e-01 | 9.773756e-01 |
| phosphate metabolic process | No genes | 0 | 0 | NRK AAK1 | 2 | 20 | 1.778656e-01 | 9.773756e-01 |
| regulation of cellular metabolic process | PHF8 JARID2 KLF3 | 3 | 23.08 | PPARGC1A UBN1 ARX SIN3B ZNF509 | 5 | 50 | 2.212949e-01 | 9.773756e-01 |
| transcription | PHF8 JARID2 KLF3 | 3 | 23.08 | PPARGC1A UBN1 ARX SIN3B ZNF509 | 5 | 50 | 2.212949e-01 | 9.773756e-01 |
| biopolymer modification | PLOD2 | 1 | 7.69 | PPARGC1A NRK AAK1 | 3 | 30 | 2.806324e-01 | 9.773756e-01 |
| RNA metabolic process | HARSL PHF8 SFRS14 JARID2 KLF3 | 5 | 38.46 | PPARGC1A UBN1 ARX EXOSC7 SIN3B ZNF509 | 6 | 60 | 4.136492e-01 | 9.773756e-01 |
| fat cell differentiation | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| positive regulation of cellular process | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| cellular macromolecule catabolic process | No genes | 0 | 0 | EXOSC7 | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| positive regulation of metabolic process | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| male gamete generation | No genes | 0 | 0 | TUBD1 | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| regulation of secretion | No genes | 0 | 0 | GCG | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| regulation of cell organization and biogenesis | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| response to nutrient levels | No genes | 0 | 0 | PPARGC1A | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| cell migration | No genes | 0 | 0 | ARX | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| peptide transport | No genes | 0 | 0 | GCG | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |
| cytoskeleton organization and biogenesis | No genes | 0 | 0 | TUBD1 | 1 | 10 | 4.347826e-01 | 9.773756e-01 |

Conclusão

- ***A herança citoplasmática (RNAs e proteínas) é de origem paterna e materna.***
- ***A presença de transcritos gênicos é dependente de:***
 - estágio de foliculogênese***
 - cultivo in vitro***
 - morfologia do oócito e COC***
 - idade do animal***
- ***A presença variável de transcritos entre os oócitos pode determinar a capacidade de desenvolvimento embrionário.***



• *Muito Obrigado*



Pós Doutorado

Alexandre R. Caetano
Yeda F. Watanabe
Sílvia Carambula
Gisele Z. Mignotti
Helena Javiel Alves
Fernando Henrique Biase

Doutorado

Raquel Z. Puelker
Paula Ripamonte
Selma C. Grossi
Cristina Ramires
Érica Marson
Luiz Gustavo Figueiredo
Giovana F. K. Merigue
Fernando Henrique Biase
Alexandre
Sylvia Cortezzi
Moyses S. Miranda
Felipe Braga
Walt Yamazaki

Mestrado

Paula Ripamonte
Sheila Merlo Garcia
Isabelle E. Picada
Lígia Mesquita
Patrícia M. Porciúncula
Weruska K. Biase

Inic. Científica

José B. F. Ferraz Neto
Marcos Chiaratti
Katia L. Scharz
Mariana Baccaglioni
Minus Esperandio
Renata. C. Cabral
Aline M. Cesar
Flávio Perna Junior
Thiago H. C. de Bem
Fabiana Bressan
Felipe Braga

Estagiários

Edson Lo Turco
Ricardo Bertola
Mariana Marques
Felipe Braga
Felipe Perecin
Lígia Mesquita
Patrícia M. Porciúncula
Paula Costa
Sérgio Jordão F.

Técnicos

Giovana K. Merigue
Nilton P. Santos

Colaboradores

Alexandre R. Caetano
Ana Maria A. Spin
André Dayan
Anneliese Traldi
A. Augusto M. Maia
Antônio Belizario

Bruce Murphy
Carlos E. Ambrósio
Cesar R. Esper
Ciro M. Barros
Claudia L. V. Leal
Eduardo Krieger
Eric Straus
Estela Bevilaqua
Flávia T. V. Pereira
Francisco A. M. Duarte
Francisco H. Blazquez
Jefrey Lui
Guilherme Nogueira
Joanir P. Eler
Joaquim M. Garcia
J. Antônio Visintin
J. Bento S. Feraz
J. Buratini Junior
J. Roberto Kifouri
J. Fernando Garcia

Lawrence C. Smith
Lia A. Coelho
Lucia Martelli
Luiz L. Coutinho
Luiz Figueira
M. Angélica Miglino
Mario Binelli
Mariza P. de Melo
Mayra Ortiz
Maurício Bacci
Michele R. Waratanabe
Otávio M. Ohashi
Paula Papa
Paul DeSousa
Ralph Steinborn
Raysildo B. Lôbo
Rodolfo Rumpf
Rubens P. Arruda
Viviane A. Nunes
Yeda F. Watanabe



Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal

11 e 12 de junho de 2007

GENOMIC IMPRINTING E SUAS IMPLICAÇÕES EM PRODUÇÃO ANIMAL

Simone Cristina Méo Niciura

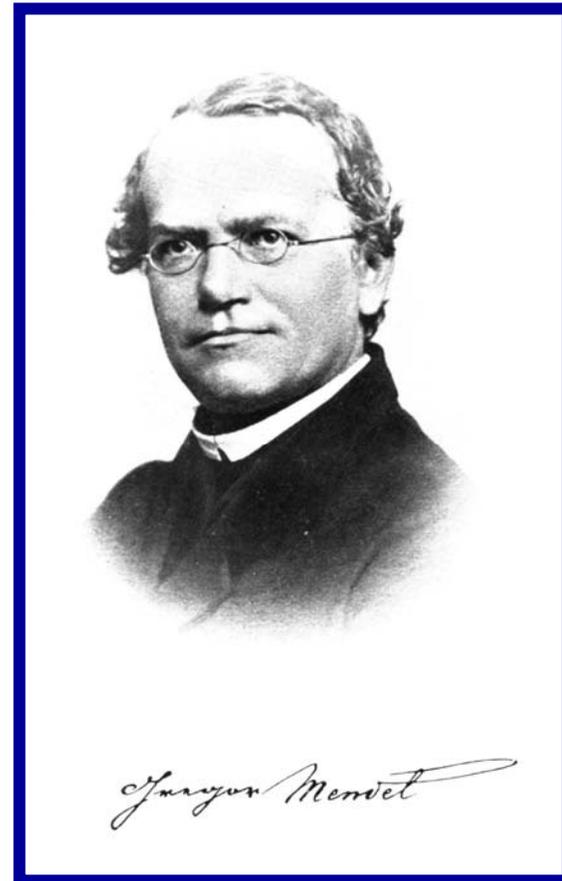
simone@cpps.eembrapa.br

GENOMIC IMPRINTING ?

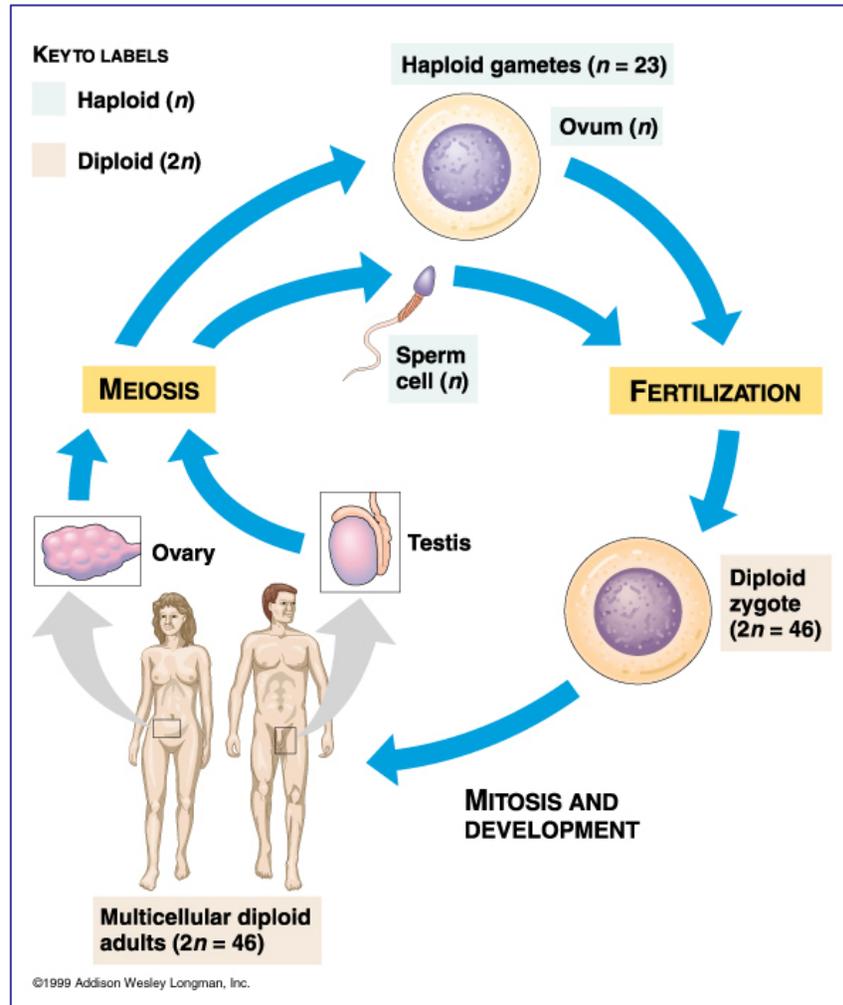
INTRODUÇÃO

Herança Mendeliana

- Cada genitor fornece um gameta para descendente
 - Conjunto haplóide de cromossomos
- Contribuição genética idêntica dos pais para a progênie



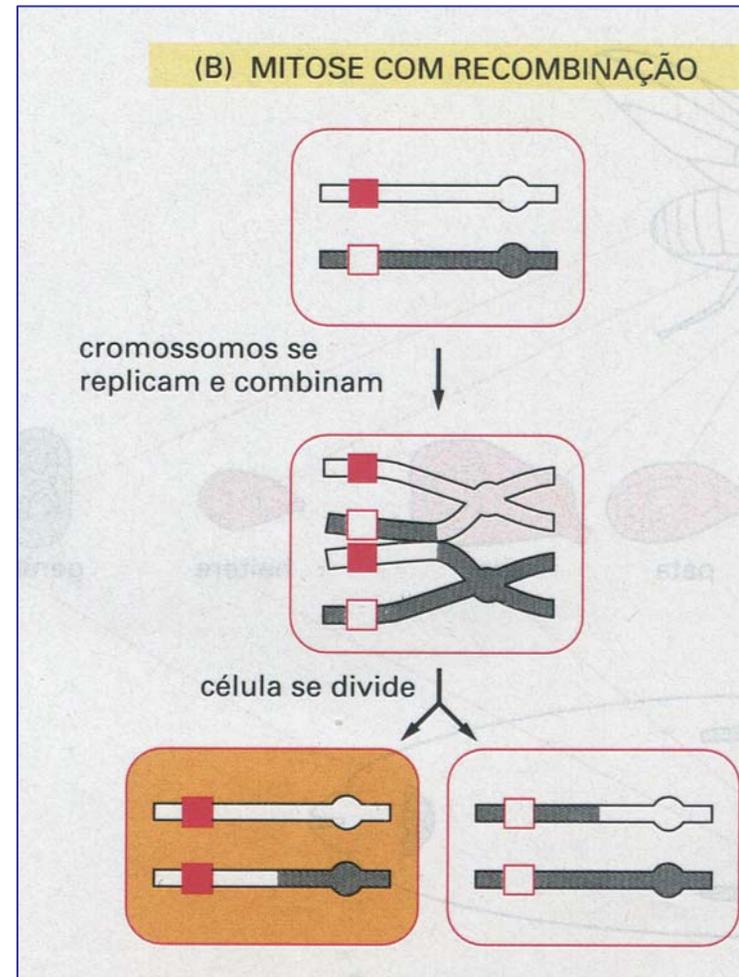
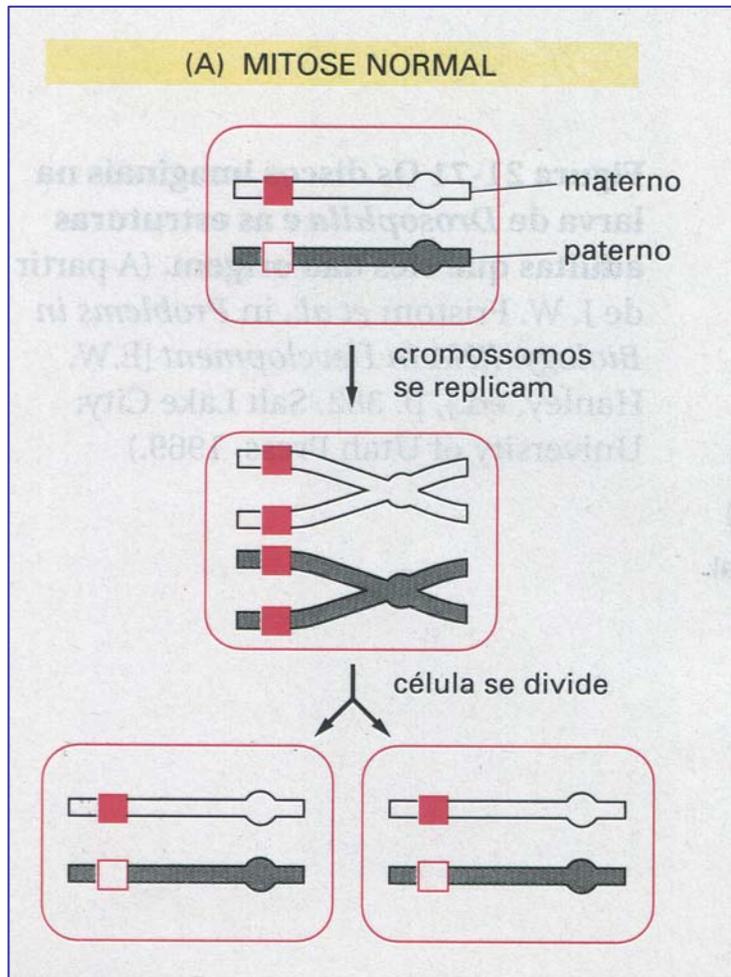
HERANÇA MENDELIANA



DESVIOS DA HERANÇA MENDELIANA

- Para alguns genes
- Observados em:
 - Dissomias uniparentais (UPD)
 - Camundongos transgênicos
 - Embriões monoparentais: androgenéticos e ginogenéticos/partenogenéticos

DISSOMIAS UNIPARENTAIS



Alberts et al., 1997

CAMUNDONGOS COM UPD

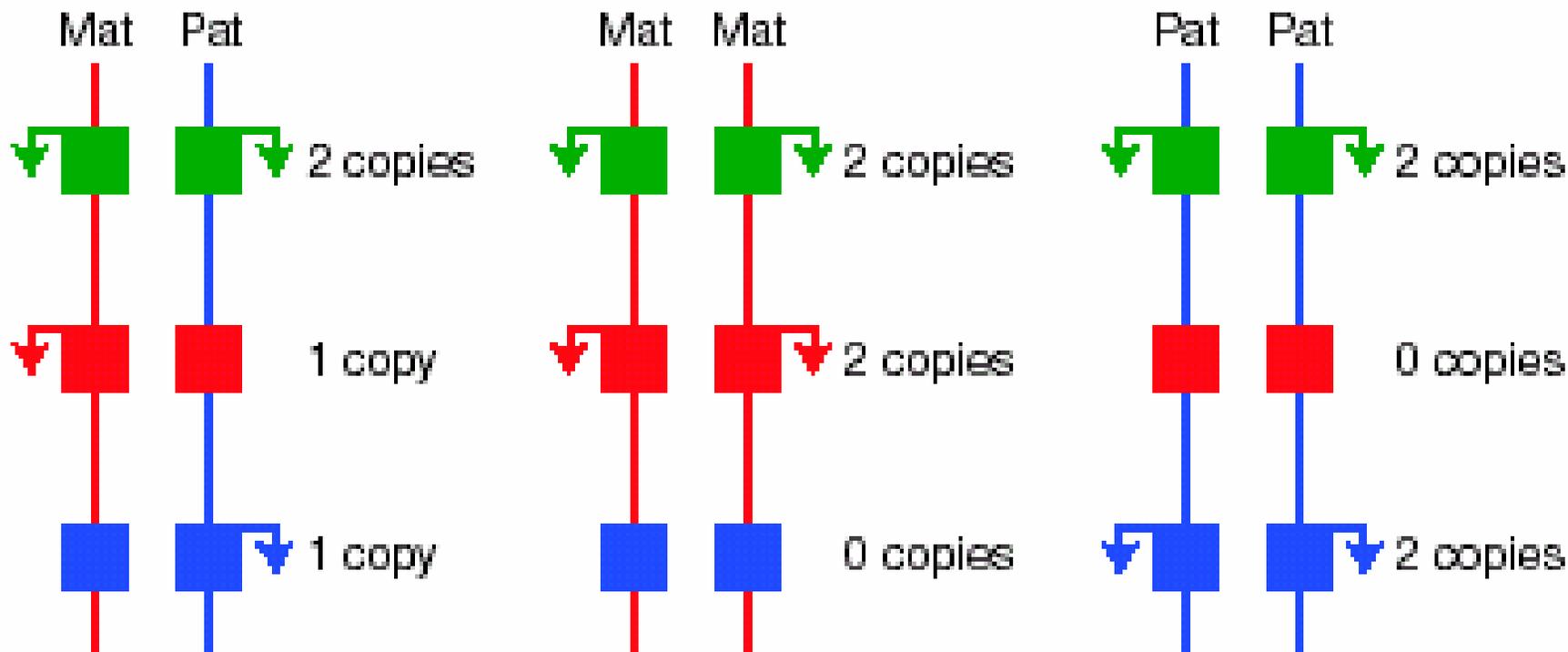
- Dissomia na porção proximal do cromossomo 11:
 - **Paterna:** animal de maior tamanho
 - **Materna:** animal de menor tamanho

ANIMAIS PORTADORES DE TRANSLOCAÇÕES: UPD

a Normal

b Maternal UPD

c Paternal UPD

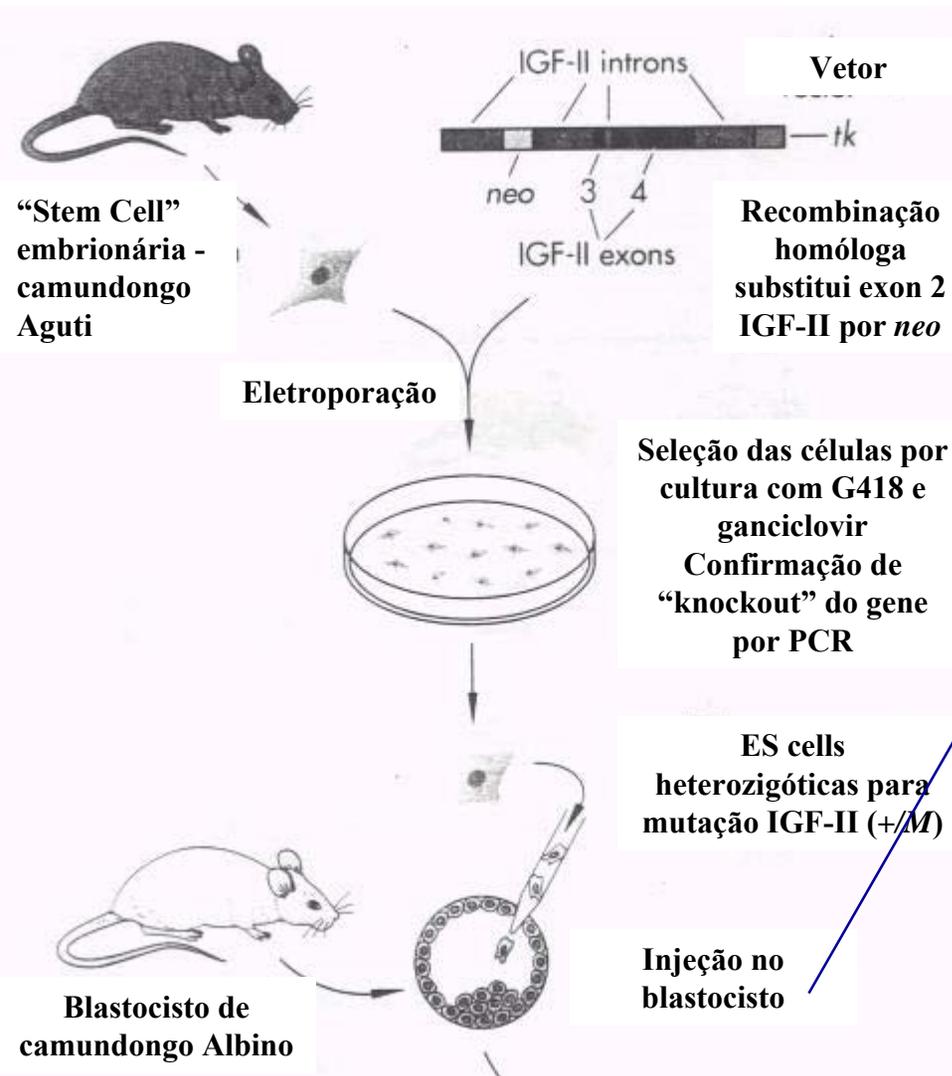


Hitchins e Moore, 2002

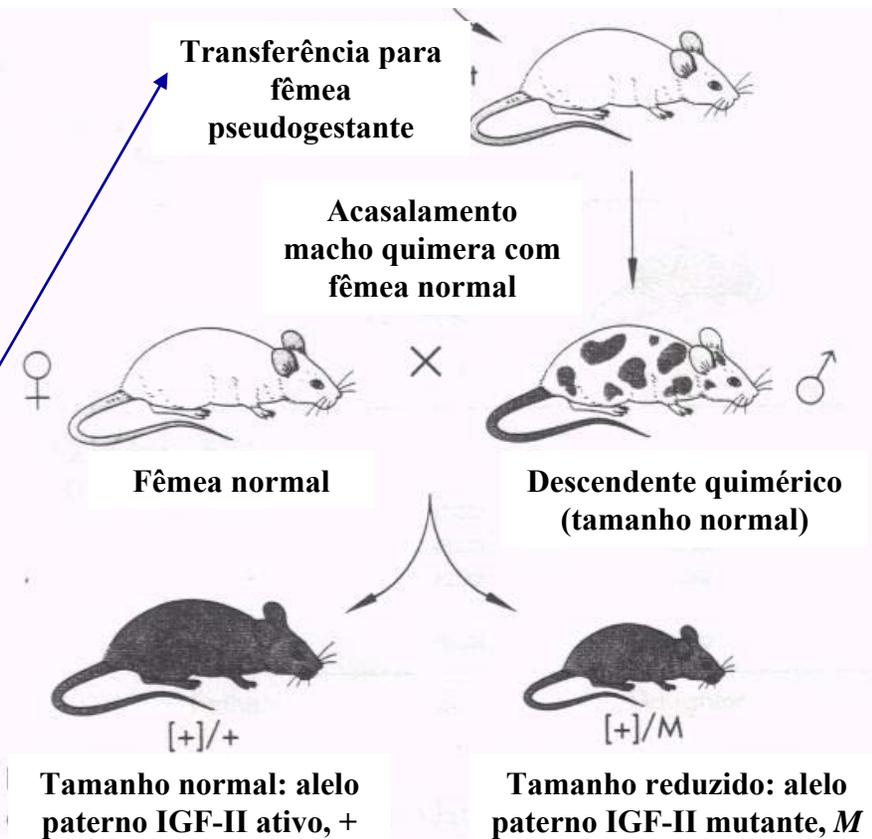
CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS

- **Gene *Igf2*** (codifica IGF-II): inativado por mutação:
 - Inativação do **alelo paterno**: crescimento retardado (redução de 40% do tamanho)
 - Inativação do **alelo materno**: crescimento normal
- **Conclusão**: o *Igf2* transcrito é o **paterno**

Camundongos Transgênicos



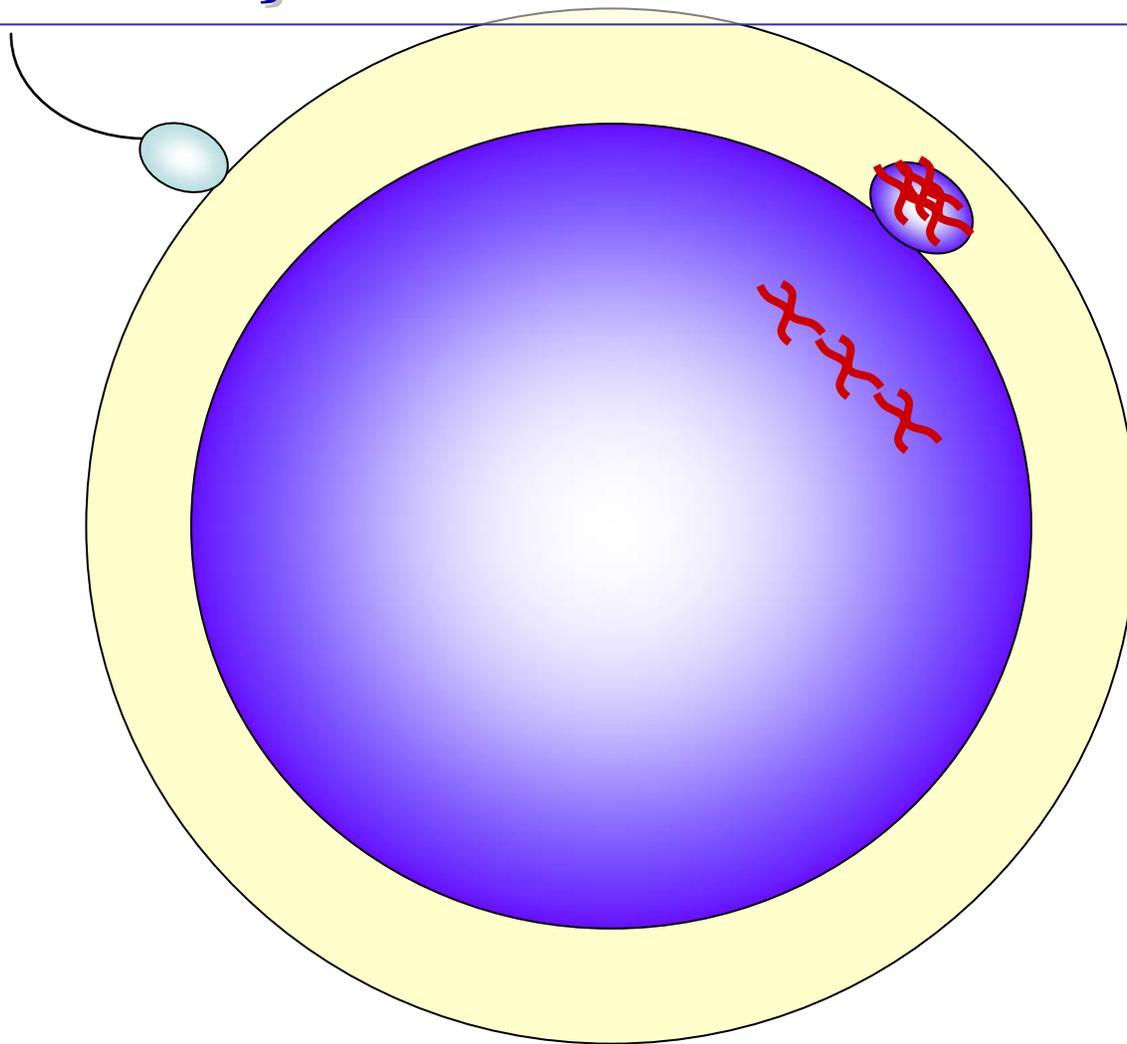
Watson et al., 1992



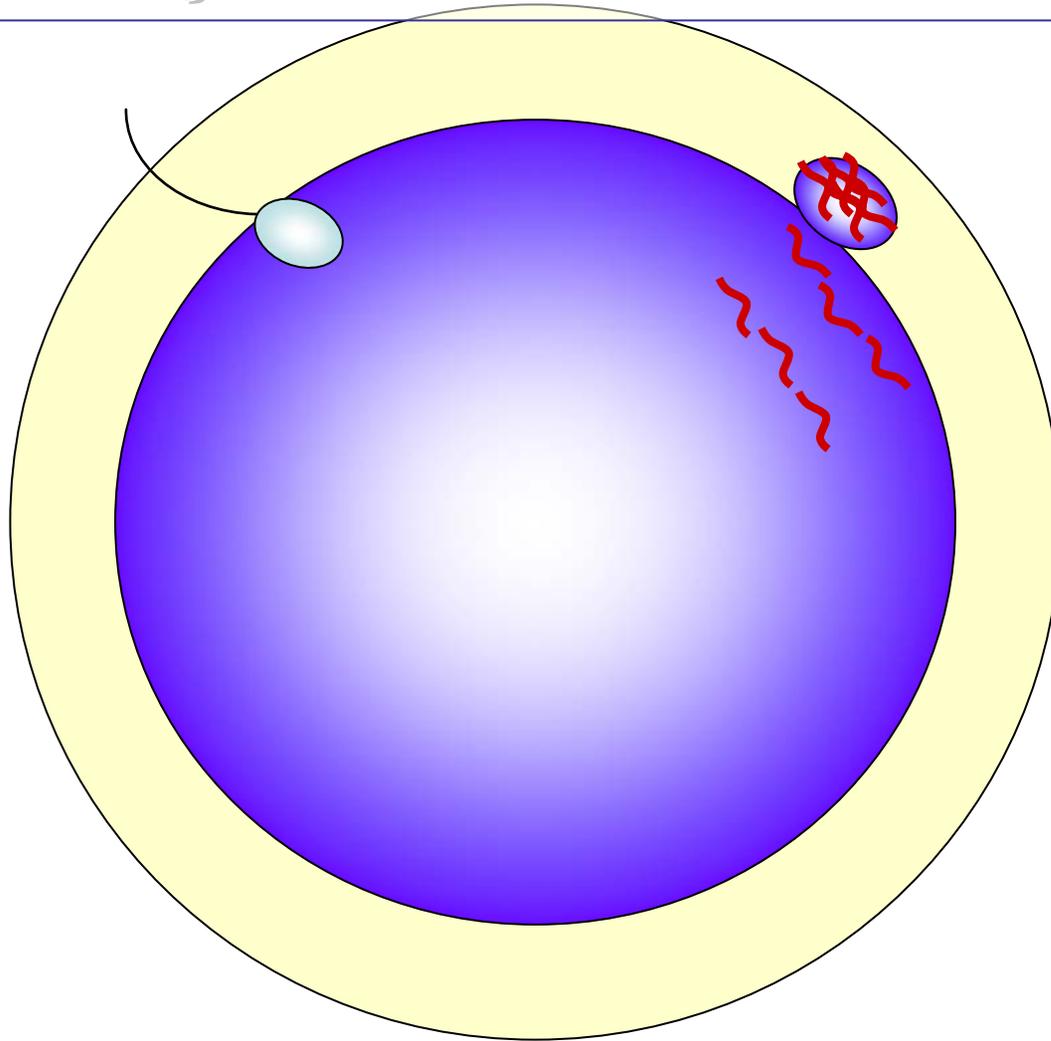
EMBRIÕES DIPLÓIDES MONOPARENTAIS

- Produzidos por transferência de pronúcleos:
 - **Ginogenético**: pronúcleos femininos
 - **Androgenético**: pronúcleos masculino
- Ausência de desenvolvimento: morte no período próximo à implantação

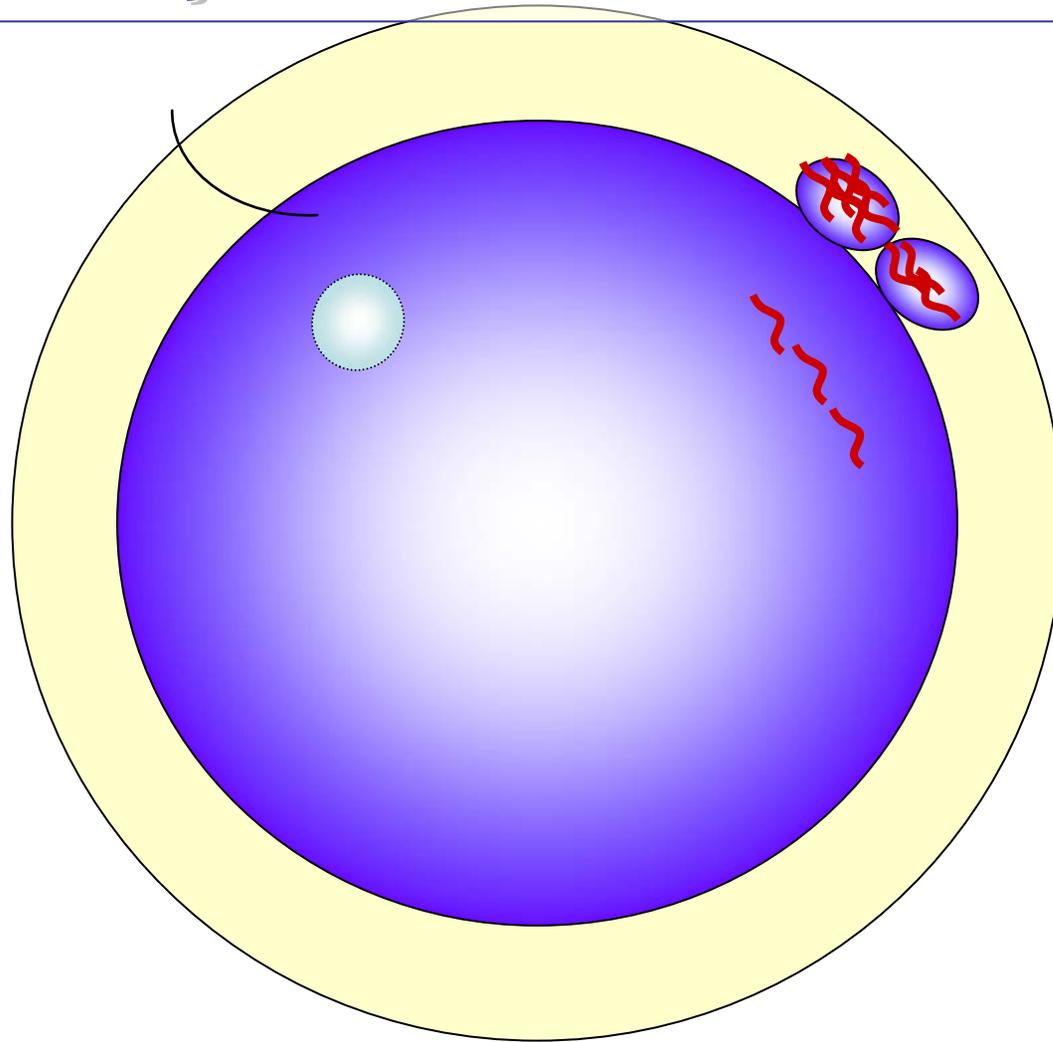
FORMAÇÃO DOS PRONÚCLEOS



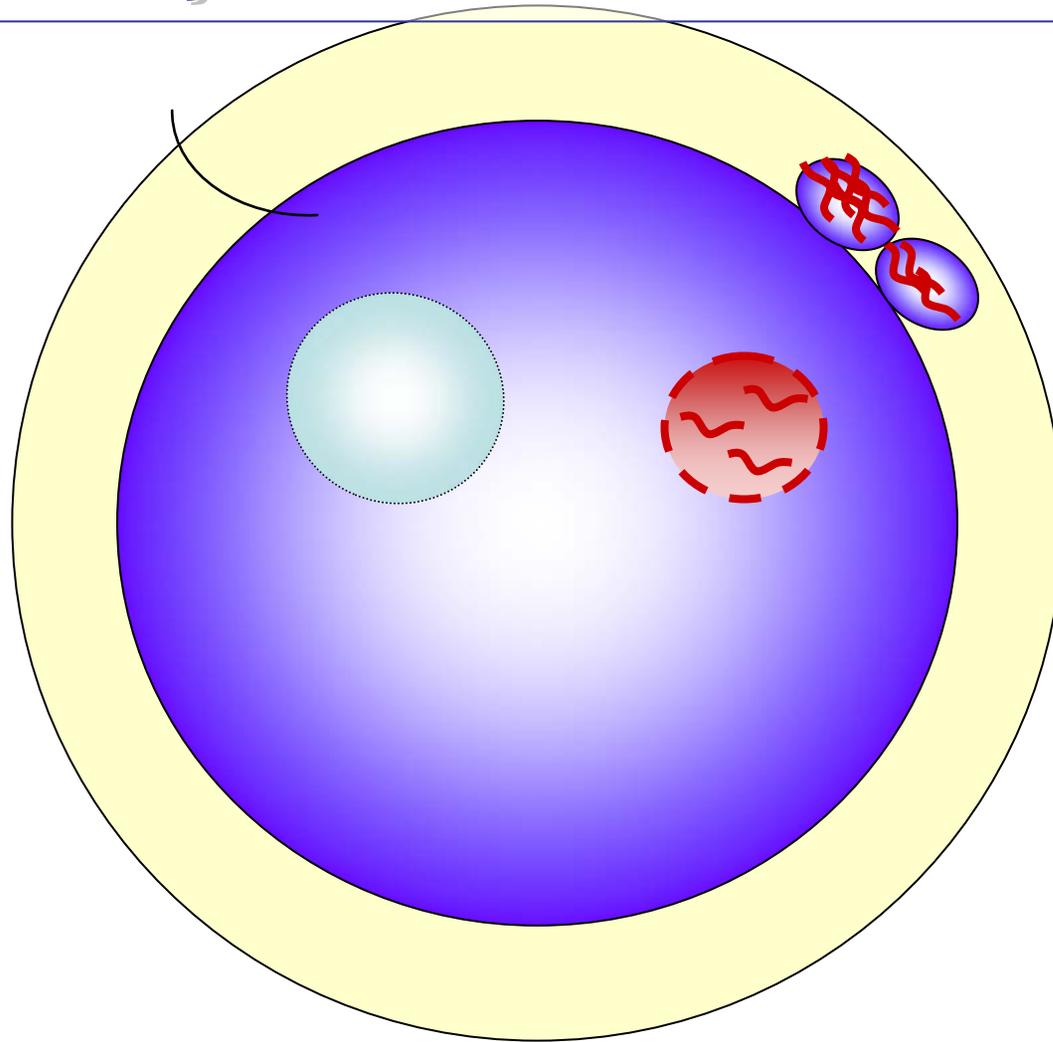
FORMAÇÃO DOS PRONÚCLEOS



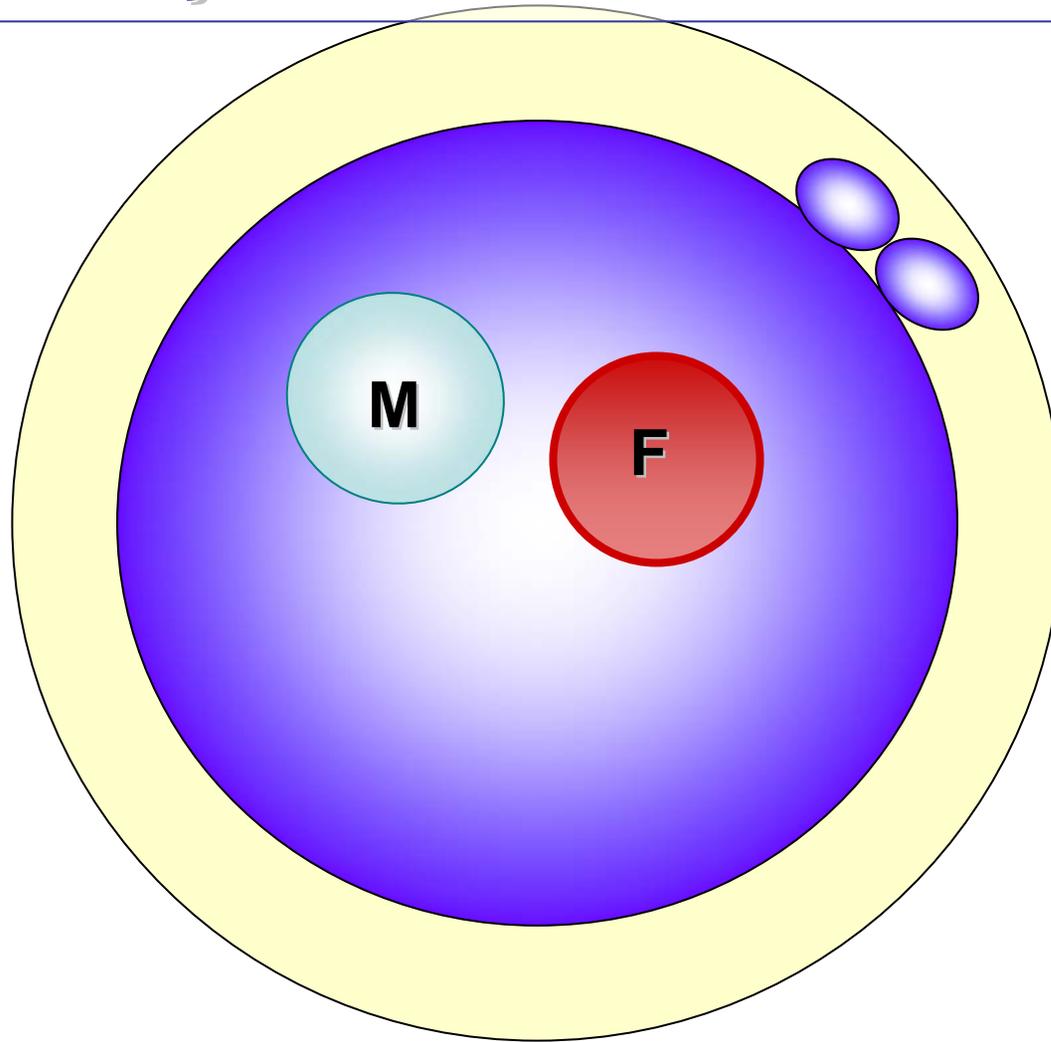
FORMAÇÃO DOS PRONÚCLEOS



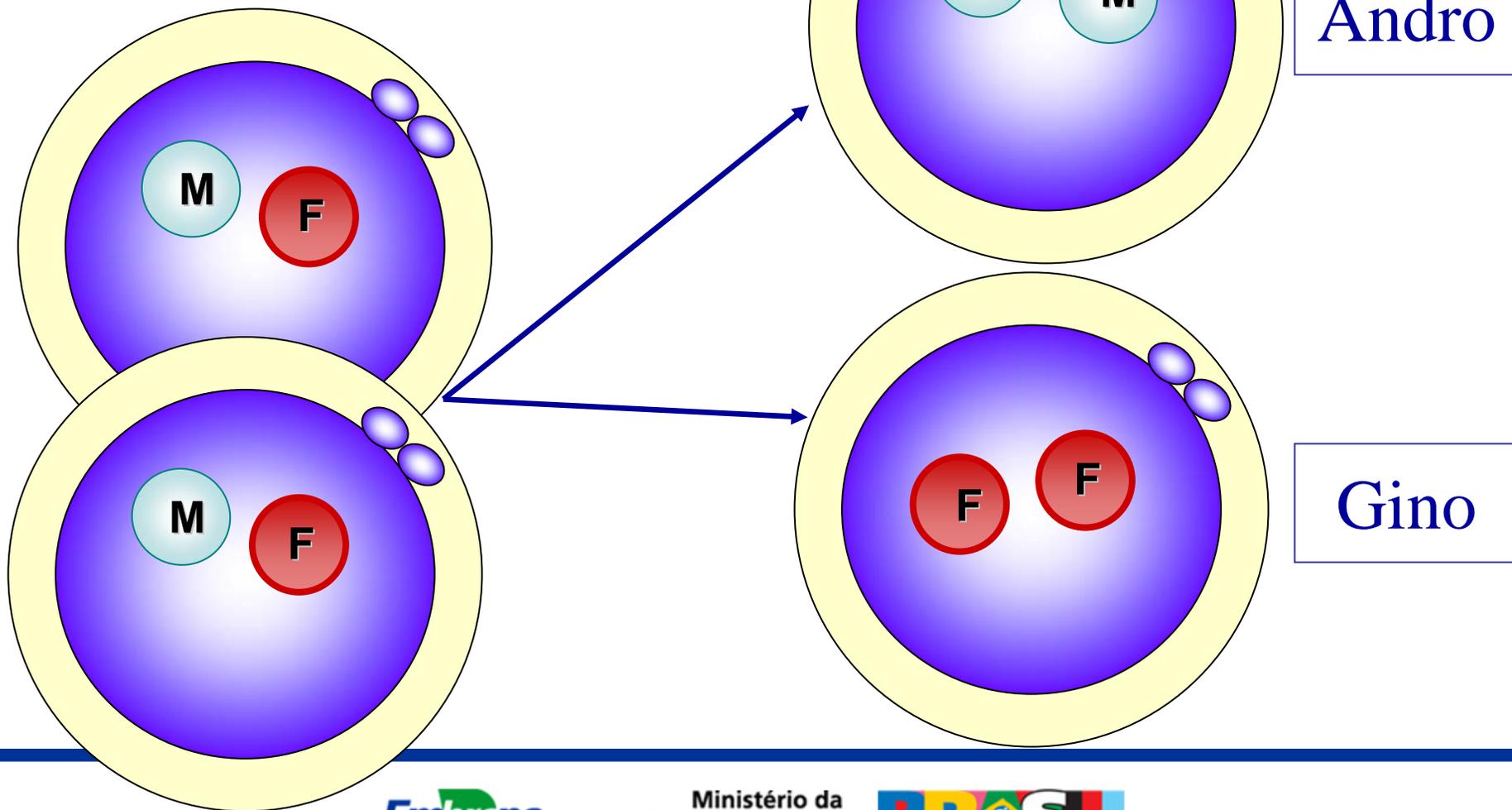
FORMAÇÃO DOS PRONÚCLEOS



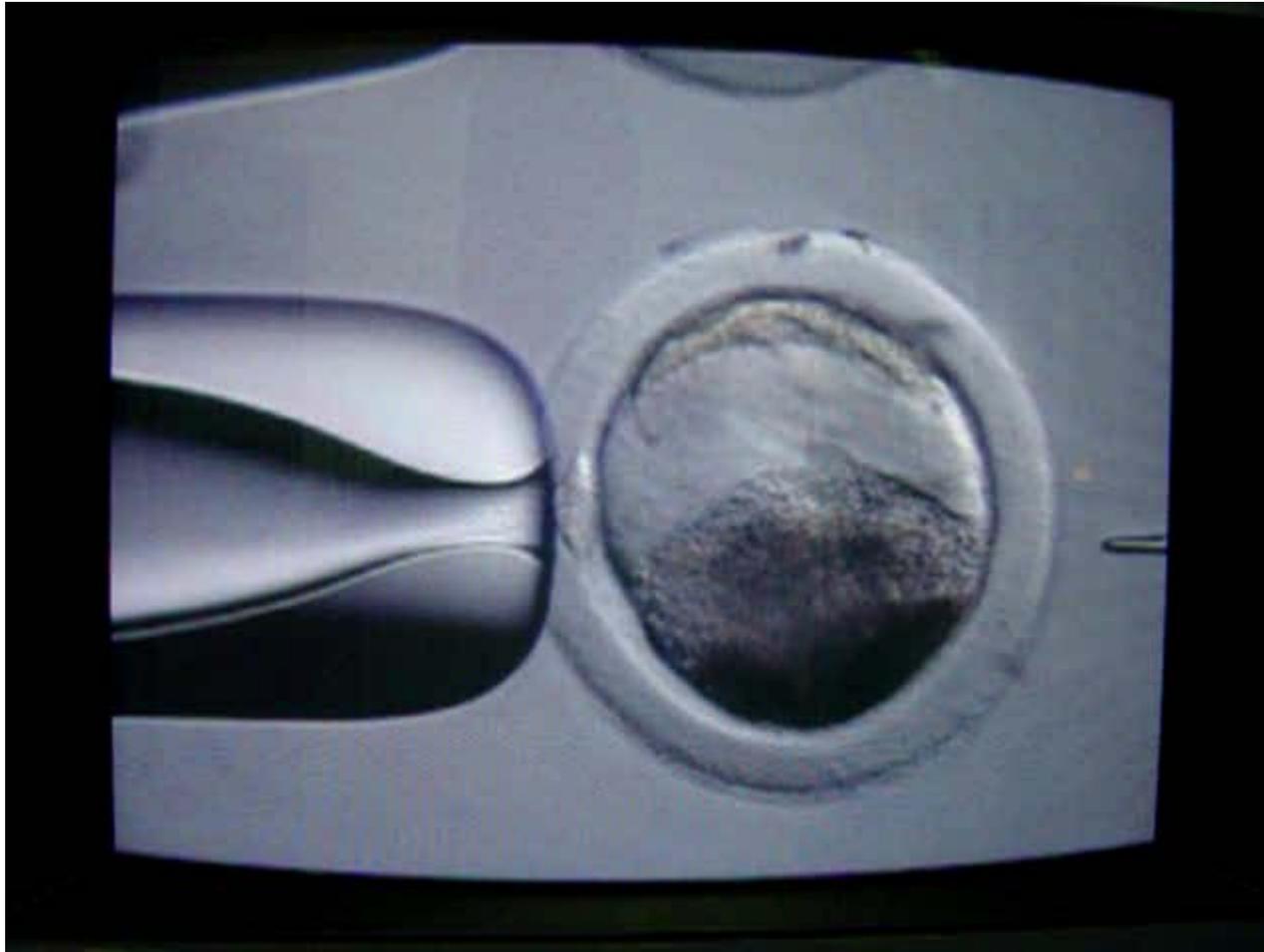
FORMAÇÃO DOS PRONÚCLEOS



Transferência de Pronúcleos



TRANSFERÊNCIA DE PRONÚCLEOS



EMBRIÕES MONOPARENTAIS

CAMUNDONGOS

- **Ginogenéticos:** desenvolvimento normal até blastocisto, embrião bem desenvolvido (25 somitos no D10), deficiente em tecido extra-embrionário
- **Androgenéticos:** desenvolvimento retardado até blastocisto, não progridem além de 4 a 6 somitos, tecidos extra-embrionários bem desenvolvidos

Camundongos Monoparentais

- **Gene maternos:**
desenvolvimento do embrião propriamente dito
- **Genes paternos:**
formação da placenta

Kendrew, 1994

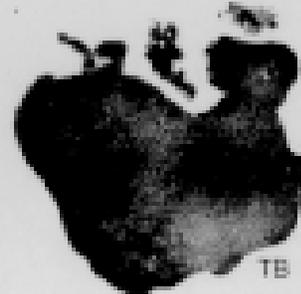
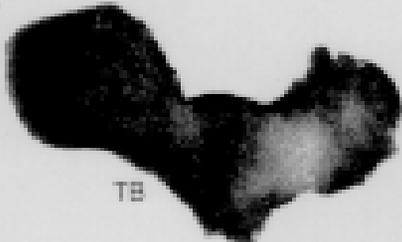
Zigoto fertilizado

Ginogenoto

Androgenoto



Dia 10 da gestação



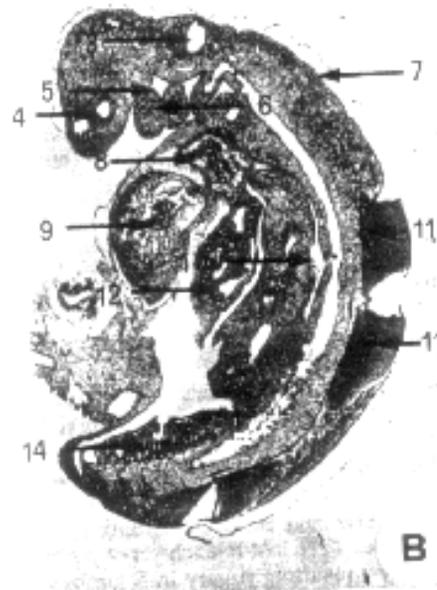
EMBRIÕES MONOPARENTAIS

- Produzidos por ativação partenogenética:
 - **Aumento Ca^{2+}** : estrôncio, ionomicina, cálcio ionóforo, etanol, eletrochoque
 - **Inibição síntese protéica ou fosforilação**: ciclohexemide, 6-DMAP
- Material genético exclusivamente materno: incompatível com a vida

EMBRIÕES PARTENOGENÉTICOS

OVINOS

- **Morte:** 25-26 dias de gestação



Loi et al., 1998

EMBRIÕES PARTENOGENÉTICOS

BOVINOS

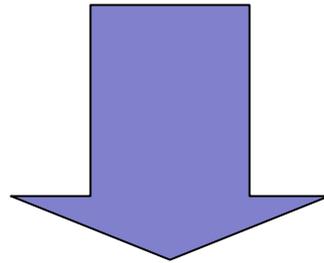
- **Desenvolvimento:** 35-36 dias de gestação



Méo-Niciura, 2005

CONCLUSÕES

- Desenvolvimento do conceito depende dos genes paternos e maternos
- Diferenças na contribuição genética dos pais para a progênie



GENOMIC IMPRINTING

GENOMIC IMPRINTING

- **Definição:**

Expressão de um gene dependente de sua origem parental (materna/paterna)

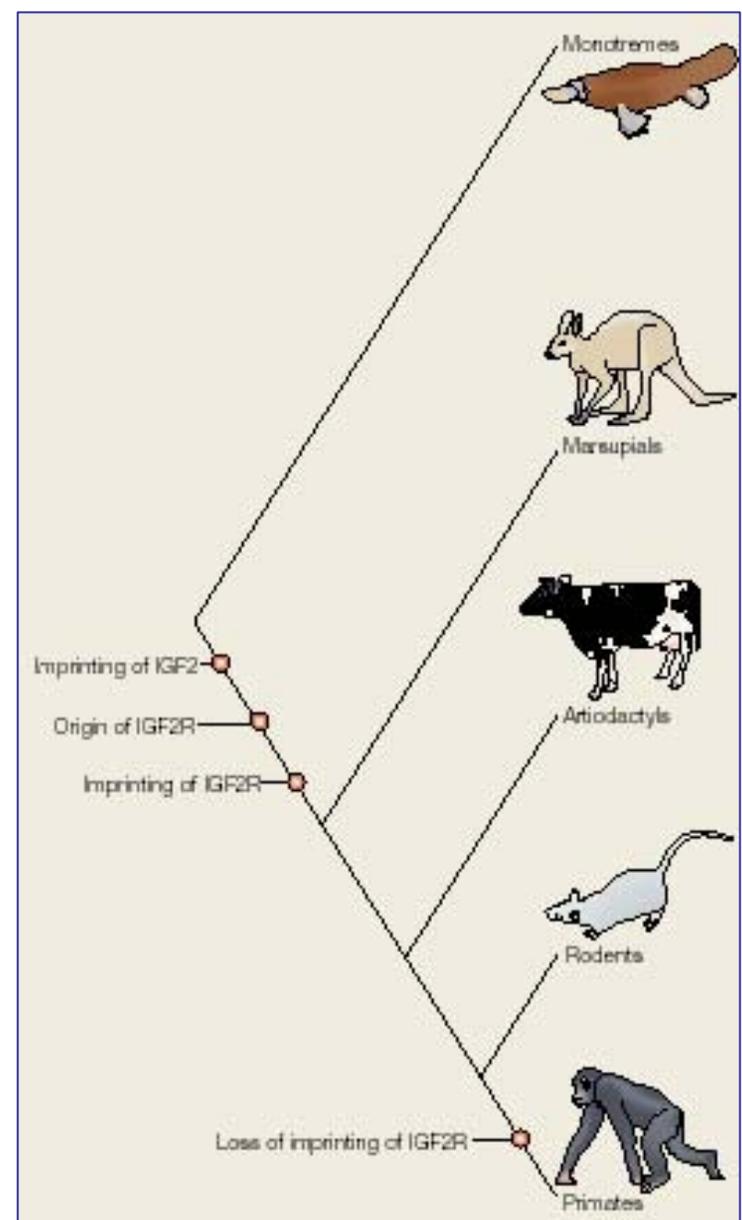
- Atividade do gene na progênie depende do sexo do progenitor a partir do qual o alelo foi herdado
- Alguns genes só são expressos por alelos maternos e outros só por paternos

GENOMIC IMPRINTING

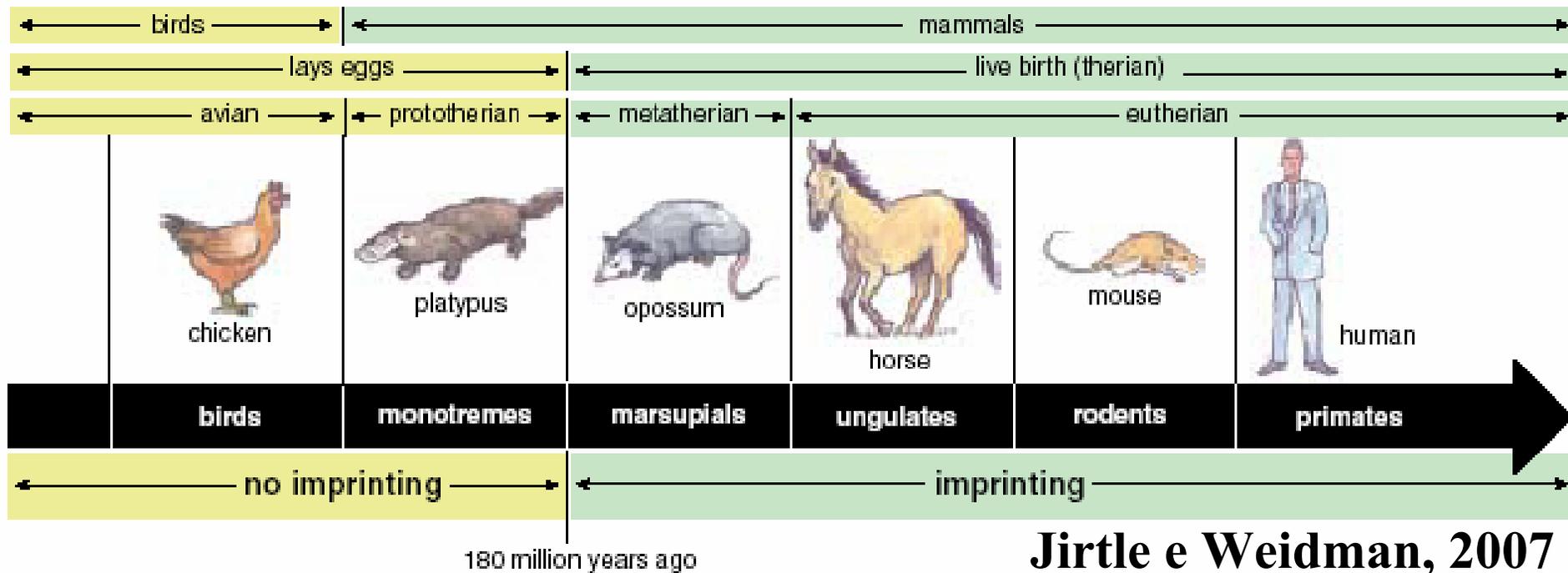
- **Impressão Genômica**
- **Modificação epigenética (citoplasmática):** afeta a informação codificada pela seqüência de nucleotídeos → altera fenótipo sem modificar genótipo
- Ocorre em genes autossômicos de mamíferos eutérios (obs.: marsupiais, plantas e insetos)
- Acarreta em desvios da herança mendeliana

Evolução dos Genes *Imprinted*

Wilkins e Haig, 2003



EVOLUÇÃO DOS GENES *IMPRINTED*

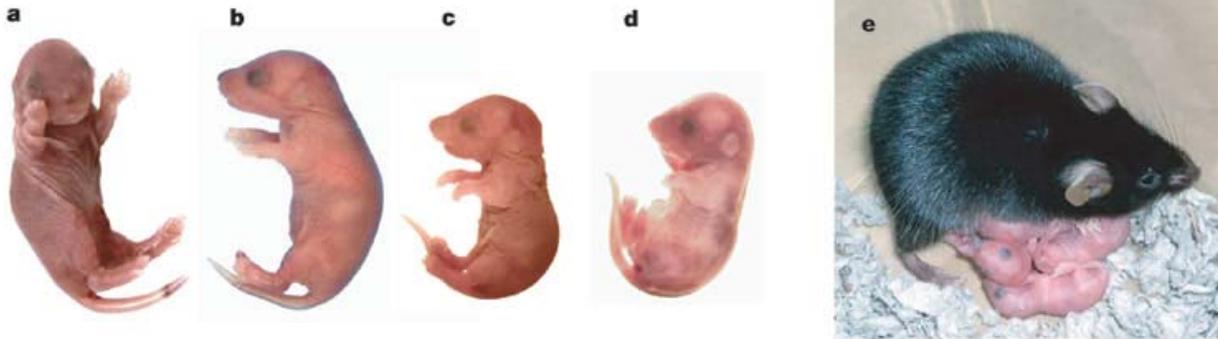


GENOMIC IMPRINTING

Características dos genes *imprinted*:

- Transmitidos para as células-filhas e reversíveis
- Distribuídos em grupos (sofrem interação)
- Apresentam: assincronia na replicação do DNA (alelo paterno replica primeiro), seqüências repetitivas e poucos e pequenos íntrons
- Específicos para tecidos, estádios do desenvolvimento e espécies (aquisição evolutiva)

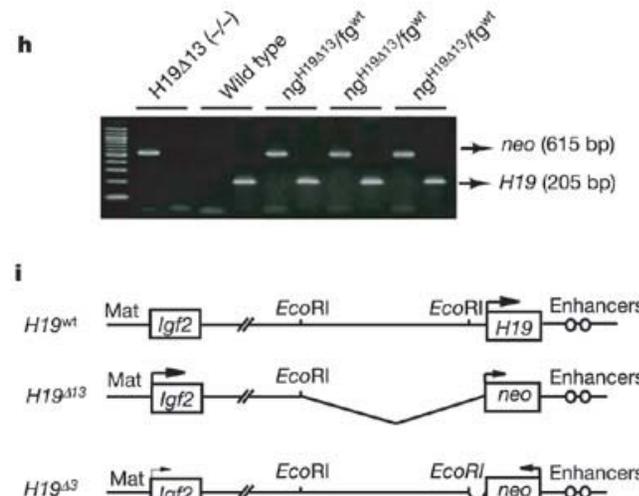
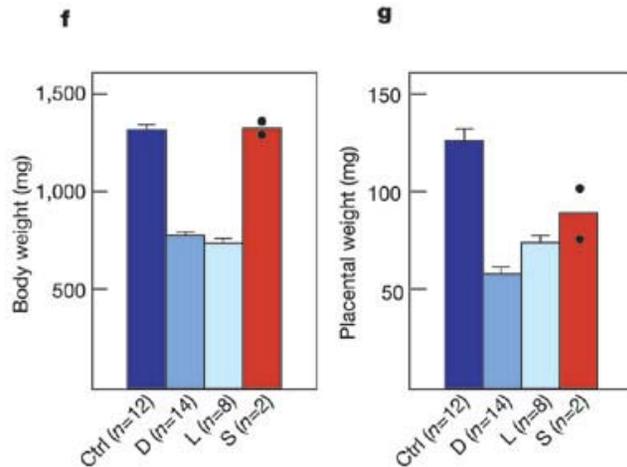
INTERAÇÃO GENES *IMPRINTED*



Manipulação do genoma: aumento *Igf2* e expressão monoalélica

H19 → normalização expressão 32 genes *imprinted* e nascimento partenogenético

Kono et al., 2004



HIPÓTESES

- **Teoria do Conflito Genético ou “Batalha dos Sexos”:**
 - Conflito entre genes maternos e paternos durante a gestação
 - Mamíferos - fetos nutridos a partir dos tecidos maternos
 - Regulação entre demanda por nutrientes (feto) e suprimento de nutrientes (mãe)

HIPÓTESES

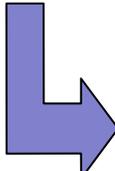
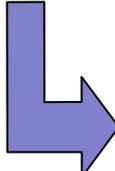
- **Teoria do Conflito Genético:**



Jirtle e Weidman, 2007

- **Pai:** promoção de crescimento do feto → aumenta chances de produzir descendentes
- **Mãe:** controle de crescimento do feto → assegura sucesso do parto e de futuras gestações

HIPÓTESES

- **Teoria do Conflito Genético: *Igf2* e *Igf2r***
 - O gene *Igf2* codifica IGF-II, que promove crescimento do feto
 **Expresso Paterno**
 - O gene *Igf2r* codifica o receptor de IGF-II, que controla sua disponibilidade e utilização
 **Expresso Materno**

HIPÓTESES

- Teoria “Modelo de Desenvolvimento”:
 - Aquisição evolutiva em resposta à pressão ambiental → induz a rápidas mudanças de expressão ou à inativação dos alelos parentais de acordo com a necessidade
 - **Controversa:** *imprinting* (haploidia) *versus* diploidia, que protege contra mutações recessivas deletérias

HIPÓTESES

- **Teoria do “Ovário Bomba-Relógio”:**
 - Evita partenogênese
 - Assegura reprodução sexuada (variabilidade genética)
 - Protege a mãe contra doenças malignas do trofoblasto
- **Vigilância contra perda de cromossomos:**
previne câncer e defende contra DNA estranho

PARTENOGENÊSE

- **Dragão-de-comodo:**



Watts et al., 2006

- **Fêmea:** sexo heterogamético (cromossomos Z e W)
- **Partenogênese:** produz machos ZZ e WW

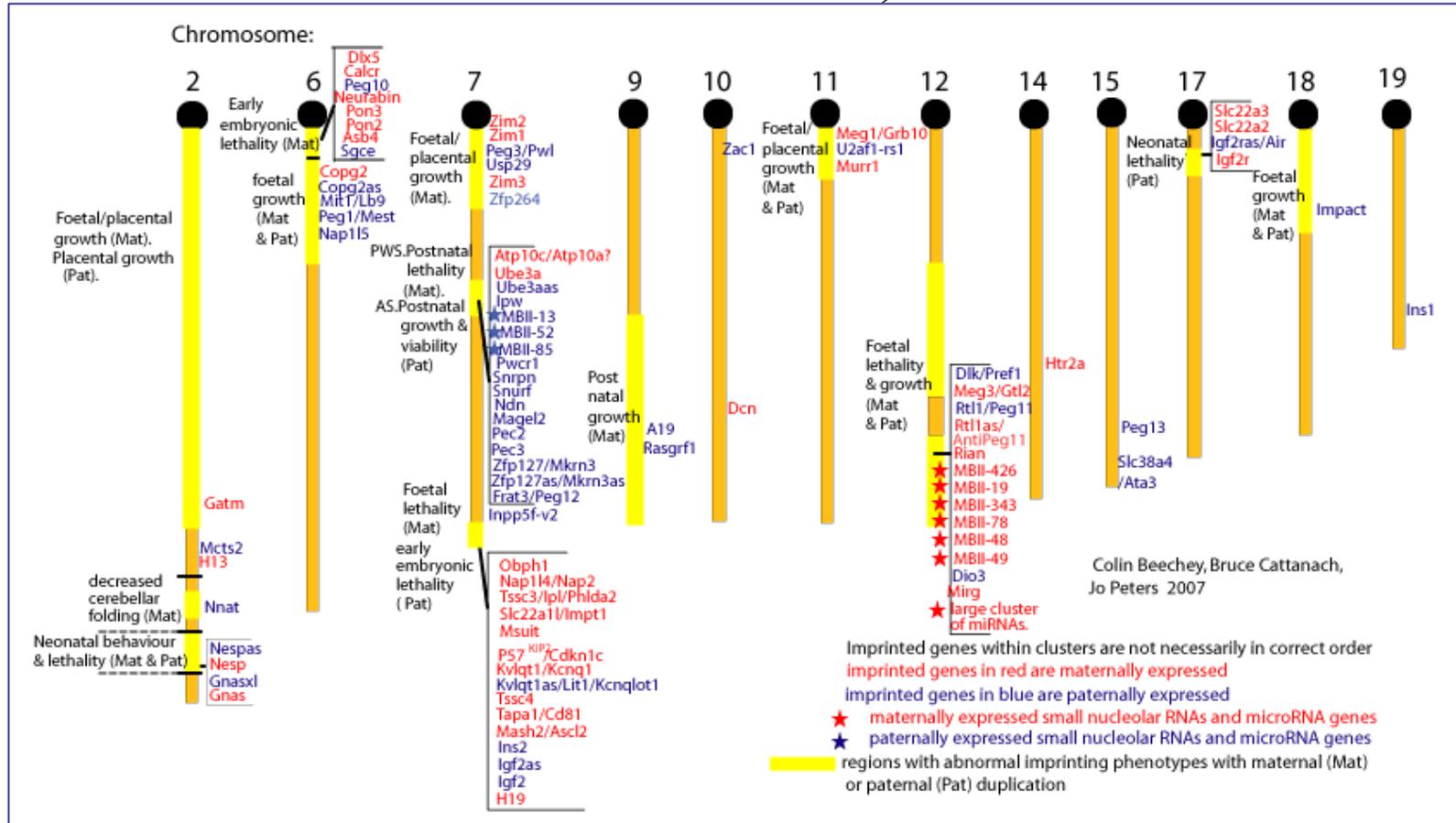
GENES *IMPRINTED*

- **No genoma:** estimativa de 100 a 1000 genes *imprinted*
 - Humanos: 51 genes
 - Camundongos: 82 genes
 - Bovinos: 07 genes
 - Ovinos: 10 genes
 - Suínos: 05 genes

<http://igc.otago.ac.nz/home.html>

GENES IMPRINTED

CAMUNDONGOS: GENES IMPRINTED, REGIÕES E FENÓTIPOS



<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/largemap.html>

FUNÇÕES DOS GENES *IMPRINTED*

- **Crescimento:** *IGF2* (P), *IGF2R* (M), *H19* (M), *GTL2* (M), *PEG3* (P), *DLK1* (P), *MEST* (P)
- **Desenvolvimento da placenta:** *IGF2R* (M), *PEG10* (P), *Mash2* (M), *Ins2* (M)
- **Desenvolvimento cerebral:** *NNAT* (P) e *Snrpn* (P)
- **Inativação cromossomo X:** *XIST* (P) e *Tsix* (M)
- **Comportamento materno:** *PEG3* (P) e *MEST* (P)

FUNÇÕES DOS GENES *IMPRINTED*

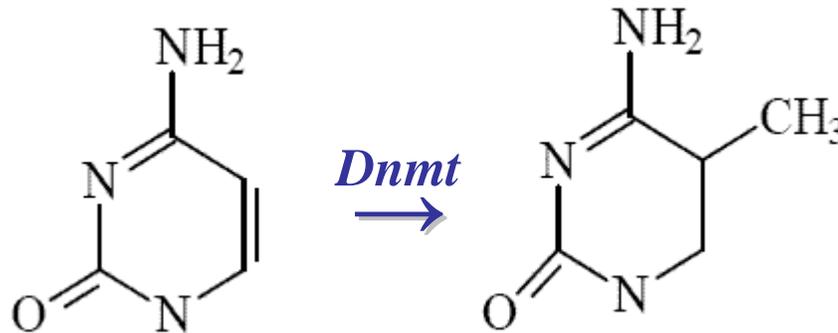
- **Aprendizagem:** *Xrl3b* (M)
- **Adaptação ambiental:** *NESP55* (M)
- **Obesidade:** *DLK1* (P)
- **Supressão de tumor:** *H19* (M; RNA não-traduzido)
- **Produção de miRNAs :** *PEG11* (P)
- **Produção de snoRNAs:** *MEG8* (M)

ESTABELECEMENTO DOS *IMPRINTS*

- Diferenciação entre genes maternos e paternos:
 - Metilação do DNA *
 - Estrutura da cromatina
 - Acetilação, metilação e fosforilação das histonas que “empacotam” o DNA
 - Expressão de transcrito *antisense* e de RNA não-codificante
 - Combinação de eventos

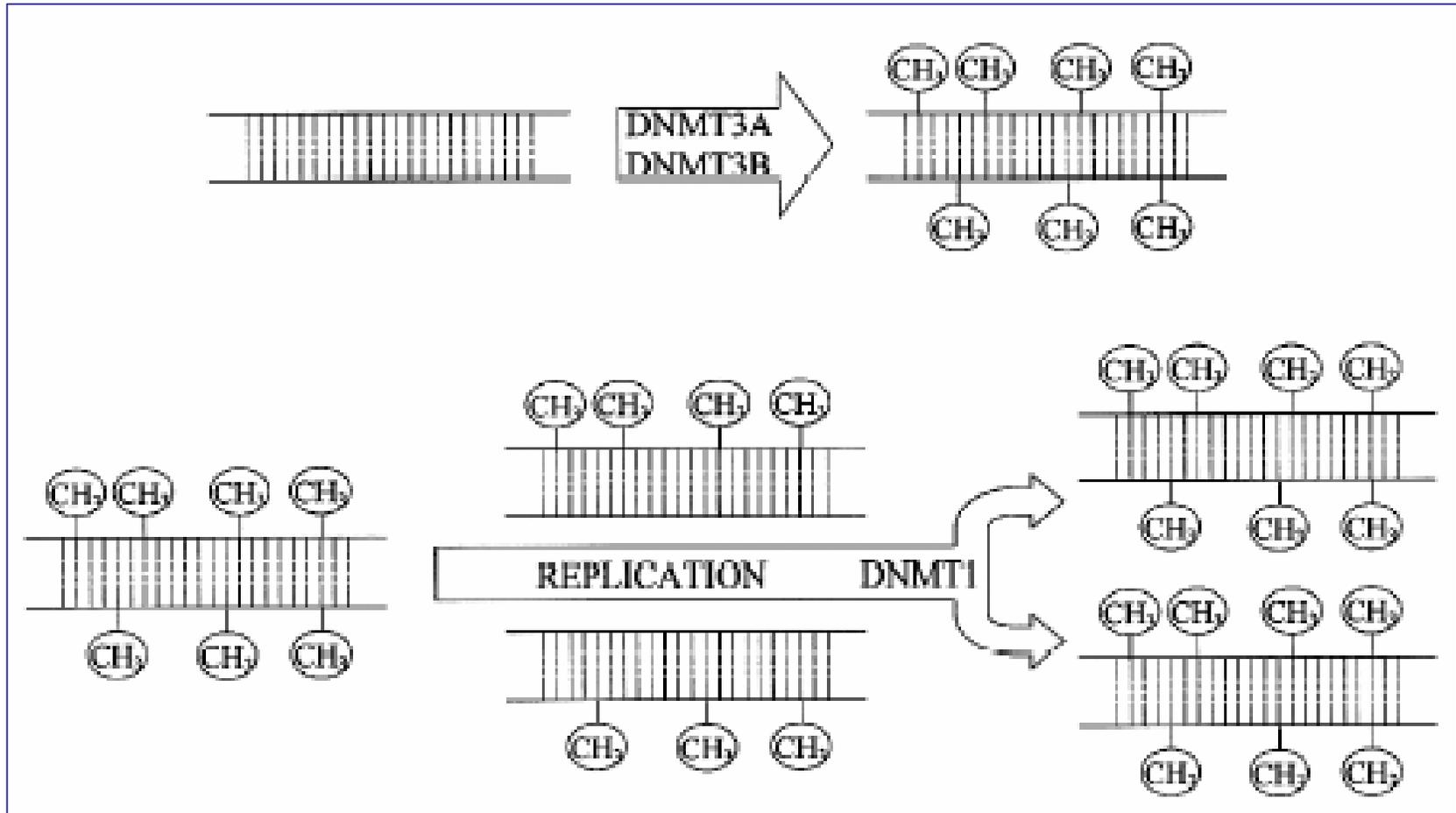
METILAÇÃO DO DNA

- **Metilação:** inativação X e expressão gênica
 - Metilação na citosina de sítios CpG (> 50% CG)
 - DNA-metiltransferases: *Dnmts*



- *Dnmt1*: manutenção de metilação durante mitoses
- *Dnmt3* (*de novo*): *3a* - linhagem germinativa; *3L* – estabelecimento de *imprinting*

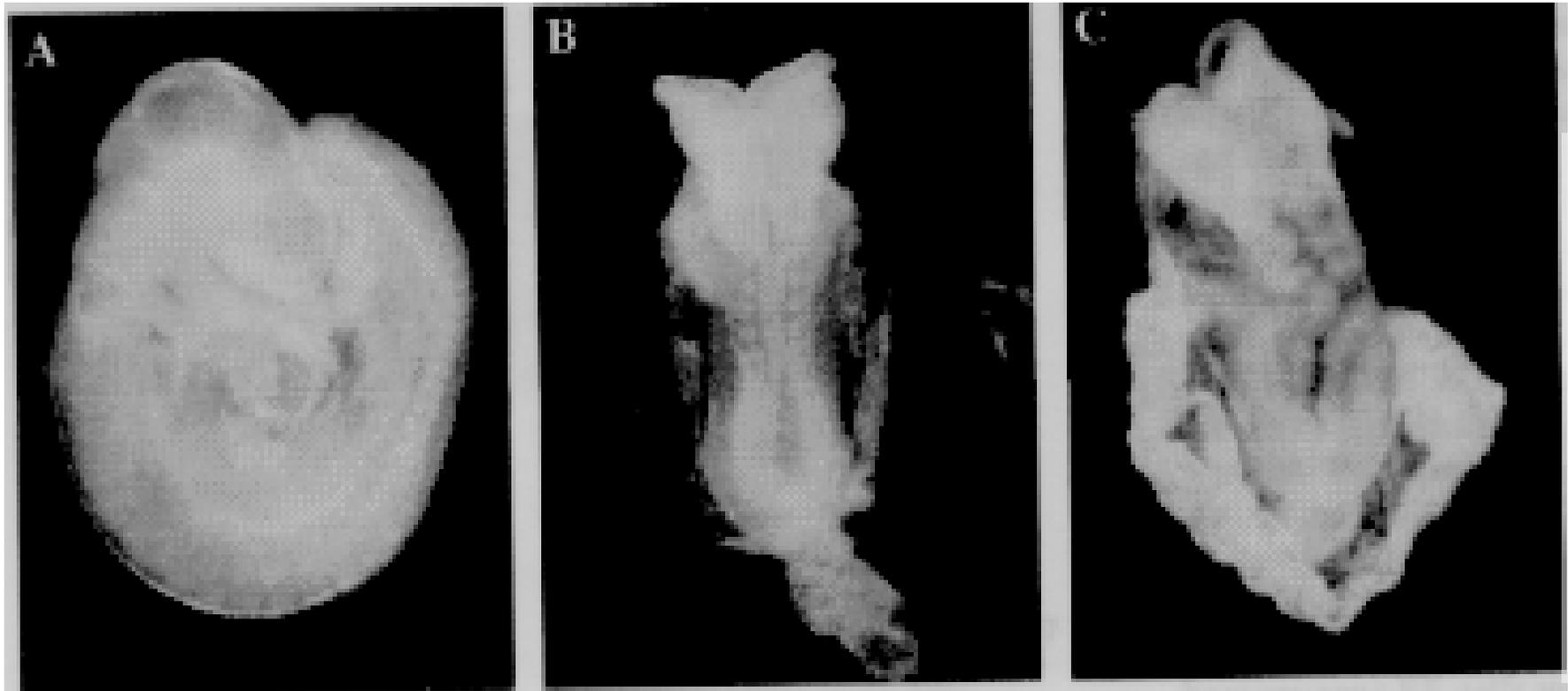
METILAÇÃO DO DNA



Turek-Plewa e Jagodzinski, 2005

CAMUNDONGOS (9D) SEM *DNMT*

- Ausência de *Dnmt*: morte dos embriões; falhas em genes *imprinted* e em outros genes



Lei et al., 1996

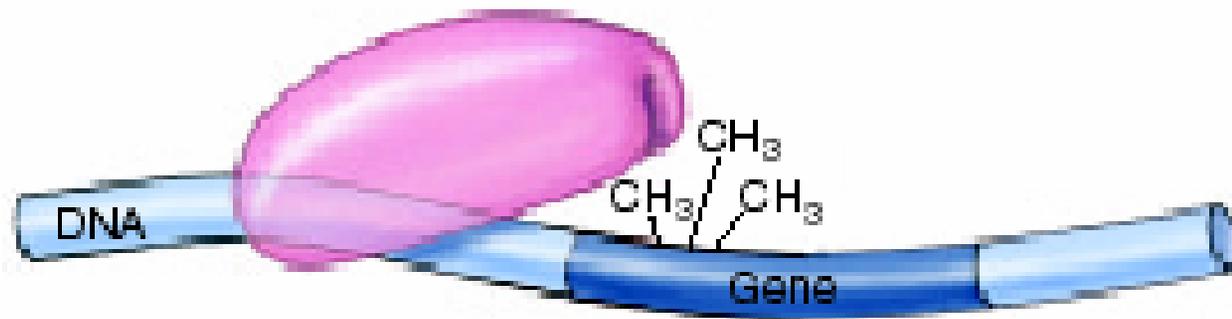
METILAÇÃO DO DNA

- **Ilhas CpG com metilação alelo-específica:** *regiões diferencialmente metiladas* (DMR) que controlam o *imprinting* (ICR)
- Metilação do DNA na região promotora de genes:
 - Inibição da transcrição
 - Silenciamento gênico

BLOQUEIO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR METILAÇÃO



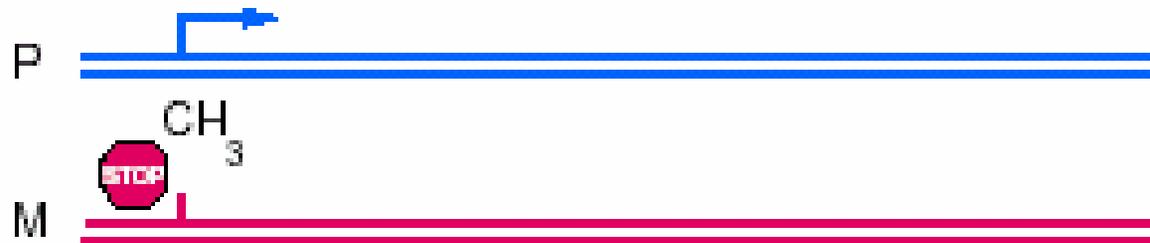
(a) Non Imprinted gene: gene is read by polymerase



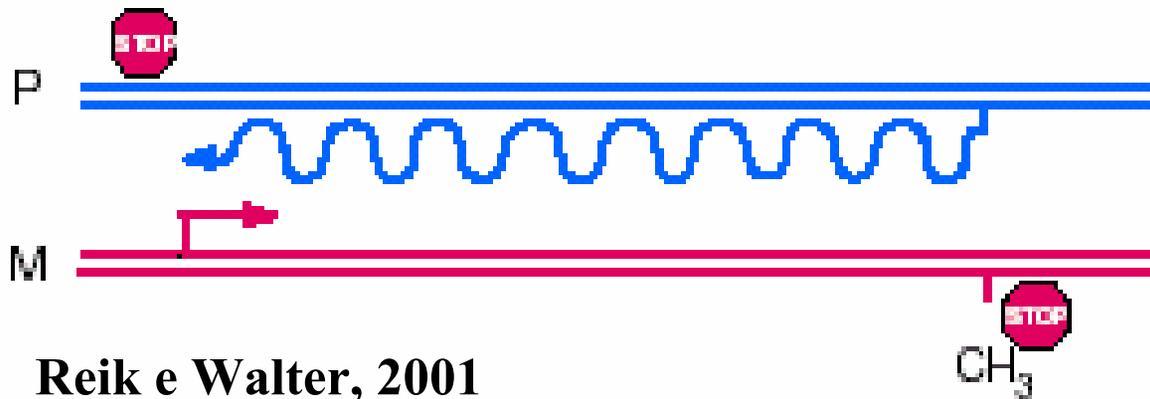
(b) Imprinted gene: methylation blocks gene expression

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR METILAÇÃO

Inativação epigenética



Ativação epigenética



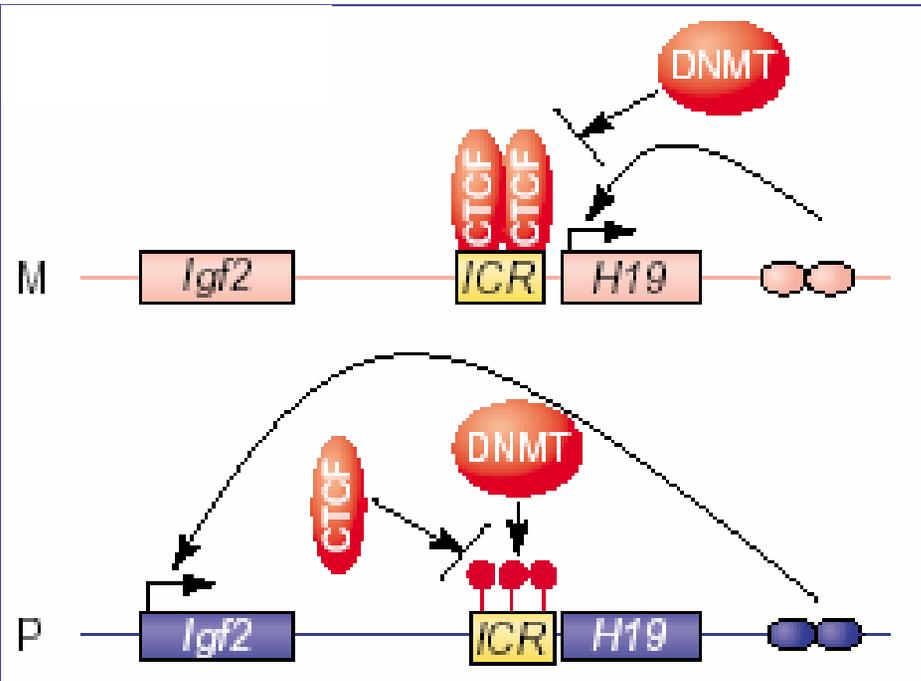
Reik e Walter, 2001

- **Paterno** ativo e **materno** reprimido por metilação
- **Paterno** reprimido por transcrito *antisense* e **materno** ativo por metilação e bloqueio transcrito

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR METILAÇÃO

Loco *Igf2/H19*

- Alelo **materno**: proteína CTCF evita metilação da ICR e impede acesso de estimuladores a *Igf2* → expressão *H19*
- Alelo **paterno**: metilação ICR impede expressão *H19* e ligação CTCF, e permite acesso de estimuladores → expressão *Igf2*

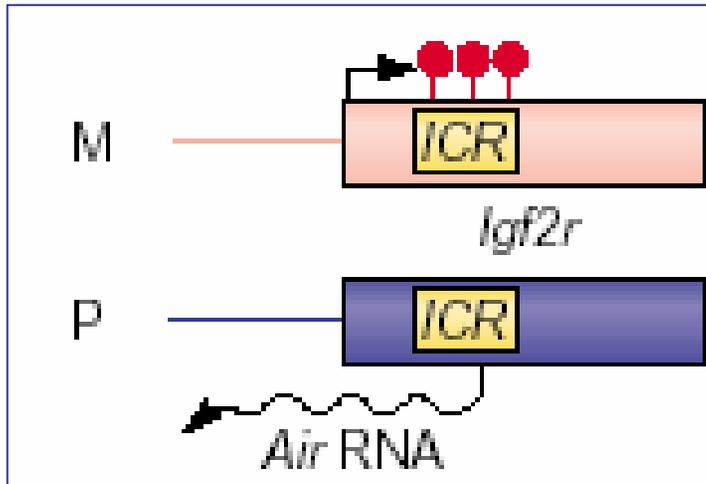


Delaval e Feil, 2004

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR ESTRUTURA DA CROMATINA E MODIFICAÇÃO DE HISTONAS

- **Cromatina muito condensada:** metilação ou fosforilação de histonas → restrição de atividade gênica
- **Cromatina menos condensada:** acetilação de histonas → permissão de atividade gênica

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR METILAÇÃO E POR RNA NÃO-CODIFICANTE

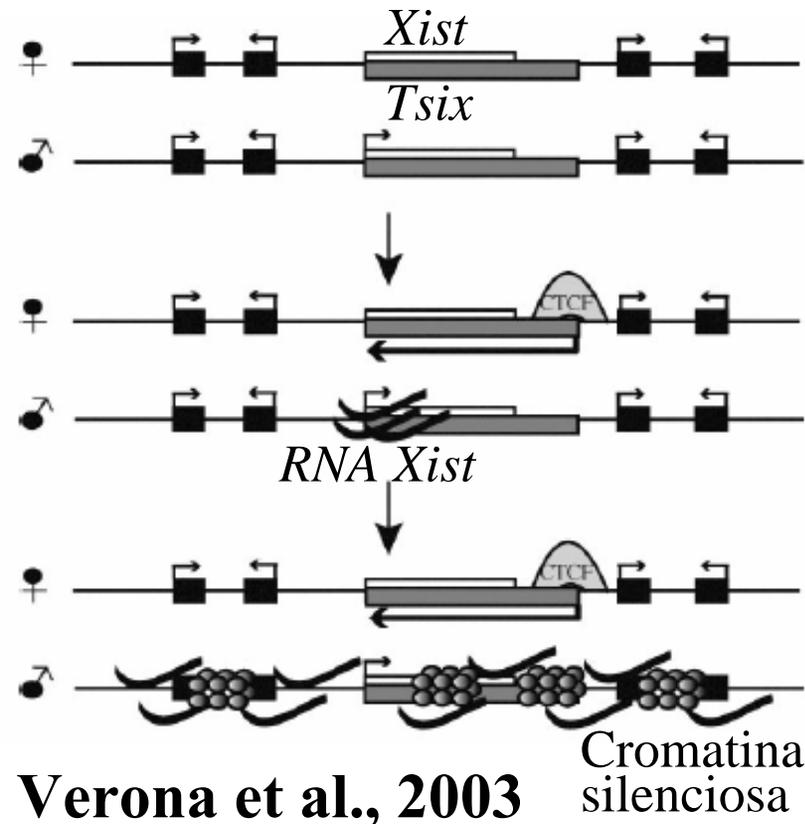


Delaval e Feil, 2004

Igf2r

- Alelo **materno**: metilação da ICR intrônica → expressão *Igf2r*
- Alelo **paterno**: ausência de metilação ICR → transcrição RNA não-codificante (*Air*) e bloqueio expressão *Igf2r*

CONTROLE POR RNA ANTISENSE, METILAÇÃO DE HISTONA E ESTRUTURA DA CROMATINA



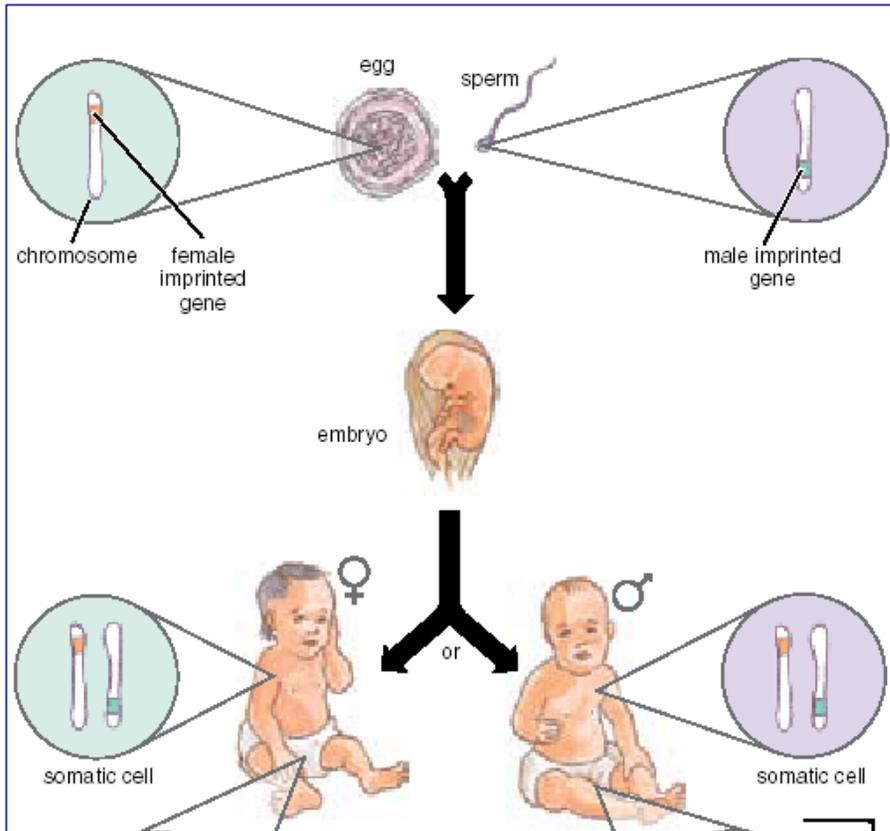
Xist/Tsix

- Alelo **materno**: ligação CTCF a *Tsix*, produção *Tsix antisense*, ausência *Xist* → cromossomo **ativo**
- Alelo **paterno**: expressão *Xist*, acúmulo RNA *Xist*, metilação histonas → **inativação X**

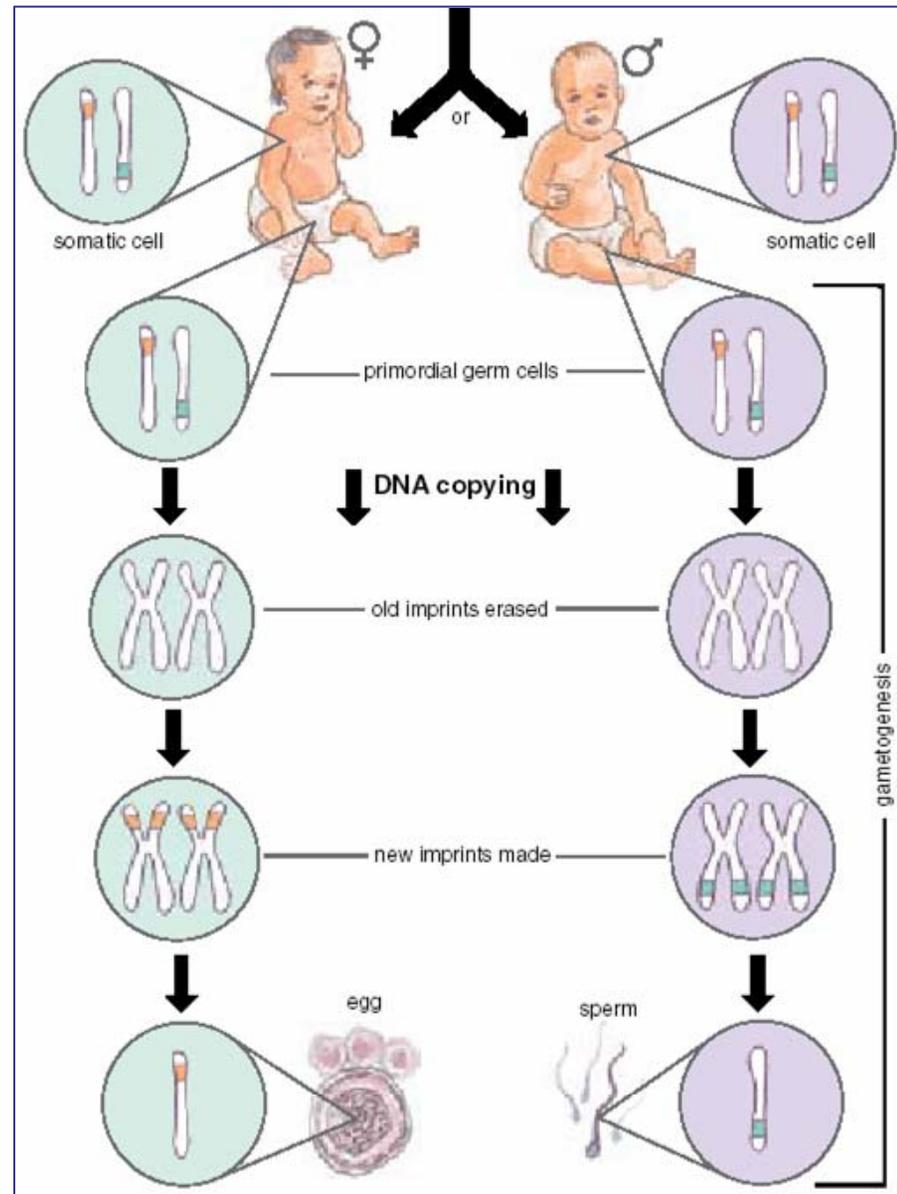
PADRÃO DE METILAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

- **Estabelecido:** nos gametas
 - Genomas materno e paterno estão separados
- **Apagado:** nas células germinativas do embrião recém-formado
 - *Imprints* herdados do espermatozóide e do oócito são “apagados”
 - Gametas do conceito apresentam somente *imprints* relativos ao seu sexo

Padrão Metilação Genes *Imprinted*

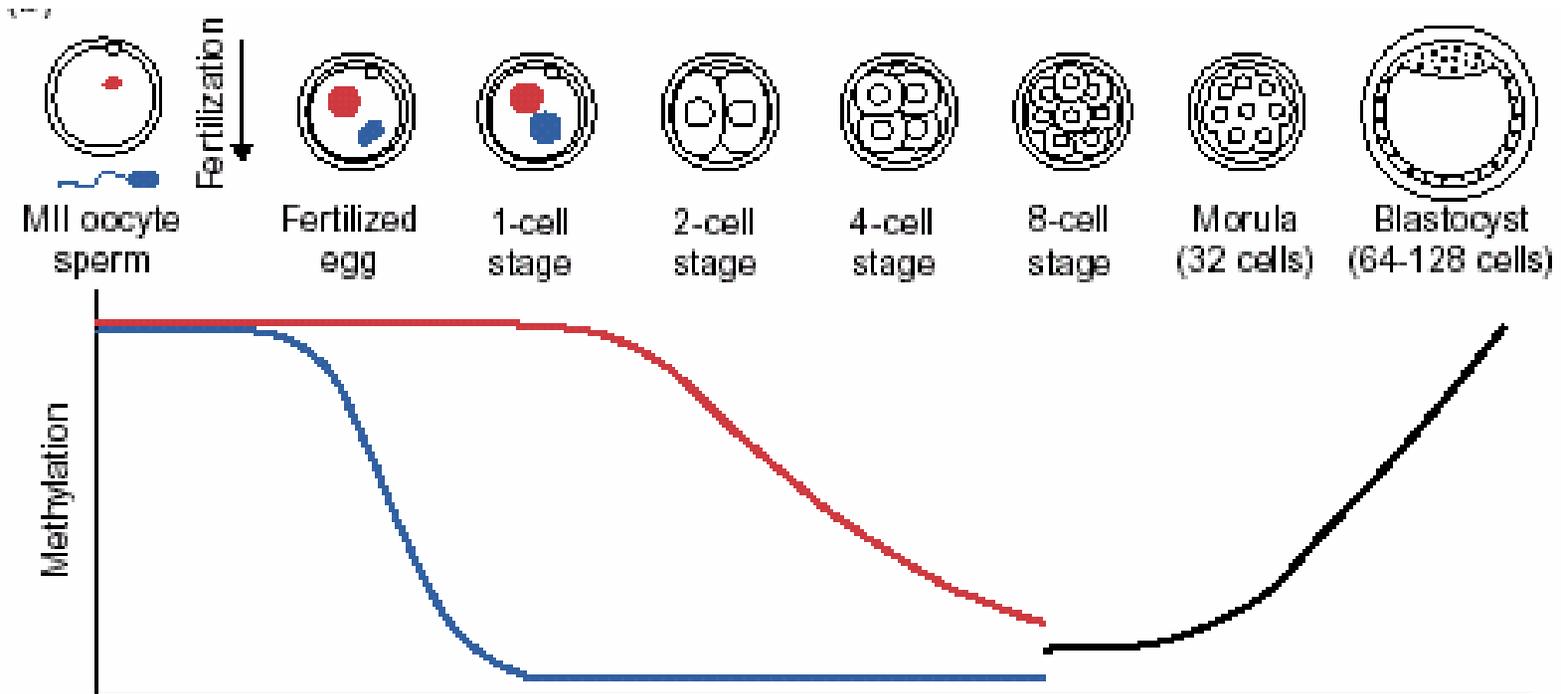


Jirtle e Weidman, 2007



METILAÇÃO GLOBAL

- **Demais genes:** perda da metilação após a fecundação (diferente dos genes *imprinted*)



Mann e Bartolomei, 2002

IMPLICAÇÕES

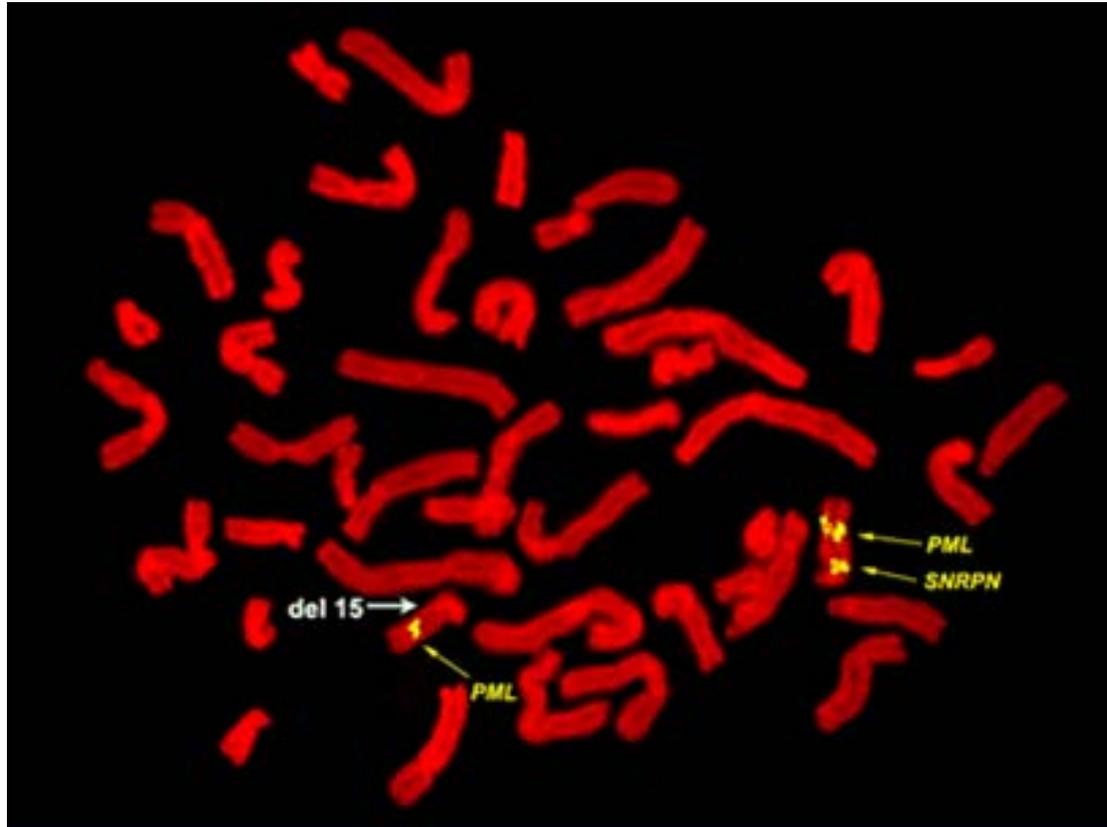
- Crescimento e desenvolvimento:
 - Placentário, embrionário, fetal e pós-natal
 - Etiologia de doenças humanas
- Biotecnologias com embriões:
 - FIV, cultivo celular, transgênese e clonagem
 - Eficiência das técnicas
- Produção animal
 - iQTL, gestação em eqüídeos
 - Seleção animal

DOENÇAS HUMANAS

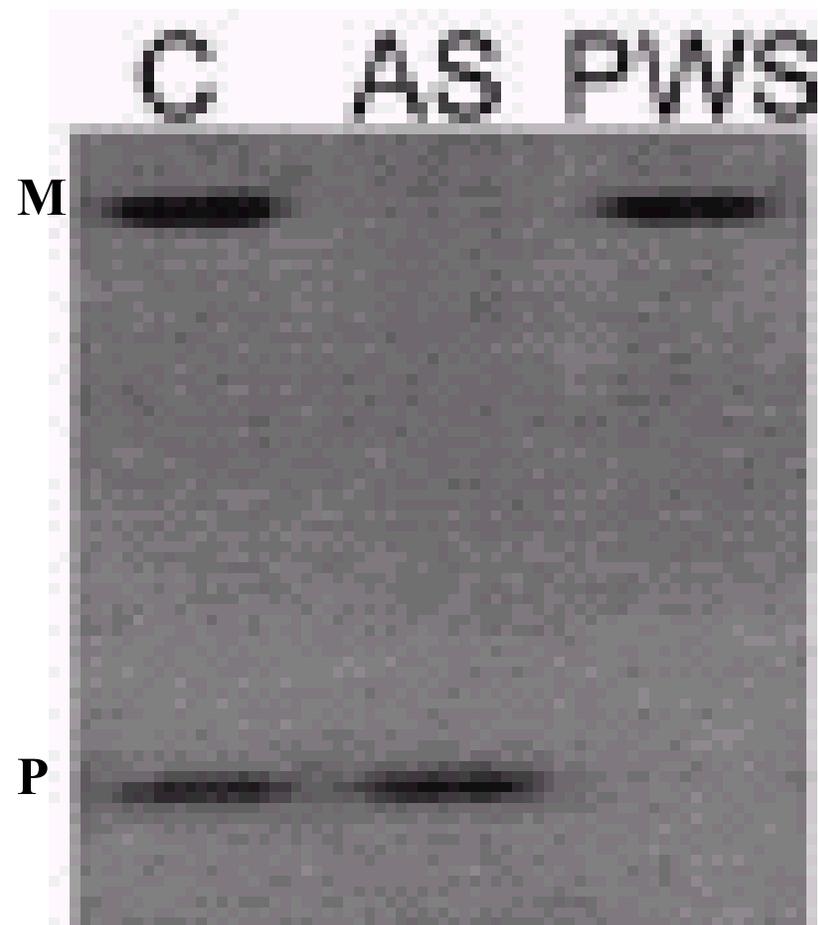
- **Síndrome de Prader-Willi:** deleção paterna (alteração genética) ou dissomia materna (epigenética) – cromossomo 15
 - Crescimento retardado, obesidade, hipogonadismo
 - Perda de *imprinting* (LOI) do *Snrpn*
- **Síndrome de Angelman:** deleção materna (genética) ou dissomia paterna (epigenética) – cromossomo 15
 - Desordem neurogenética, retardo mental, baixo desenvolvimento motor, ausência de fala
 - LOI do *Ube3a*

DOENÇAS HUMANAS

- **FISH:** Síndrome de Prader-Willi (PWS)



DOENÇAS HUMANAS

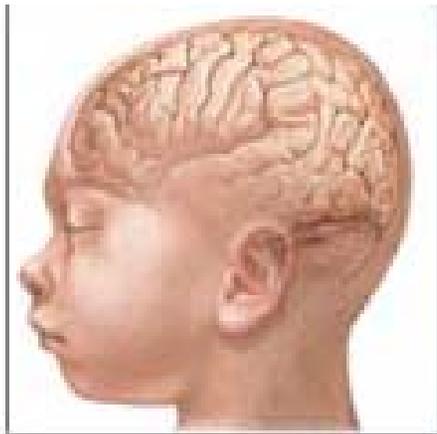


- **Digestão do DNA:** *Xba*I e *Not*I; hibridização sonda *Snrpn*
- **Controle (C):** banda materna metilada (superior) e banda paterna não-metilada (inferior)
- **Síndromes:** Angelman (AS) – banda não-metilada; e Prader-Willi (PWS) - banda metilada

Cox et al., 2002

DOENÇAS HUMANAS

- **Síndrome de Beckwith-Wiedemann:** dissomia paterna – cromossomo 11
 - Supercrescimento fetal, macroglossia, tumores infantis (fígado, rim e músculo)
 - LOI do *Igf2*, *H19* e *Lit1*



Microcefalia



Macroglosia



Hernia umbilical

DOENÇAS HUMANAS

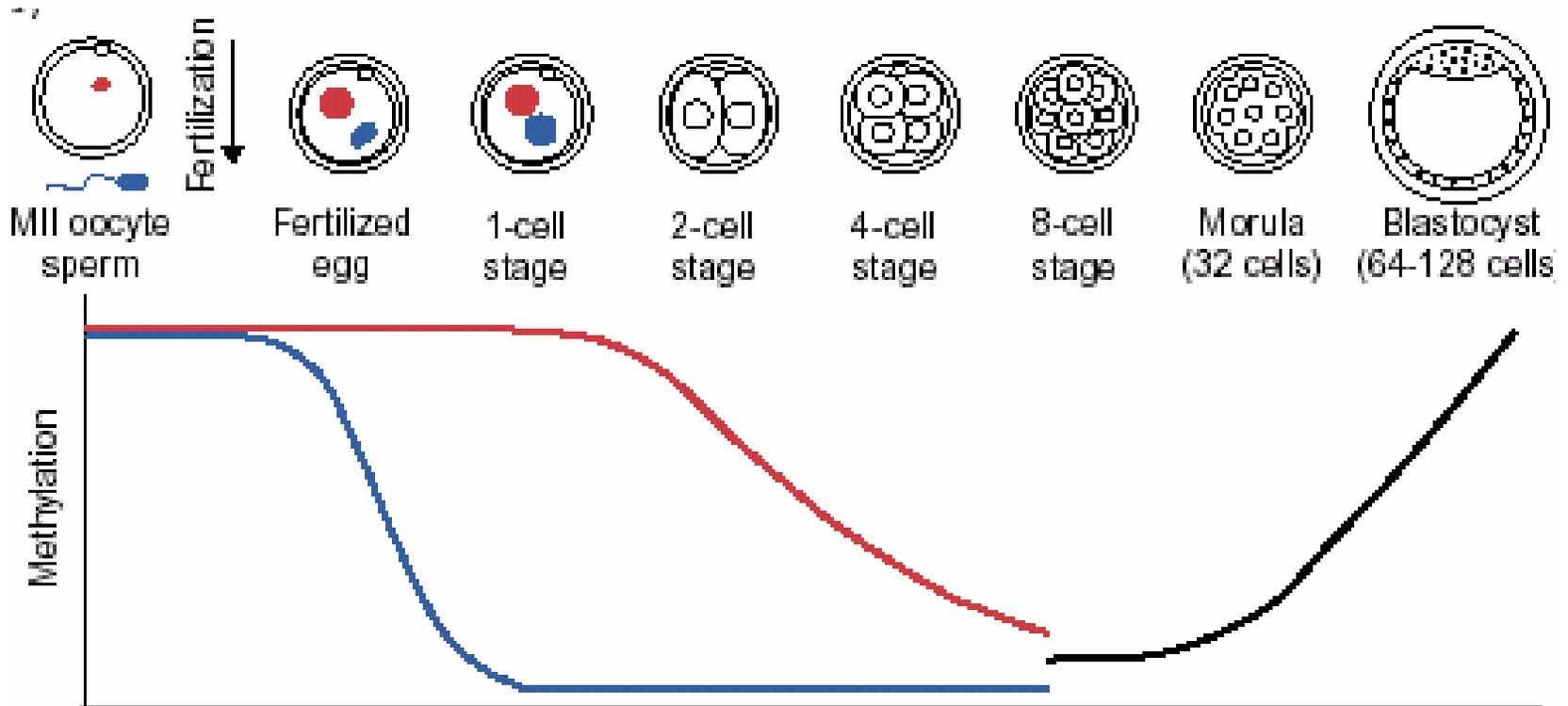
- **Tumor de Wilms:** dissomia paterna cromossomo 11; origem células metanéfricas
- **Tumores diversos:** superexpressão fatores crescimento *imprinted* ou inativação genes supressores de tumor
- **Doença de Huntington:** idade variável de início dos sintomas → mais precoce em filhos de pai afetado
- **Síndrome de Turner (XO):** fenótipo cognitivo e social dependem de qual X está presente (M ou P)
- **Efeitos de origem parental:** diabetes juvenil, autismo, Alzheimer, desordem bipolar e esquizofrenia

BIOTECNOLOGIAS COM EMBRIÕES

- **PIV, cultivo celular, transgênese, clonagem, ICSI:**
 - Baixa eficiência e alta ocorrência de patologias
- **Possíveis causas:** alterações epigenéticas
 - Manipulação intensa no momento de estabelecimento e manutenção de *imprints*
 - Componentes dos meios de cultivo afetam metilação
 - Utilização de gametas imaturos ou envelhecidos
 - **Clonagem:** uso de células com acúmulo mutações; falha na reprogramação (transformação de padrão de metilação somático em embrionário, sem alteração de *imprinting*)

BIOTECNOLOGIAS

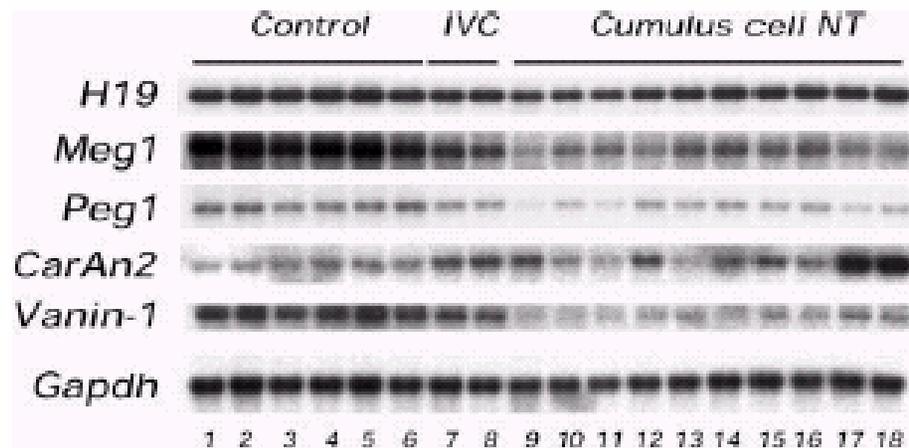
- Padrão de metilação: clones



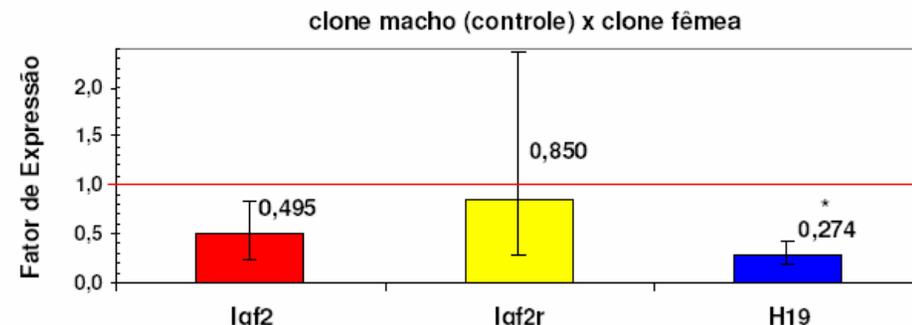
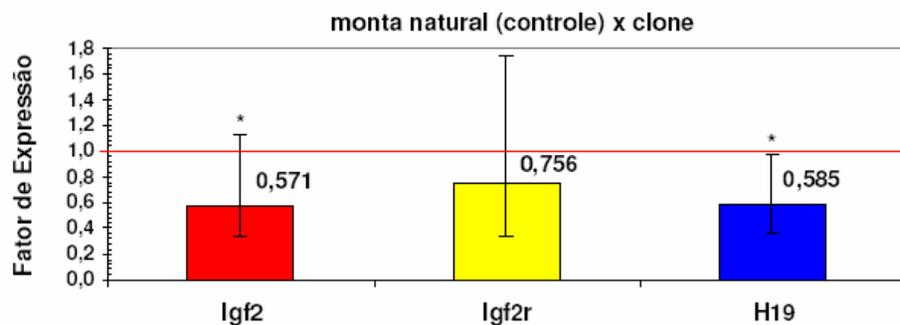
Mann e Bartolomei, 2002

BIOTECNOLOGIAS

- Padrão de expressão gênica: placenta clones



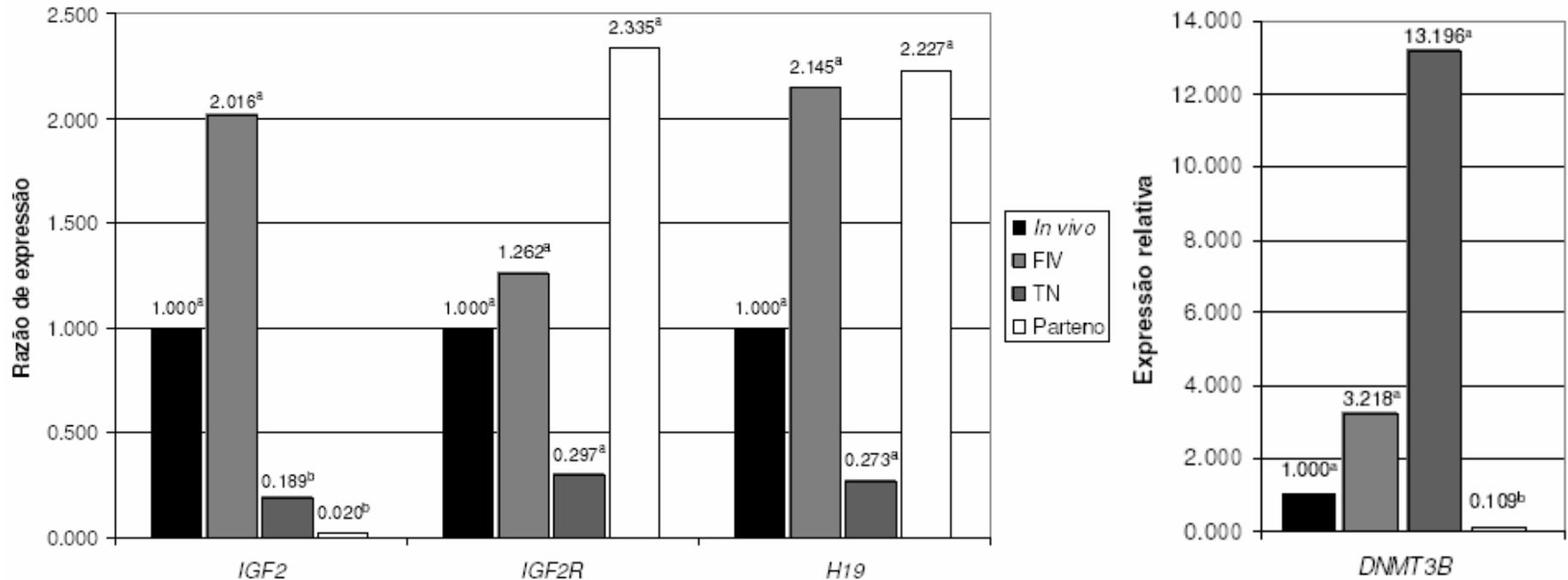
Humpherys et al., 2002 (camundongos)



Yamazaki, 2006 (bovinos)

BIOTECNOLOGIAS

- Padrão expressão gênica: fetos



Perecin, 2007 (bovinos)

BIOTECNOLOGIAS COM EMBRIÕES

- **Conseqüências:**

- **Humanos:** aumento de patologias (de 4 para 9%); **FIV:** Síndrome de Beckwith-Wiedemann (2); **ICSI:** Síndrome de Angelman (2) e Síndrome de Beckwith-Wiedemann (5)
- **Bovinos:** alta mortalidade embrionária entre 35-45 dias de gestação (fase crítica de formação da placenta)
- **Ruminantes:** Síndrome da Cria Gigante (uso do SFB)
- **Clones:** falhas na formação da placenta e no suprimento sanguíneo, elevada mortalidade embrionária, fetal e perinatal

PRODUÇÃO ANIMAL

- Mecanismo (P ou M) usado por um gene para entrar na próxima geração → seleção animal
- **Suínos:** identificação de vários iQTLs
 - Espessura toucinho: SSC2 (P)
 - Deposição de gordura: SSC7 (M)
 - Gordura intramuscular: SSC6 (P e M)
 - Número de leitões natimortos: SSC14 (M)
 - N°. fetos mumificados: SSC2 (M) e SSC6 (P)
 - Idade à puberdade: SSC15 (P)
 - Número de tetos: SSC 1, 6 e 15 (P)

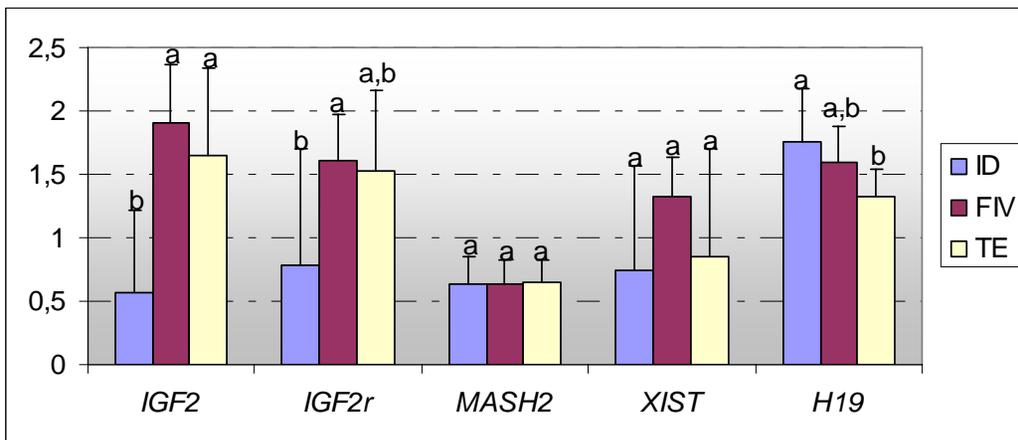
PRODUÇÃO ANIMAL

- **Suínos:** mapeamento fino
 - iQTL no SSC2
 - Efeito sobre massa muscular
 - Segmento cromossômico de ~250 kb que contém genes *INS* e *IGF2* (P)
- **Bovinos de corte:** associação de SNP em *IGF2* a área de olho de lombo
- **Eqüídeos:** duração da gestação
 - Bardotos (jumenta x cavalo) e mulas (égua x jumento): hormônio eCG

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

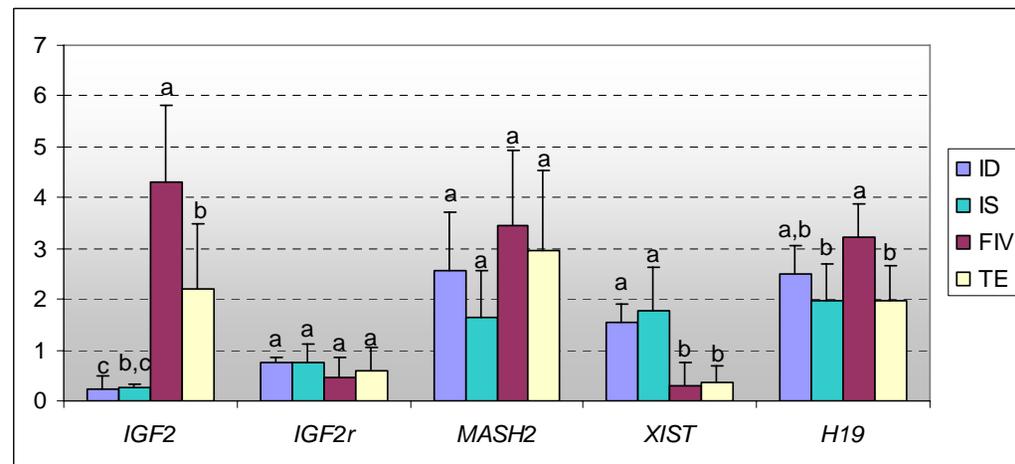
- Mapeamento genético e identificação de iQTL
- Avaliação de genes-candidatos (*imprinted* em outras espécies)
- Avaliação de animais portadores de dissomia uniparental ou de translocações cromossômicas
- Avaliação de expressão gênica em embriões monoparentais

EXPRESSÃO GÊNICA EM PARTENOGENÉTICOS



| FETO | TE1 | | | TE2 | | | TE3 | | | FIV1 | | | FIV2 | | | FIV3 | | | ID1 | | | ID2 | | |
|-------|-----------------------------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|------|---|---|------|---|---|------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| IGF2 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IGF2r | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MASH2 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| XIST | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H19 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GAPDH | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| CÓRIO | TE1 | | | TE2 | | | TE3 | | | FIV1 | | | FIV2 | | | FIV3 | | | IS | | | ID1 | | | ID2 | | |
|-------|-----------------------------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|------|---|---|------|---|---|------|---|---|----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| IGF2 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IGF2r | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MASH2 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| XIST | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H19 | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GAPDH | [Gel Electrophoresis Image] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

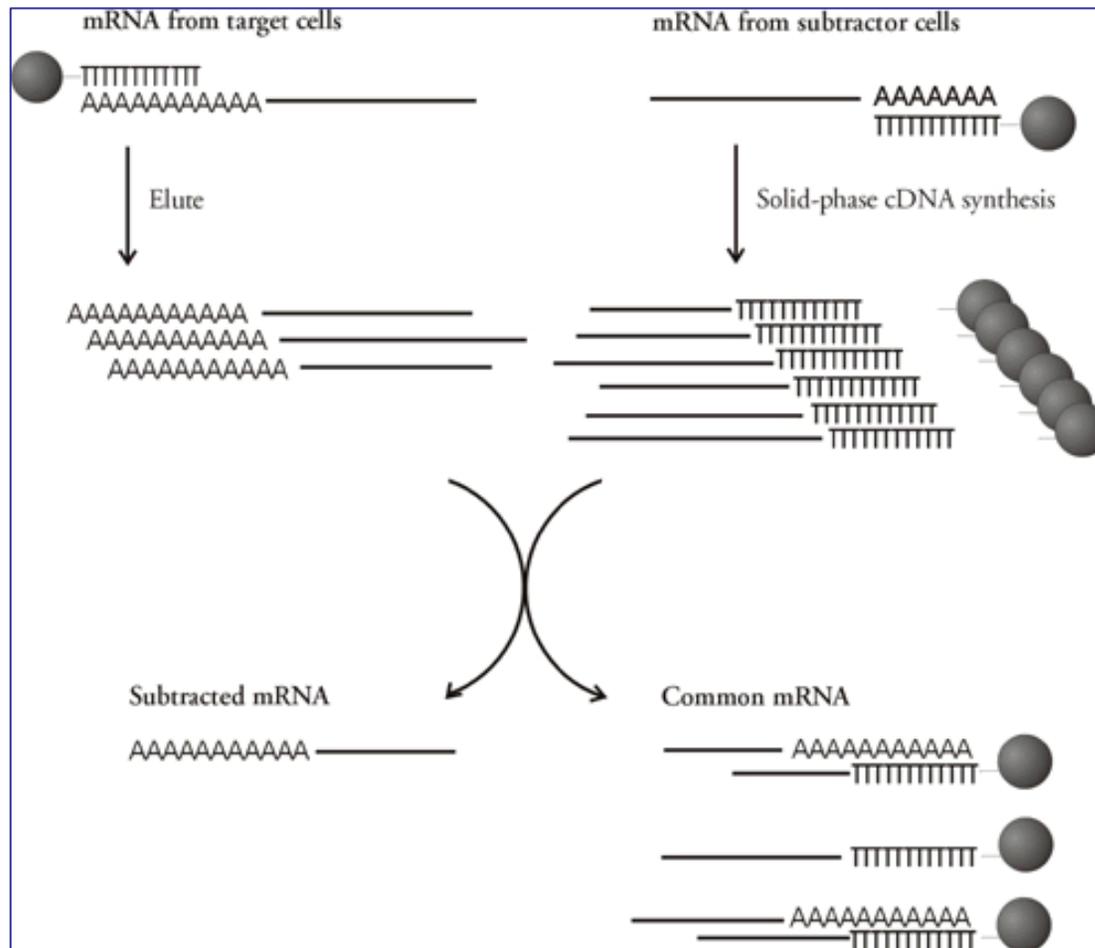


Méo-Niciura, 2005

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

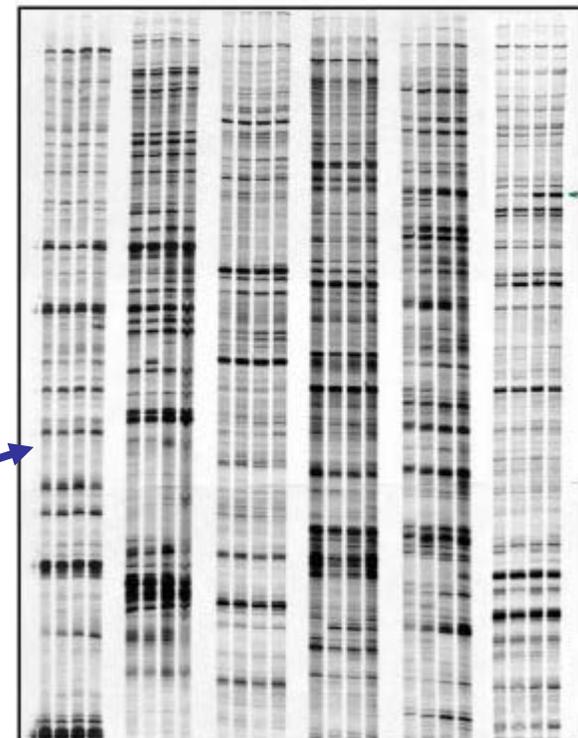
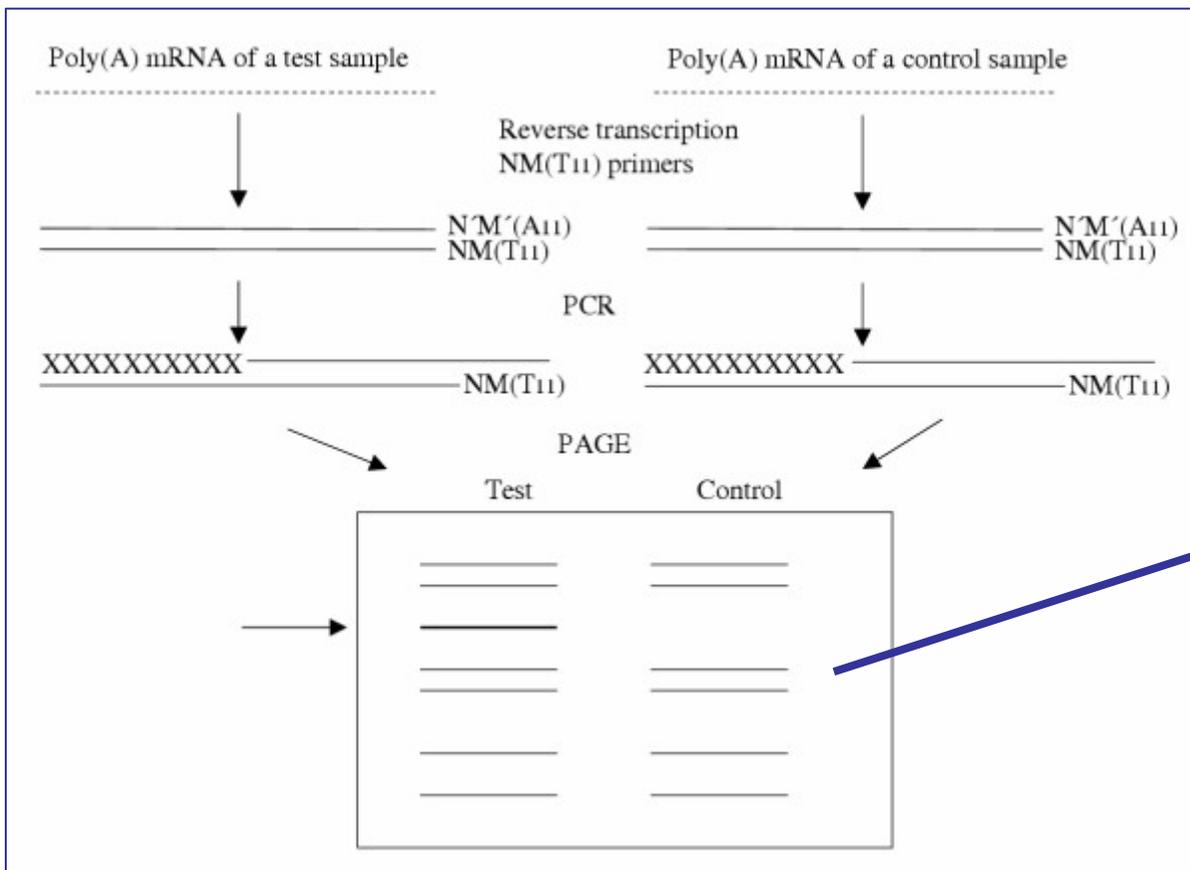
- Avaliação de expressão gênica diferencial entre embriões androgenéticos e ginogenéticos:
 - Hibridização subtrativa
 - *Differential display*
 - *Microarrays*

HIBRIDIZAÇÃO SUBTRATIVA



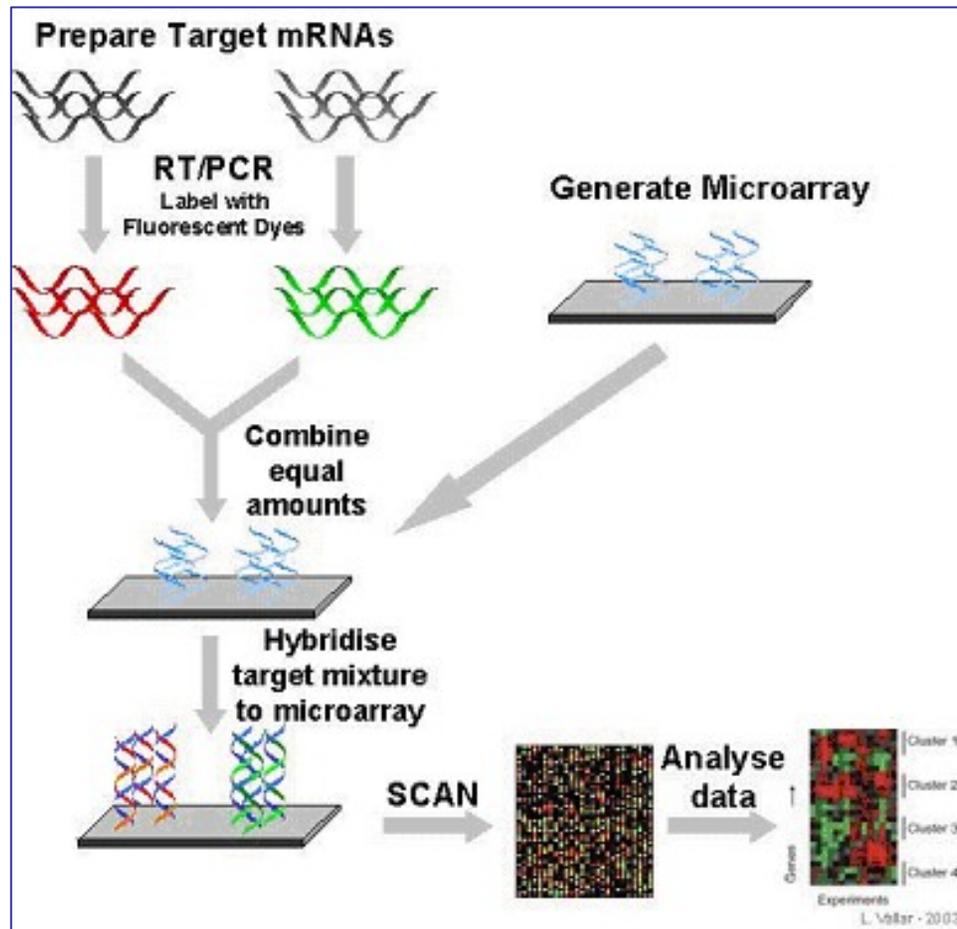
http://www.invitrogen.com/imgLibrary/Subtractive_Hybridization_MethodI.jpg

DIFFERENTIAL DISPLAY



<http://www.rbej.com/content/figures/1477-7827-2-68-1.jpg>

MICROARRAY



http://www.microarray.lu/images/overview_1.jpg

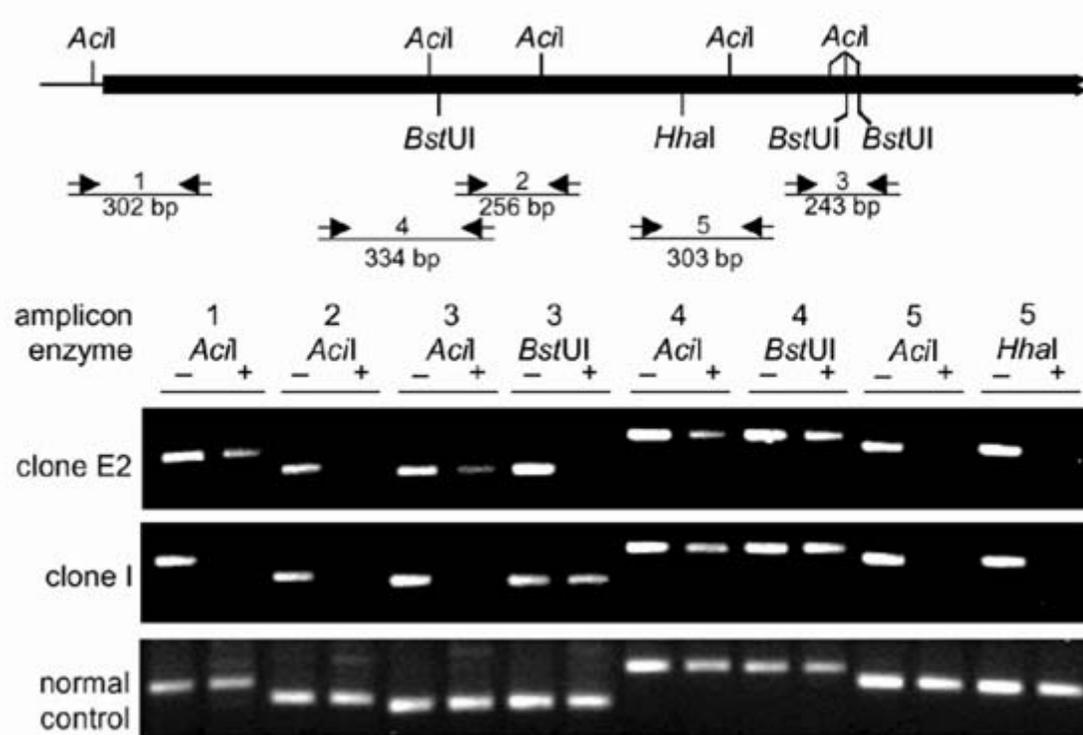
IDENTIFICAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

- Identificação de ilhas CpG
- Identificação de sítios de ligação de proteína CTCF
- Identificação de DMR
 - Programas disponíveis *on-line*

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

- Determinação do estado de metilação de DMR:
 - Digestão DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação → clivagem do alelo não-metilado

DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO SENSÍVEL À METILAÇÃO



a) Sítios de clivagem para enzimas de restrição sensíveis à metilação (*Acil*, *BstUI* e *HhaI*): no éxon 1 do *Xist* bovino.

b) *Primers*.

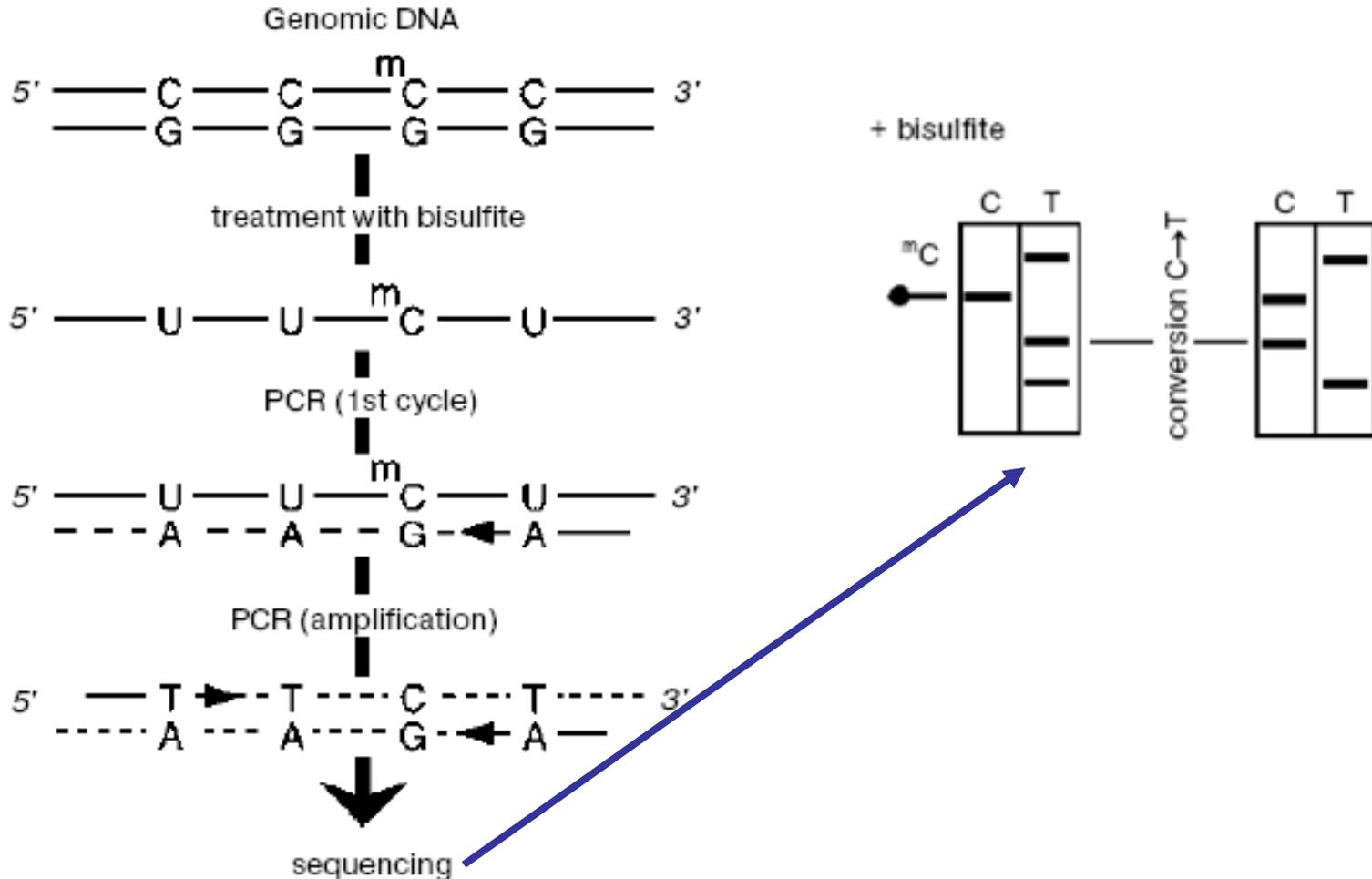
c) PCR sensível à metilação: digestão (+) ou não (-) do DNA antes da PCR. **Controle:** metilado; **Clones:** perda de metilação.

Xue et al., 2002

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

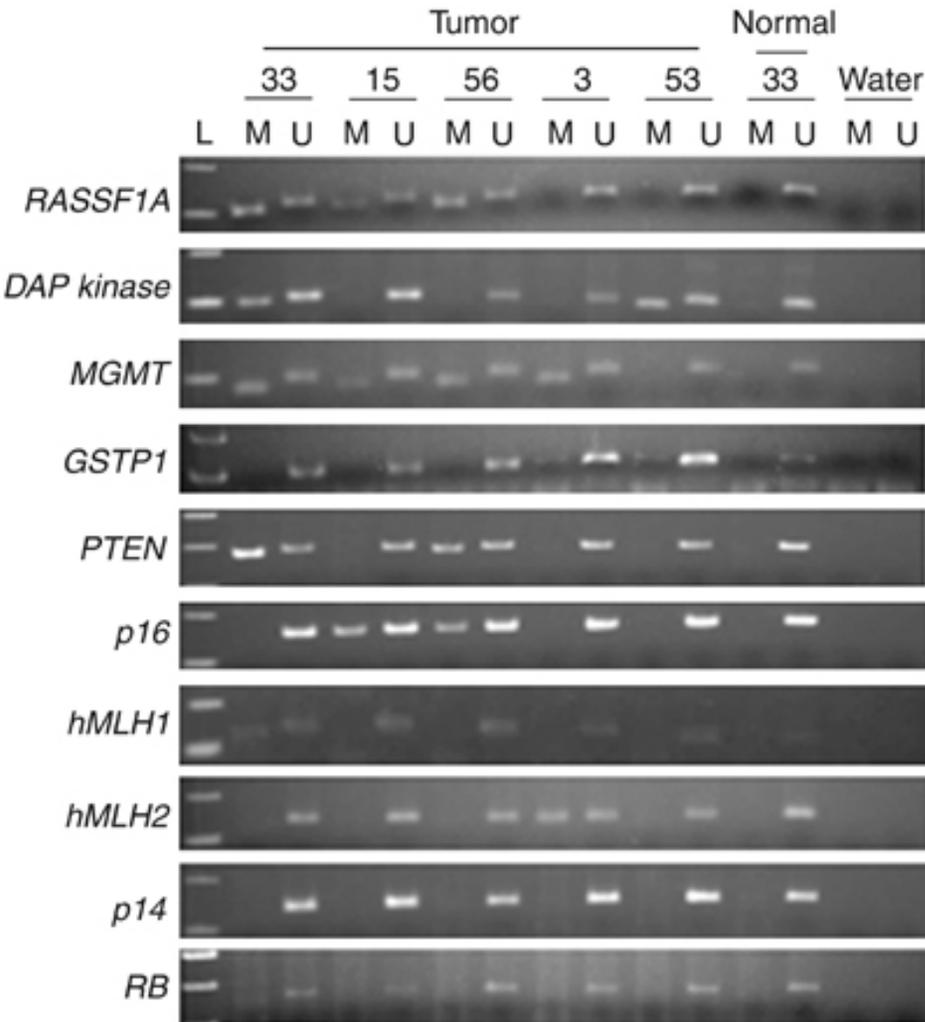
- Determinação do estado de metilação de DMR por tratamento DNA com bissulfito (citosinas não-metiladas → uracila) seguido de:
 - Seqüenciamento (Seqüenciamento bissulfito)
 - PCR de metilação-específica (2 reações: uma com *primers* para segmento metilado e outra com *primers* para segmento não-metilado)

SEQÜENCIAMENTO BISSULFITO



<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v70/full/70050722Fig1.gif>

PCR DE METILAÇÃO-ESPECÍFICA



PCR com *primers* específicos para segmento metilado (M) ou não-metilado (U).

Kawaguchi et al., 2006

CONFIRMAÇÃO DE GENES *IMPRINTED*

- Avaliação de expressão gênica alelo-específica parental:
 - Comparação entre seqüências de produtos de RT-PCR e de PCR de DNA genômico, em indivíduos heterozigotos (com polimorfismos conhecidos), visando à determinação da origem parental do alelo expresso

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Além do código genético, fatores citoplasmáticos ou epigenéticos interferem na expressão gênica
- O *imprinting* regula crescimento, formação da placenta, supressão de tumores, proteção do organismo e produção animal → vitalidade e funcionamento do organismo
- Estudo do *imprinting*: compreensão de mecanismos fisiológicos; benefícios à saúde humana e animal; seleção de animais superiores

AGRADECIMENTOS



CNPq

Comissão Organizadora

Pós-graduandos, estagiários e bolsistas IC

Participantes do curso

AGRADECIMENTOS



Instituto de Zootecnia



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



VISITE SÃO CARLOS



MicroRNA: uma nova classe de moduladores da expressão gênica

Luiz Lehmann Coutinho, Ana Paula Dini
Andreote e Érika Cristina Jorge
ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brazil.

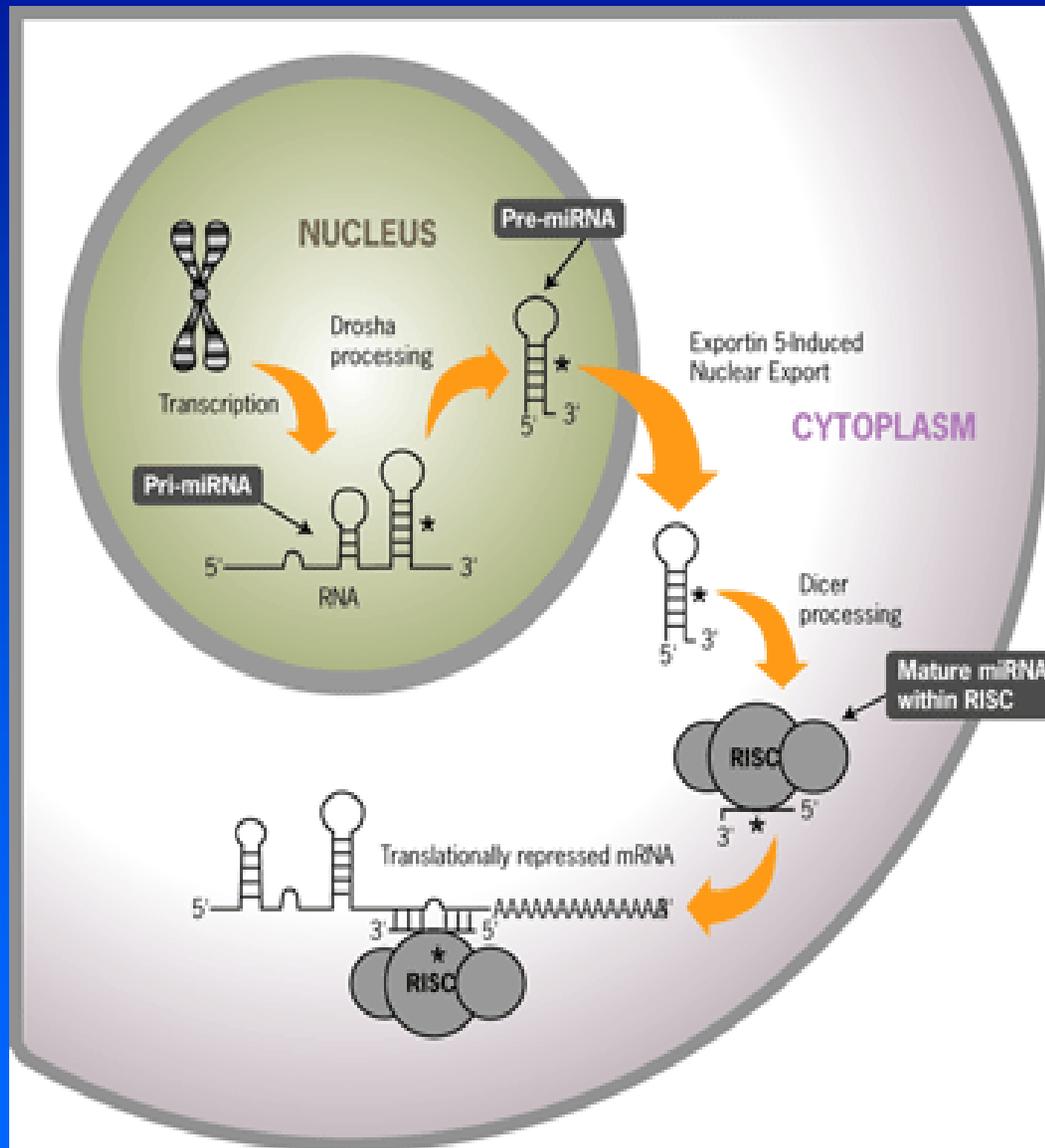
Tópicos:

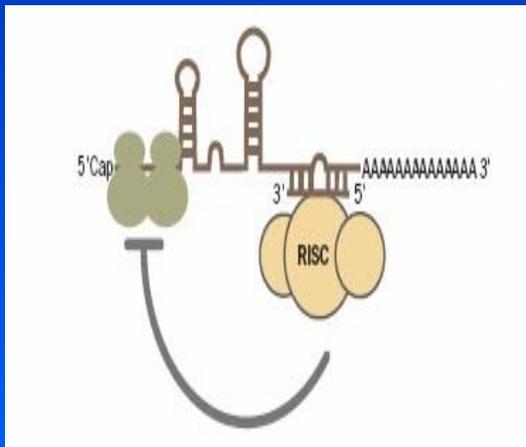
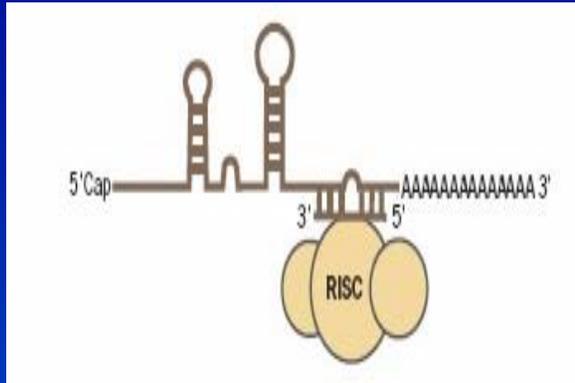
- Introdução.
- Exemplo de um trabalho para identificar miRNAs em *Bos taurus*.
- Exemplo de um trabalho para identificar miRNAs em *Bos indicus*.
- Exemplo da importância do miRNAs para o desenvolvimento muscular.

Introdução: MicroRNAs

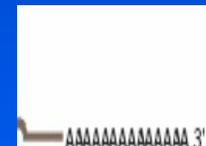
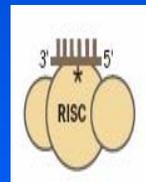
- MicroRNAs (miRNAs) são uma classe abundante de moléculas pequenas de RNA não-codante, de aproximadamente 22 nucleotídeos, com capacidade de regular a expressão gênica por meio de controle da tradução ou degradação do RNA mensageiro
- MicroRNAs são importantes para vários processos biológicos, entre eles diferenciação de adipócitos, desenvolvimento muscular, secreção de insulina, cancer e resposta imune entre outras.

Modo de ação dos miRNAs





Controle da tradução



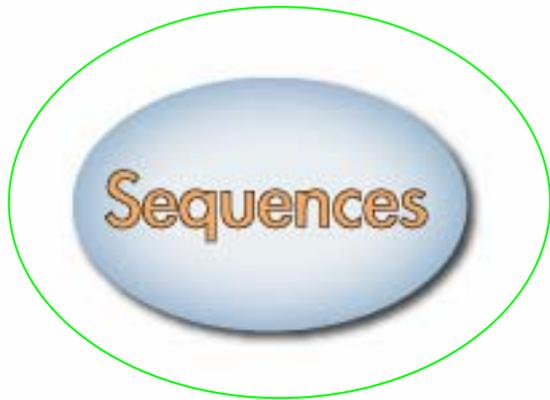
Degradação de RNAm

Identificação de microRNAs

- Critérios:
 - In silico:
 - Estrutura secundária típica dos miRNAs.
 - Conservado entre espécies.
 - Programas de bioinformática.
 - In vivo:
 - Expressão do miRNA (Northern, clonagem e sequenciamento).

Identificação dos genes que são controlados por miRNAs.

- Seqüência alvo é localizada na região 3' UTR do RNAm.
- O pareamento é imperfeito.
- Programas de bioinformatica são utilizados para identificar RNAm alvos.
- O pareamento ocorre preferencialmente por pareamento completo nas 6-8 bases da região 5' do miRNA maduro.



miRBase is the new home for microRNA data, incorporating the [database](#) and [gene naming](#) roles previously provided by the miRNA Registry, and including the new miRBase Target database.



miRBase: the home of microRNA data

miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) is the new home of microRNA data on the web, providing data previously accessible from the miRNA Registry. Old miRNA Registry addresses should redirect you to this page.

- The [miRBase Sequence Database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotations. The

miRNA count: 4584 entries

[Release 9.2](#): May 2007

Search by miRNA name or keyword

Download published miRNA data

[Download page](#) | [FTP site](#)

This site is featured in:

[NetWatch - Science 303:1741 \(2004\)](#)

[Highlights, Web watch - Nature Reviews](#)

[Genetics 5:244 \(2004\)](#)



| Accession | ID | miRNA name | Mature name | Dead entry | Description | Comments | Links |
|---------------------------|-----------------------------|------------|-------------|------------|-------------|----------|-------|
| MI0000698 | mmu-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | |
| MI0000290 | hsa-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| MI0000954 | rno-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| MI0001381 | dre-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| MI0002441 | ssc-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| MI0002853 | ggo-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| MI0002854 | age-mir-214 | ✓ | ✓ | | ✓ | | |



Stem-loop sequence MI0001381

Accession MI0001381

ID dre-mir-214

Description Danio rerio miR-214 stem-loop

Stem-loop

```
ugacuga a - ug          aca          aacuu
      g gc gu ucugucugccugucu cuugcugugcag c
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      c cg cg agacagacggacaga ggacgacauguc c
---uccg c a gu          cac          cacgu
```

[Get sequence](#)

Mature sequence MIMAT0001283

Accession MIMAT0001283

ID dre-miR-214

Sequence 62 - `acagcaggcacagacaggcag` - 82

[Get sequence](#)

Evidence experimental; cloned [1-2]

Predicted targets MIRANDA: [dre-miR-214](#)

References

- 1 ["Vertebrate microRNA genes"](#)
Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP
Science. 299:1540(2003).
- 2 ["The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning"](#)
Chen PY, Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, John B, Marks DS, Gaidatzis D, Sander C, Zavolan M, Tuschl T
Genes Dev. 19:1288-1293(2005).



Sequences

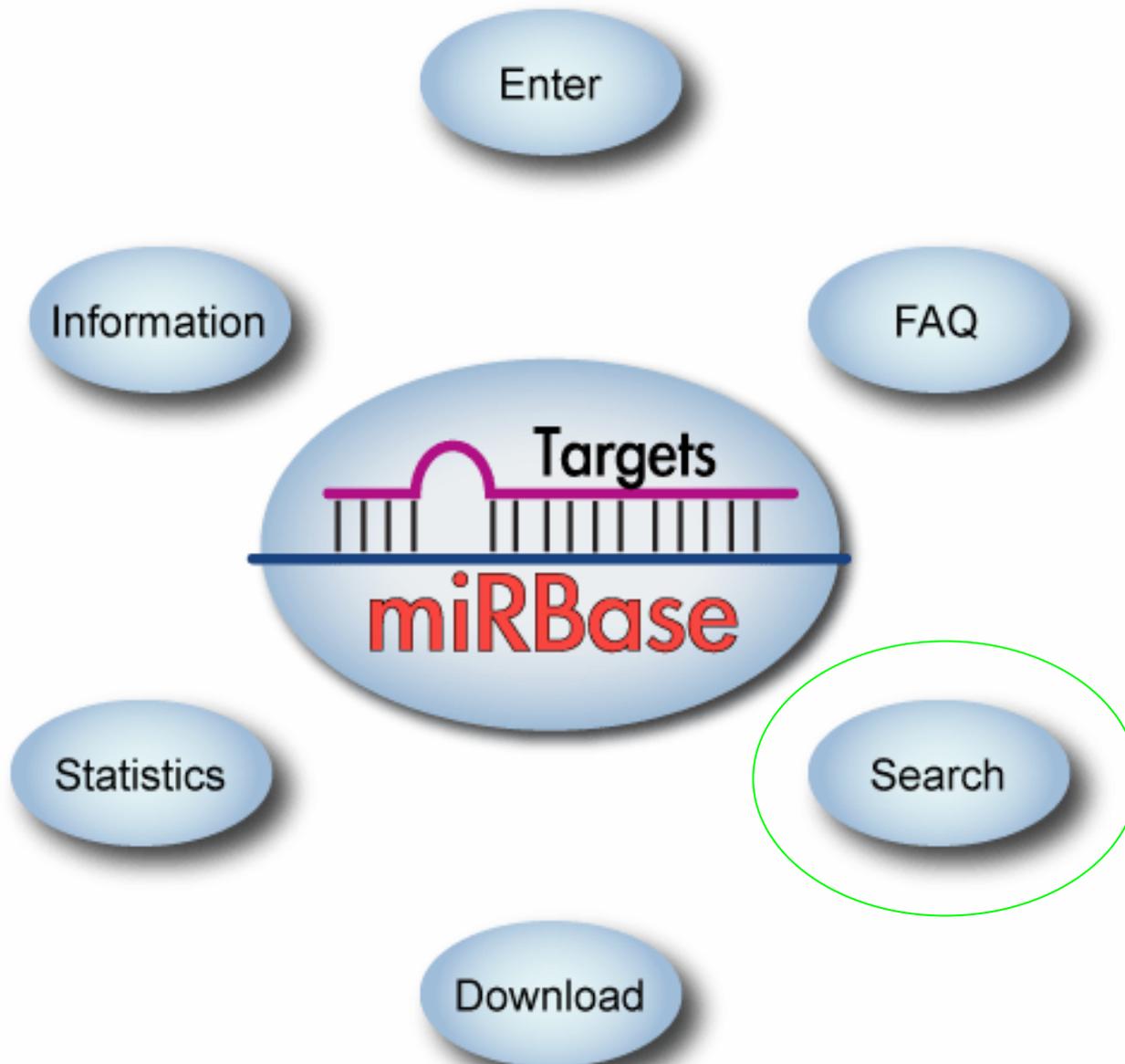
Targets

Registry

miRBase is the new home for microRNA data, incorporating the [database](#) and [gene naming](#) roles previously provided by the miRNA Registry, and including the new miRBase Target database.

miRBase Targets Version 4

Email microcosm@sanger.ac.uk with queries or problems.



Search MicroCosm

Select a Genome

Any



Enter miRNA id

Enter Gene Name

MyoD

Enter EnsEMBL identifier

Select a GO class

Function



Enter GO Term

by phrase

AND OR

Keyword Search

Search

All miRNA hits for where search terms are 2 hits found.

| Species | Gene Name | Transcript | Description | GO Terms | Score | Energy | P-value | Length | Total Sites | No. Cons Species | No. miRNAs | |
|-------------|-----------|------------------------------------|--|----------|-------|--------|------------|--------|-------------|------------------|------------|----------------------|
| ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | | ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | |
| Danio rerio | myod | ENSDART00000046186 | Myoblast determination protein 1 homolog (Myogenic factor 1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q90477] | | 102 | -102 | 0.00107233 | 597 | 6 | 1 | 6 [+] | View |
| Danio rerio | myod | ENSDART00000027661 | Myoblast determination protein 1 homolog (Myogenic factor 1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q90477] | | 133 | -128 | 0.00110209 | 733 | 8 | 1 | 8 [+] | View |

| Rfam ID | Score | Energy | Base P | Poisson P | Org P | Start | End | Alignment |
|-----------------|---------|--------|--------------|--------------|--------------|-------|-----|---|
| dre-miR-375 | 18.7077 | -20 | 1.102090e-03 | 1.102090e-03 | 1.102090e-03 | 585 | 606 | AUUGCGCUCGGCUUGC <u>UUGUUU</u> TAAAGCGACGAAAACGAACAAA |
| dre-miR-722 | 17.2643 | -16.26 | 2.329010e-02 | 2.302100e-02 | 2.302100e-02 | 43 | 65 | CUUUGCAAAGACG <u>UUUUUU</u> :: GAAAC-TTTCAGCAGAAAA |
| dre-miR-203b | 17.1042 | -16.2 | 2.384980e-02 | 2.384980e-02 | 2.384980e-02 | 1 | 18 | guucaccAGGAC-UUGUAAAGUg : -----aaTTCTGCAACATTTCAa |
| dre-miR-142a-5p | 16.8674 | -8.01 | 2.832880e-02 | 2.832880e-02 | 2.832880e-02 | 653 | 673 | CAUCACGAAAGAUGAAAUA :: GTCTTGTGTTAAACTTTAT |

| | | |
|-----------------------|---|--|
| | Get sequence | |
| Genome context | <i>Coordinates (BTAU3.1)</i> | <i>Overlapping transcripts</i> |
| | 18: 53612566-53612665 [+] | sense ENSBTAT00000043170 ; intron 1 antisense ENSBTAT00000043162 ; intron 5 |
| Gene family | MIPF0000197; mir-150 | |

Mature sequence MIMAT0003845

| | |
|--------------------------|---|
| Accession | MIMAT0003845 |
| ID | bta-miR-150 |
| Sequence | 21 - ucucccaacccuuguaccagugu - 43 Get sequence |
| Evidence | experimental; cloned [1] |
| Predicted targets | MIRANDA: bta-miR-150 |

Download table: [GFF](#) [TXT](#)

Highlighted rows in the table indicate genes with published known targets
All miRNA hits for *Bos taurus* and bta-miR-150
873 hits found.

Page 1 of 18

[1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) .. [18](#) [next >>](#)

| Species | Gene Name | Transcript | Description | GO Terms | Score | Energy | P-value | Length | Total Sites | No. Cons Species | No. miRNA |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> | <input type="text" value="v"/> |
| Bos taurus | TBL3 | ENSBTAT00000027147 | WD-repeat protein SAZD (Transducin beta-like 3 protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q12788] [from human gene ENSG00000183751] | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | 16.5704 | -26.71 | 3.88109e-06 | 1100 | 14 | 1 | 15 [+] |
| Bos taurus | IGFBP2 | ENSBTAT00000007349 | Insulin-like growth factor binding protein 2 precursor (IGFBP-2) (IBP- 2) (IGF-binding protein 2). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P18065] [from human gene ENSG00000115457] | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | 16.395 | -23.51 | 4.55477e-06 | 1100 | 11 | 4 | 17 [+] |
| Bos taurus | CCDC22 | ENSBTAT00000017657 | Coiled-coil domain-containing protein 22. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O60826] [from human gene ENSG00000101997] | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | 15.4709 | -19.71 | 5.86912e-06 | 1100 | 20 | 6 | 28 [+] |
| Bos taurus | EXOSC2 | ENSBTAT00000023914 | Exosome complex exonuclease RRP4 (EC 3.1.13.-) (Ribosomal RNA- processing protein | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | 15.5036 | -17.5 | 8.60206e-06 | 1100 | 16 | 3 | 19 [+] |

Exemplo: Identificação de miRNAs em *Bos taurus*:

Physiol Genomics 29: 35–43, 2007.

First published November 14, 2006; doi:10.1152/physiolgenomics.00081.2006.

Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues

Luiz L. Coutinho,^{2*} Lakshmi K. Matukumalli,^{1,3*} Tad S. Sonstegard,¹ Curtis P. Van Tassell,¹ Louis C. Gasbarre,¹ Anthony V. Capuco,¹ and Timothy P. L. Smith⁴

- OBJETIVOS:
- Identificar microRNAs de bovinos.
- Determinar o grau de conservação de miRNAs de bovinos com outras espécies.
- Determinar se é importante clonar miRNAs de bovinos ou se podemos usar apenas a informação do genoma.
- Determinar o quanto precisamos sequenciar uma biblioteca para identificar os miRNAs.

Fase 1: Predição dos miRNA In silico.

- Comparação com miRNAs já clonados de outras espécies. (mirBase 8.1).
 - Blast contra o genoma bovino
 - Resultado: Identificação de 221 miRNAs bovinos.
 - Alta conservação entre as espécies.

Procura de miR no genoma bovino

Cow BLAT Search

BLAT Search Genome

Genome: Assembly: Query type: Sort output: Output type:

```
>hsa-mir-26a-1 MI0000083  
GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGUGCAGGUCCCAAUGGGCCUAUUCUUGGUUACUUGCACGGGGACGC
```

Cow BLAT Results

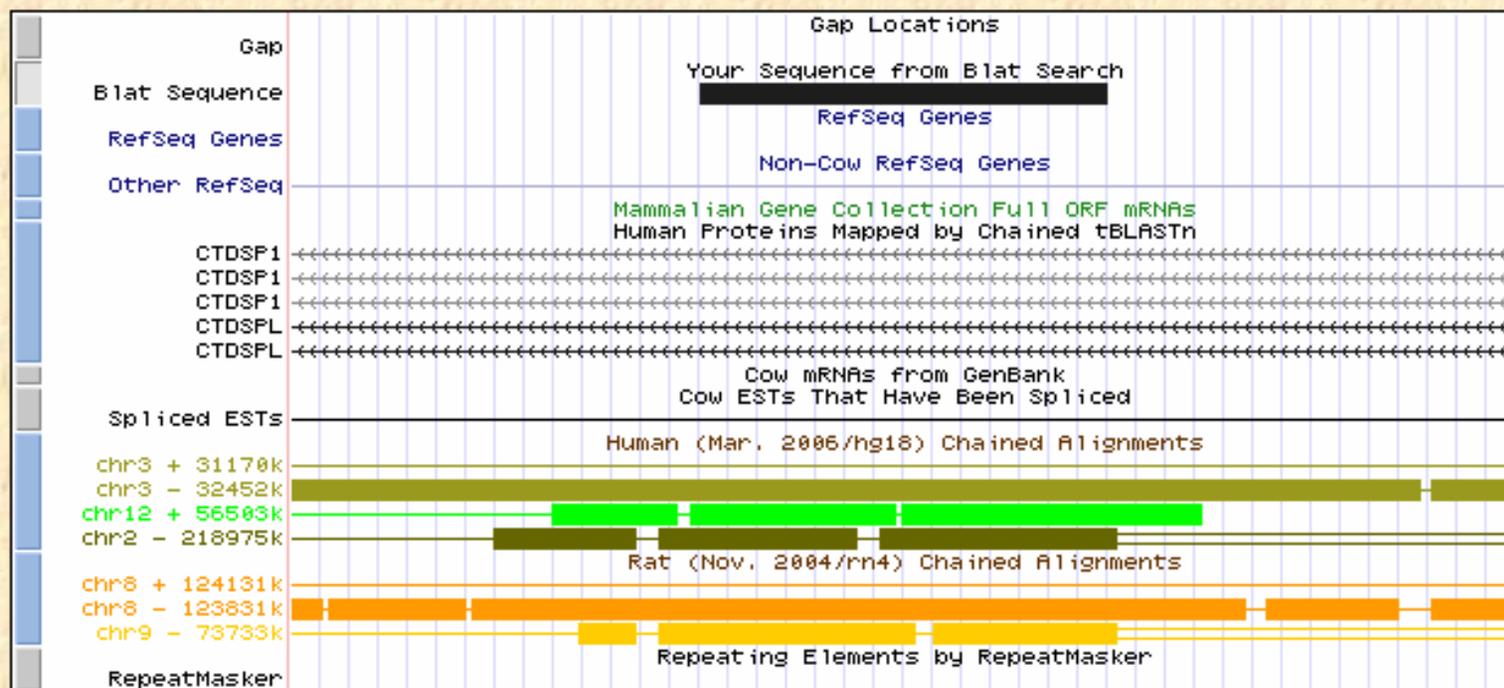
BLAT Search Results

| ACTIONS | QUERY | SCORE | START | END | QSIZE | IDENTITY | CHRO | STRAND | START | END | SPAN |
|---|---------------|-------|-------|-----|-------|----------|------|--------|----------|----------|------|
| browser details | hsa-mir-26a-1 | 71 | 1 | 77 | 77 | 96.2% | 22 | - | 9013932 | 9014008 | 77 |
| browser details | hsa-mir-26a-1 | 40 | 10 | 66 | 77 | 91.0% | 5 | - | 34389099 | 34389154 | 56 |

[Blat](#)[Tables](#)[PCR](#)[DNA](#)[Convert](#)[PDF/PS](#)

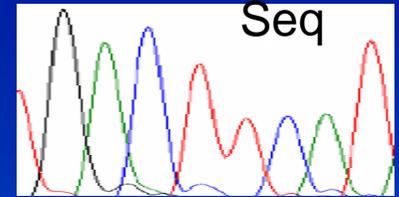
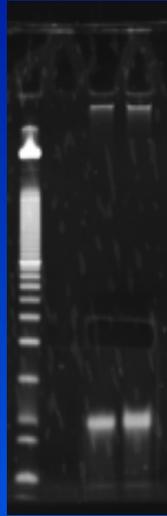
UCSC Genome Browser on Cow Mar. 2005 Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x

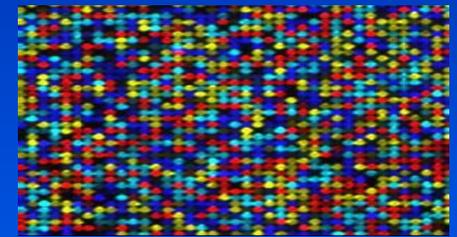
position/search jump clear size 231 bp. configure

Clonagem de miRNA

LMW RNA



MPSS



Isolation of small RNA from embryo, small intestine, thymus, abomasum and mesenteric lymph nodes or pool of tissues

Ligation of 5' adaptor

Ligation of 3' adaptor

cDNA synthesis, cloning and sequencing

Resultados: MPSS de uma biblioteca de um pool de tecidos (nódulos linfáticos, timo, abomaso intestino delgado, medula, baço).

- Sequenciamento de mais de 1 milhão de tags
 - Tags tem entre 17-20 bases, mas os miRs tem 22 bases
- 106 clusters de miR bovinos (1 tag para mais de um miR).
- 61 clusters que identificaram um único miR bovino (1 tag para um único miR).

Sequenciamento de individual das bibliotecas de miRNA (Sanger).

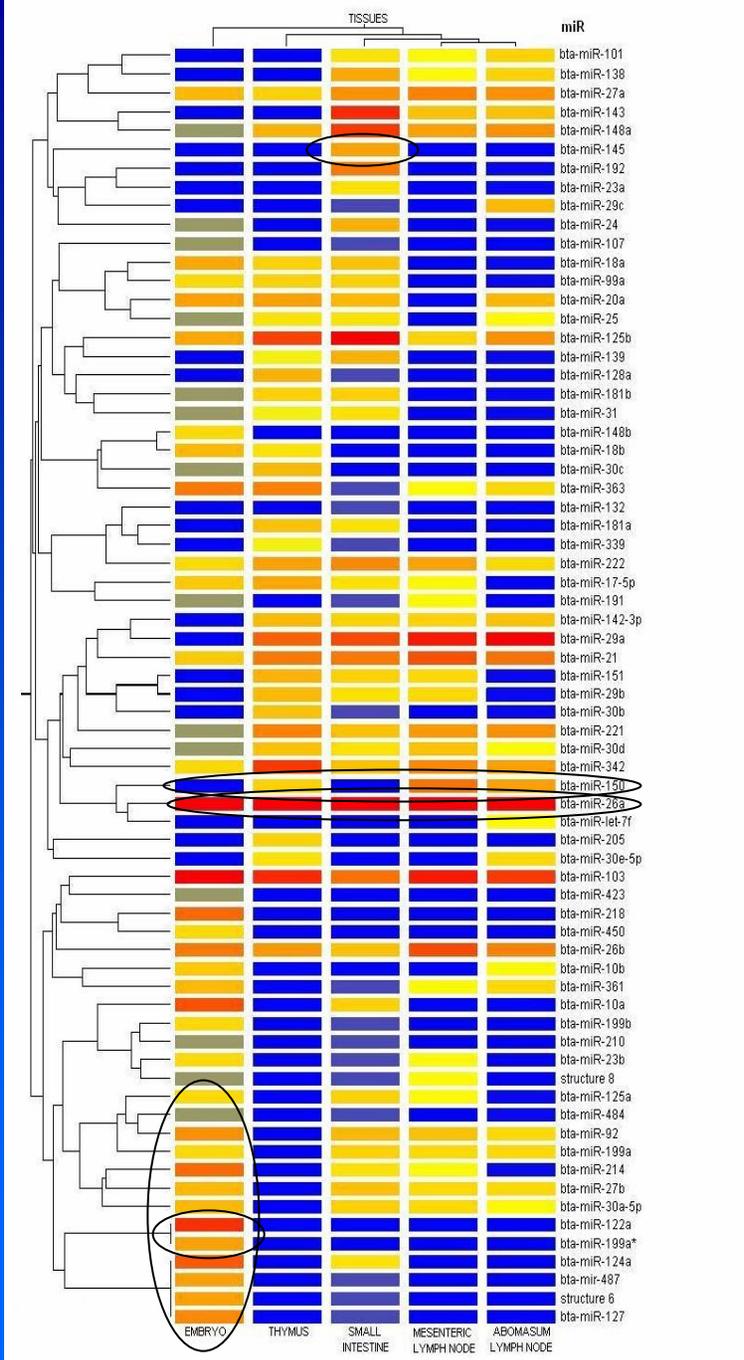
| Biblioteca | Sequencias de qualidade | Sequencias únicas | miRNA conhecidos |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| THY | 579 | 100 | 54 |
| MLN | 542 | 91 | 48 |
| ALN | 540 | 94 | 47 |
| SI | 559 | 187 | 64 |
| EMB | 397 | 131 | 54 |
| Conjunto | 2,617 | 412 | 100 |

Resumo das duas estratégias

- MPSS: 61
- Seq: 129 (100 conhecidos e 29 potencialmente novos).
- Sobreposição: MPSS e Seq: 31
- Somente MPSS: 29
- Somente Seq: 99
- Total de miR identificados: 159 (221 preditos)

Padrão de expressão dos miRNA bovinos

Expression profile of bovine miR



E T SI ALN MLN

-Os diferentes tecidos têm um padrão de expressão diferente, mas ALN~MLN.

-Os tecidos embrionário e intestino delgado apresentaram maior diversidade.

-Abomaso e nódulo linfático abomasal tem um padrão de expressão similar.

-Alguns miRNAs são expressos preferencialmente no embrião, intestino delgado ou nódulos linfáticos e timo.

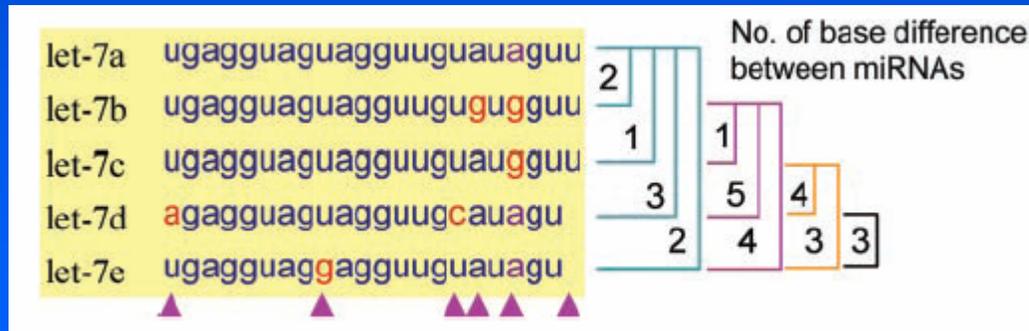
-mir-122a e mir-199a* parecem ser específicos do embrião e mir-145 do ID.

-Prevalência do bta-miR-26a em todos os tecidos.

--bta-mir-150 foi detectado somente nos tecidos relacionados com resposta imune.

Validação por RT-PCR quantitativo

Problema:



TaqMan probes

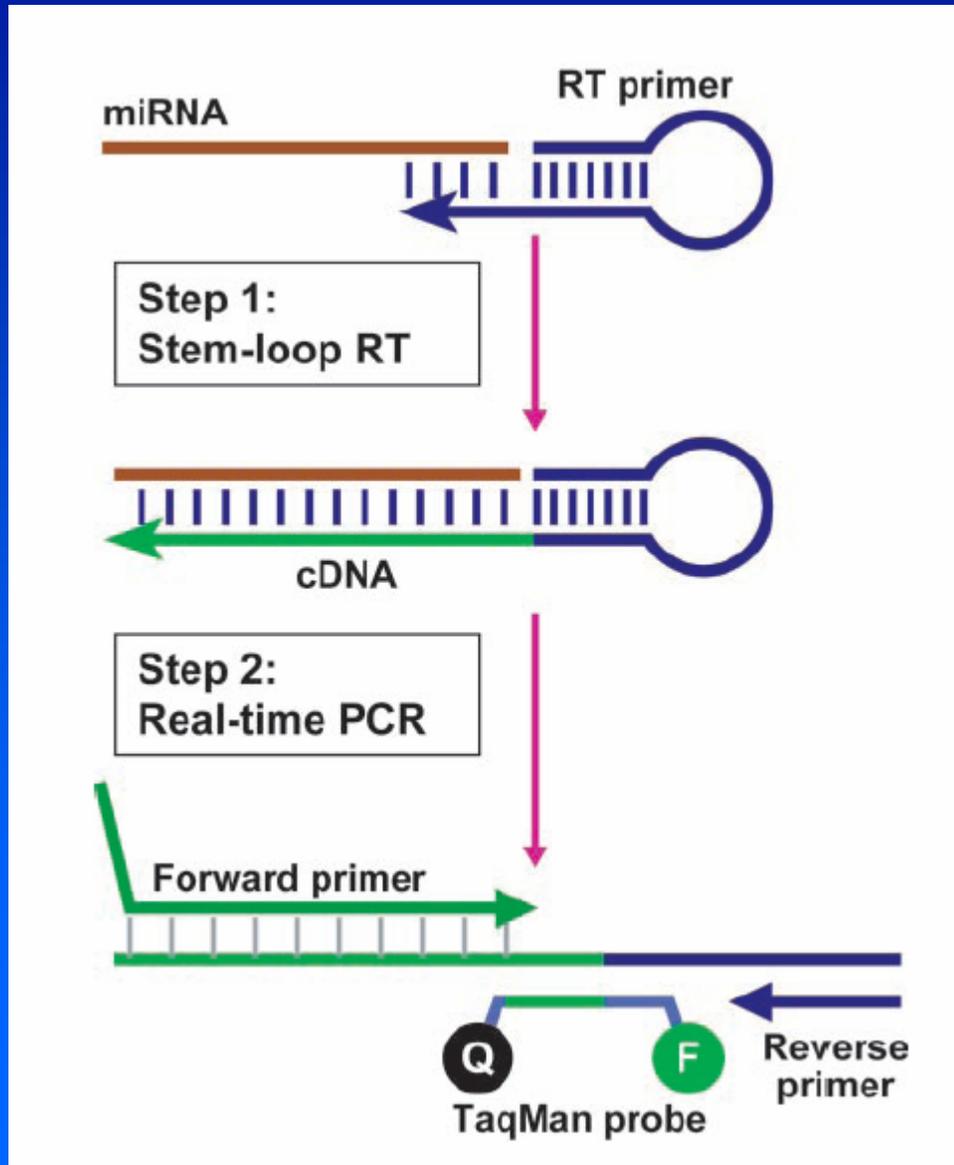


Table 3. Calculated threshold ($Ct \pm$ standard deviation) of selected bovine miRs determine by quantitative RT-PCR.

| ¹ Tissues | N ⁴ | RNU6B | bta-miR-26a | bta-miR-103 | bta-miR-29a | bta-miR-125b | bta-miR-150 | bta-miR-122a |
|----------------------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| THY | 3 | 28.0 ± 0.3 | 19.8 ± 0.2 | 23.6 ± 0.2 | 23.1 ± 0.4 | 22.4 ± 0.4 | 22.1 ± 0.9 | 33.6 ± 2.0 |
| MLN | 3 | 28.2 ± 0.1 | 20.7 ± 0.7 | 24.0 ± 1.3 | 22.0 ± 1.1 | 25.0 ± 0.4 | 19.9 ± 0.9 | 36.7 ± 0.8 |
| ALN | 2 | 28.2 ± 0.4 | 21.0 ± 0.7 | 23.9 ± 0.1 | 21.7 ± 0.3 | 24.9 ± 0.3 | 19.9 ± 0.3 | > 40 |
| SI | 2 | 28.0 ± 0.2 | 23.0 ± 3.4 | 24.2 | 22.1 ± 0.2 | 22.8 ± 0.0 | 23.5 ± 0.2 | > 40 |
| EMB | 1 | 28.6 | 21.3 | 23.7 | 29.0 | 23.0 | 28.4 | 26.8 |
| Amplification ² | | n/a | 1.88 | 1.85 | 1.94 | 1.79 | 1.88 | 1.87 |
| Correlation ³ | | n/a | -0.59 | -0.66 | -0.85 | -0.63 | -0.73 | -0.88 |

¹Tissues used for library construction: THY, thymus; MLN, mesenteric lymph node, ALN, abomasum lymph node; SI, small intestine and EMB, embryo. ² PCR amplification efficiency. ³Correlation of Ct with miR library frequency. ⁴Number of animals used in the assay.

Validação de novos miRNA bovinos.

- Critérios:
 - Expressão.
 - Estrutura secundária.
 - Conservação da seqüência entre espécies

Estrutura secundária

3. UCAGUAACAAAGAUUCAUCCUUG

```

CACCACCAGA|          AUC  A          A          - CCA
      CUAUUAUUUGCA  AGU  ACAAAGAUUC  UCCUUGU  GU  \
      GAUAUAUA AUGU  UCA  UGUUUCUAAG  AGGAACA  CG  U
-----^          GAA  C          -          A  AAC
  
```

4. AGUCCUUGCUAUGUGCCAGGCA

```

UGCUGAC|   UG   ----   A  -   AU           C   A           UA
      CUCUG  UCCCC   AGC  CC  CAG  CAGUGCUUGGCAC  UAGUA  GUACUCAGUA  U
      GAGAC  AGGGG   UCG  GG  GUC  GUUACGGACCGUG  AUCGU  CGUGAGUUGU  A
-----^   CU   GGUU   -  A   GU           U   C           UC
  
```

5. ACCAGUAGGCCGAGGCCCCUC

```

A--   -----|   U   -           -   CC  G  CU
      GGAG           GGUC  CCU  UGAGGGGUCUUGGCCU  CUG  CA  GA  \
      CCUC           UCGG  GGA  ACUCCCGGAGCCGGA  GAC  GU  CU  C
      CUC   UCAUUGG^  C   C           U   CA  A  UU
  
```

Novos miRNA (braços complementares)

>hsa-mir-21 MI0000077

UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA

hsa-miR-21/bta-miR-21-5p

G bta-miR-21-3p

bta-miR-21-5p:18 (THY), 14 (SI), 28 (MLN), 19 (ALN), 3 (EMB)

bta-miR-21-3p:1 (ALN)

>hsa-mir-425 MI0001448

GAAAGCGCUUUGGAAUGACACGAUCACUCCCGUUGAGUGGGCACCCGAGAAGCCAUCGGGAAUGUCGUGUCCGCCAGUGCUCUUUC

bta-miR-425-5p

hsa-miR-425/bta-miR-425-3p

bta-miR-425-5p:1 (SI)

bta-miR-425-3p:1 (SI)

>hsa-mir-127 MI0000472

UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUCAGAAA GAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCUGGUCGGAAGUC

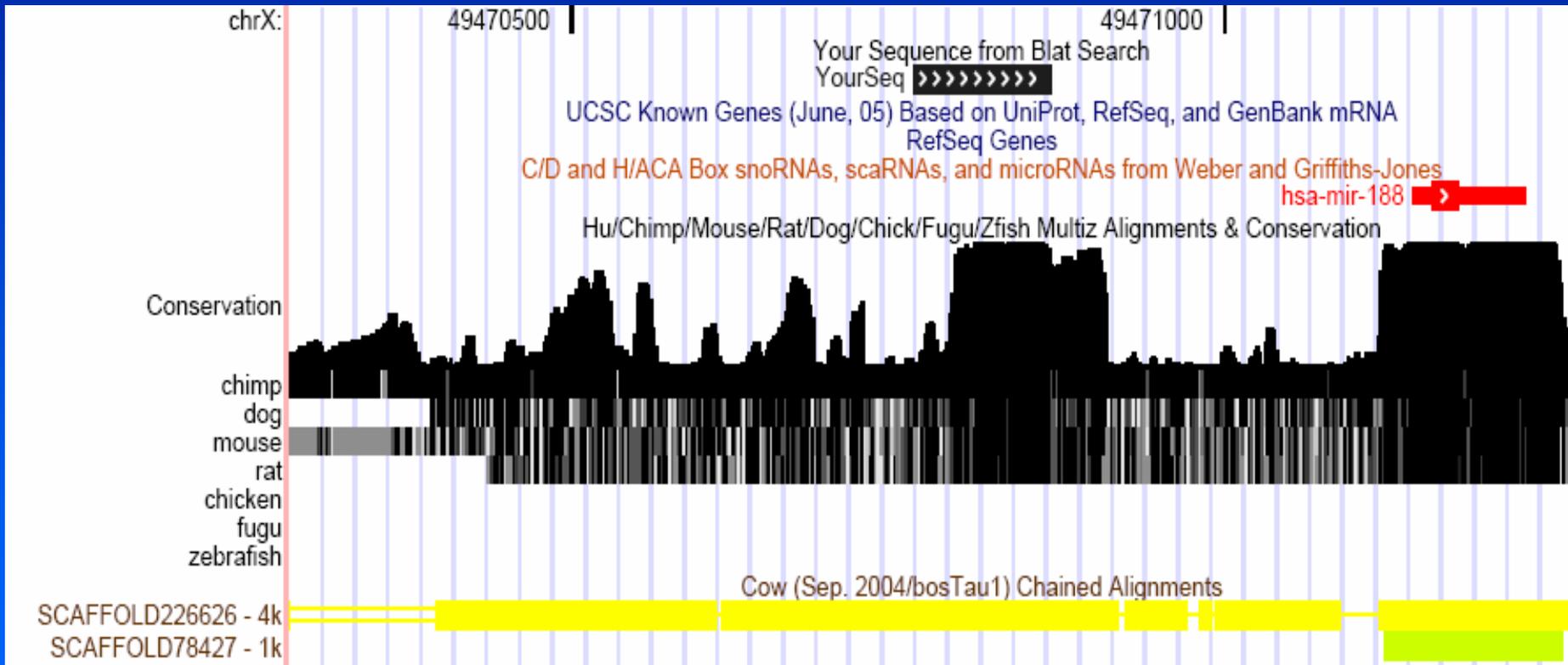
bta-miR-127-5p

hsa-miR-127/bta-miR-127-3p

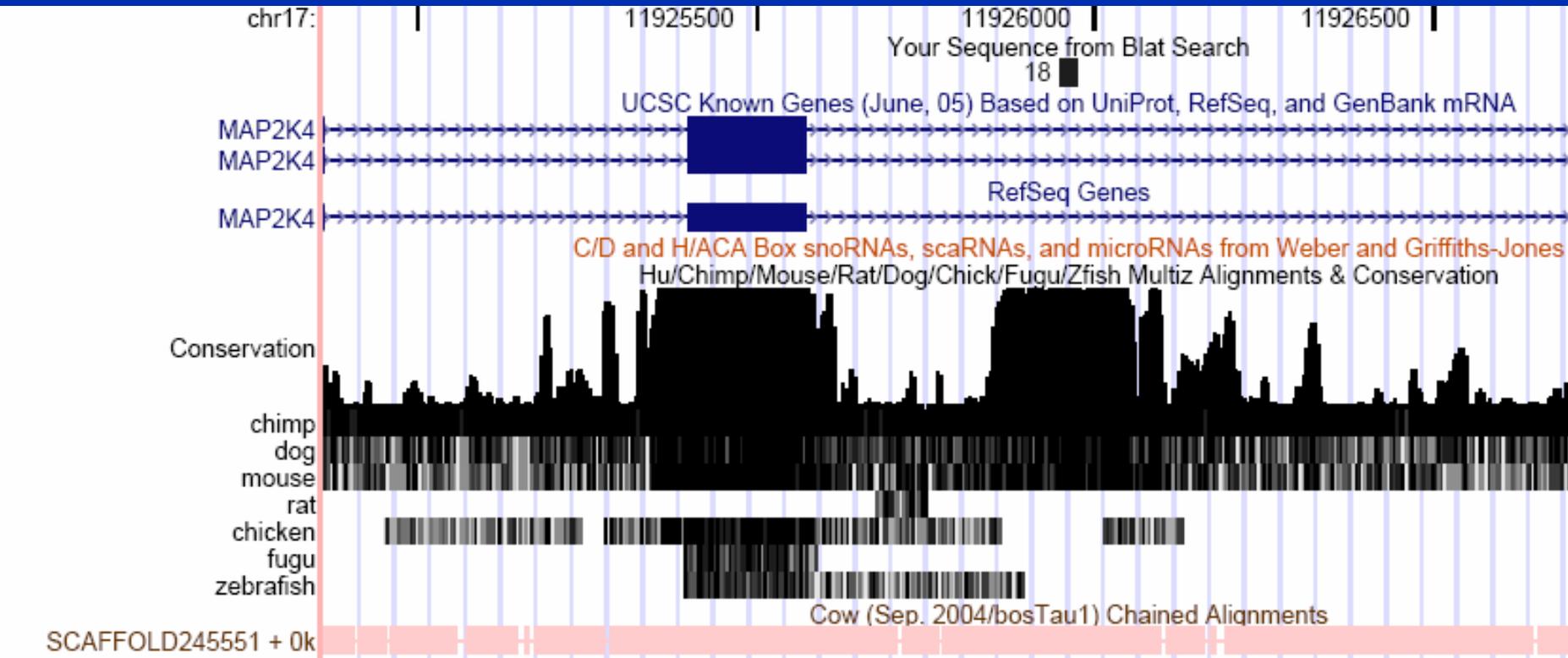
bta-miR-127-5p:2 (EMB)

bta-miR-127-3p:1 (SI), 9 (EMB)

Conservação de sequencia.

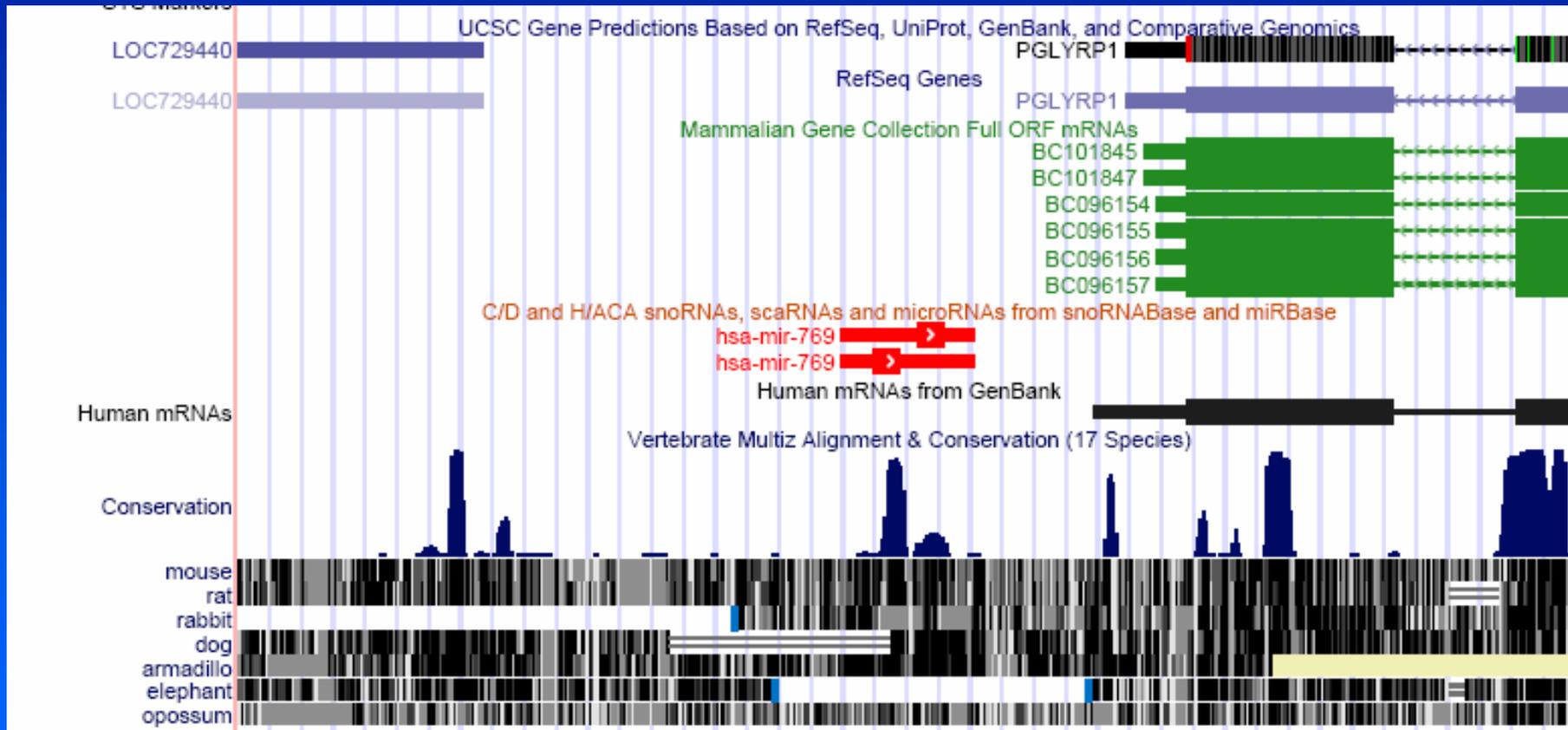


Conservação de sequencia.



miR em região de intron

miR em região intergênica



Conclusões:

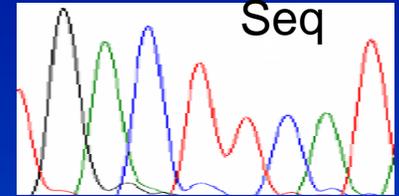
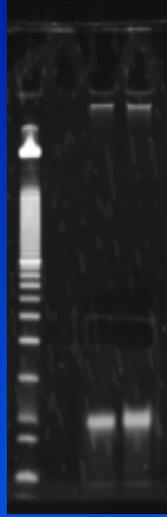
- Comparação in silico permitiu a identificação da maioria dos miRNAs bovinos.
- Construção e sequenciamento de biblioteca de miRNA foi importante para identificar novos miRNA bovinos.
- miRNAs bovinos são conservados entre as espécies.
- Sequenciamento exaustivo permitiu a identificação de novos miRNAs.
- É necessário validar os novos miRNAs bovinos.
- É preciso investigar outros tecidos.
- É preciso investigar os alvos dos miRNAs e a importância dos miRNAs na regulação da expressão gênica.

Discovery and profiling of bovine microRNAs from Abomasum of *Bos indicus* Cattle (Nelore).

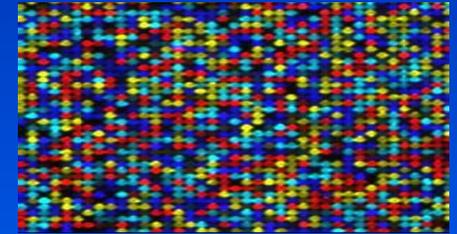
Luiz L. Coutinho, Lakshmi K. Matukumalli, Tad S. Sonstegard, Curtis P. Van Tassell, Louis C. Gasbarre, Anthony V. Capuco, Timothy P.L. Smith

Clonagem de miRNA

LMW RNA



454



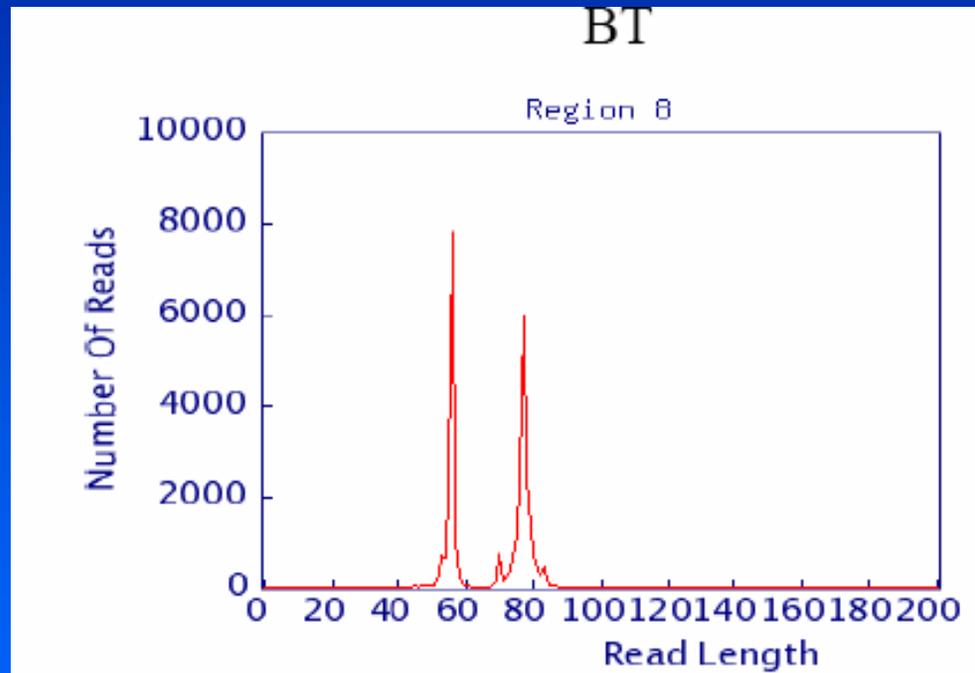
Isolamento de miRNA de abomaso.

Ligation of 5' adaptor

Ligation of 3' adaptor

cDNA synthesis, cloning and sequencing

Tamanho dos fragmentos obtidos na biblioteca.

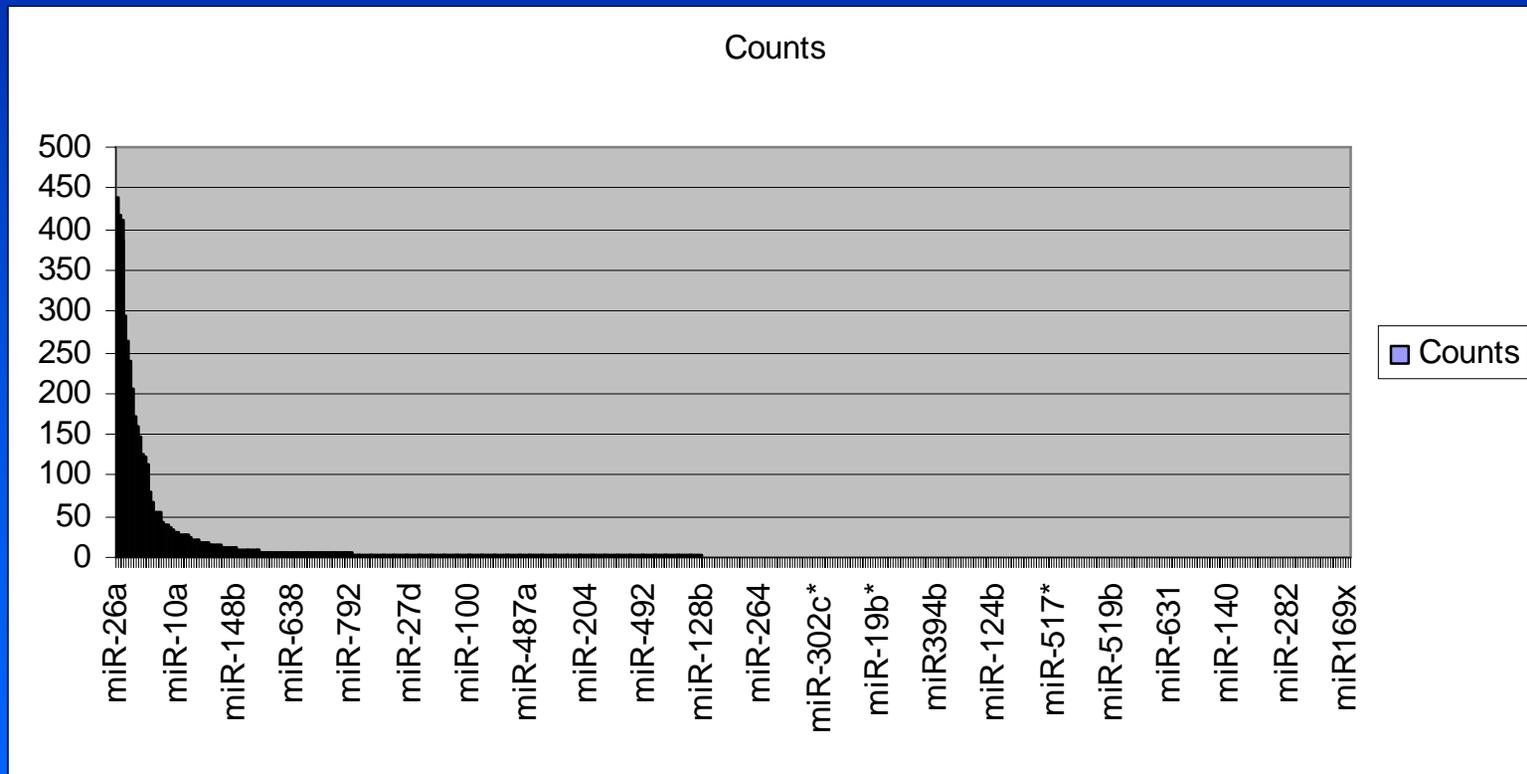


Problema: vários clones não apresentaram miRNA

Resultado do sequenciamento

- A biblioteca apresentou duas classes de fragmentos
- Foram sequenciados 30.787 clones.
- Aproximadamente a metade tinham um tamanho apropriado (17-25 bases).
- 6.006 clones apresentaram similaridade com miRNAs presentes no mirBase
- Clusterização resultou em 591 sequencias únicas, cada uma representando um potencial miRNA de bovino.
- A freqüência da distribuição dos clones variou de 438 copias para bta-miR-26a e uma copia para 311 microRNAs.

Frequência dos miRNAs



Conclusões:

- A estratégia permitiu a identificação de miRNAs de Nelore.
- Os miRNAs são bastante conservados (esperado).
- Próximo passo: Será que existe diferença na seqüência alvo no RNAm?

Importância de miRNAs no desenvolvimento muscular.

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibe, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, JM., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., Georges, M.: A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep., *Nat Genet* 38:813-818, 2006.

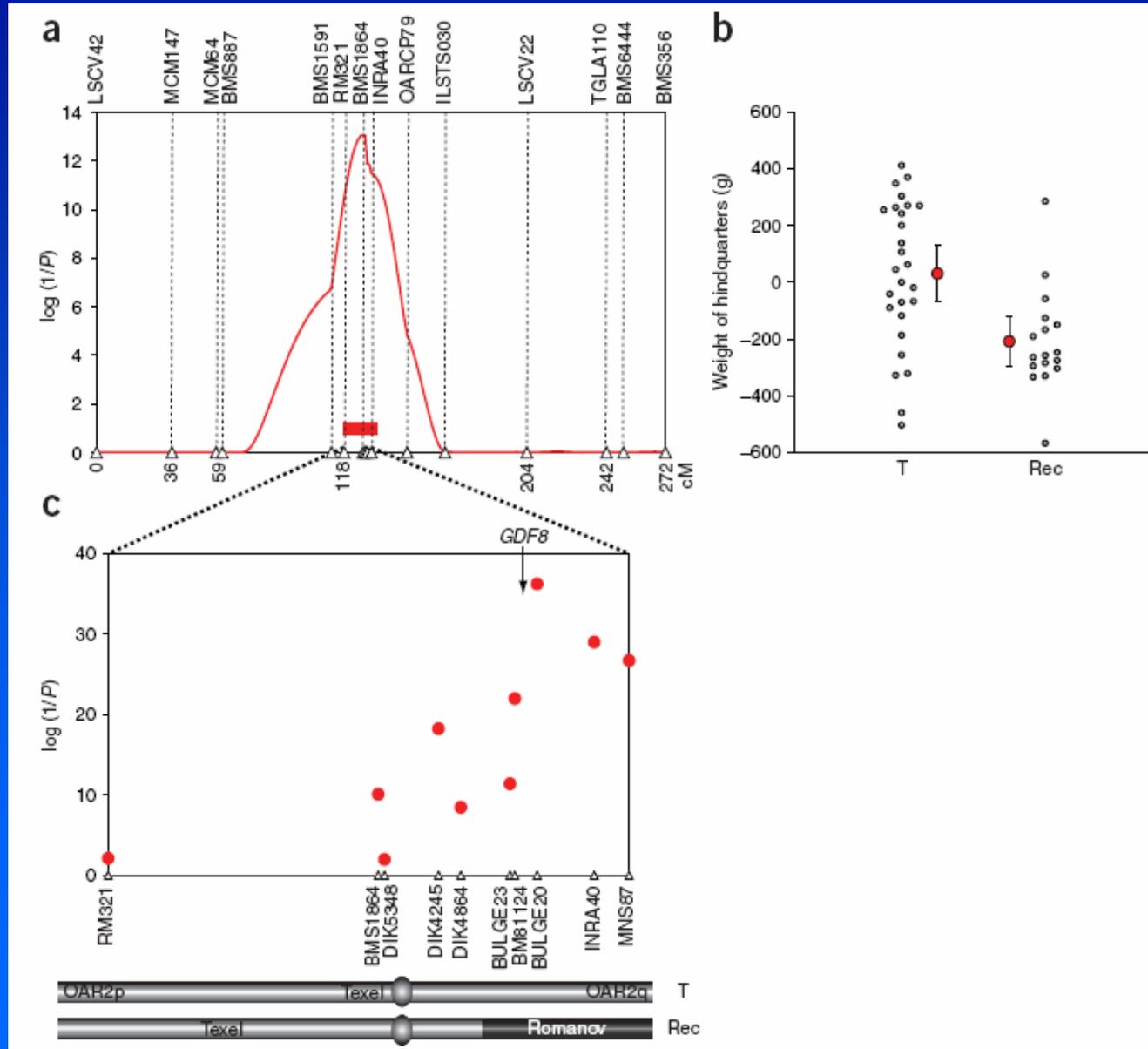
Texel Sheep Breeders Society

The Breed with the Remarkable Muscle Development!

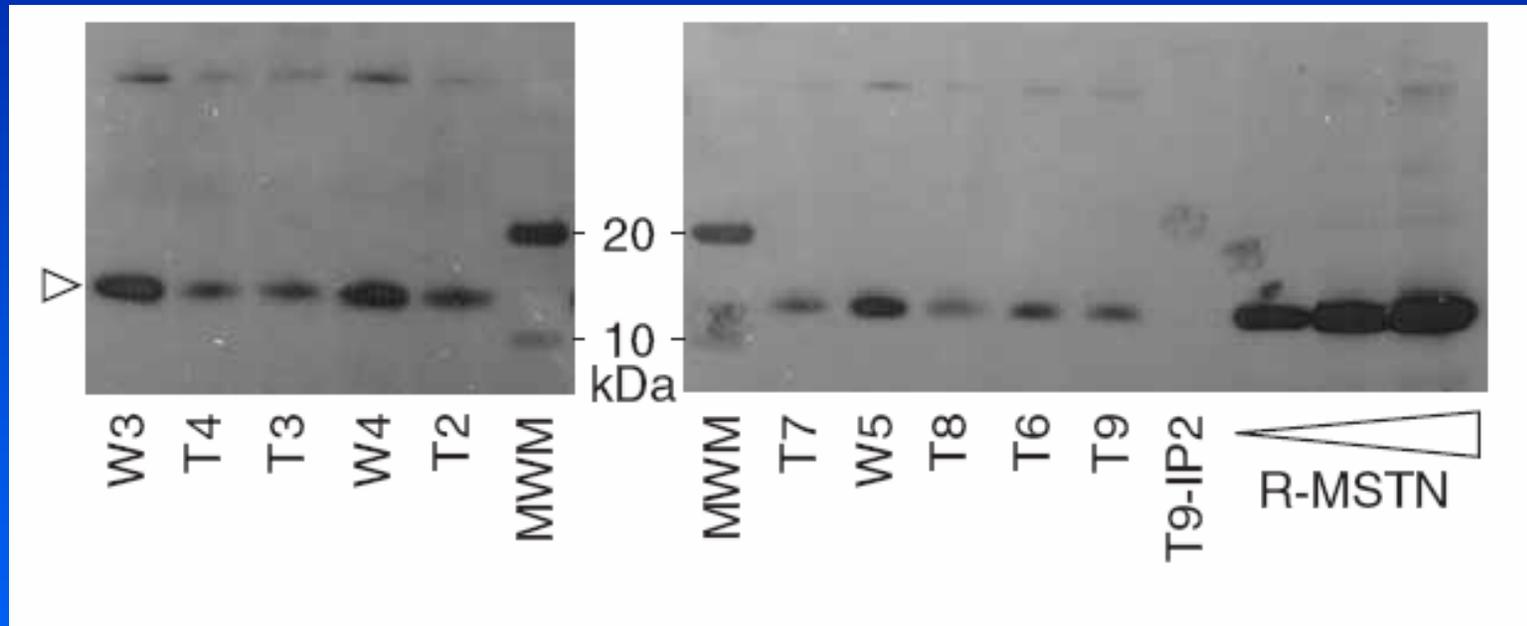
WELCOME TO THE
TEXEL SHEEP BREEDERS SOCIETY WEBSITE!

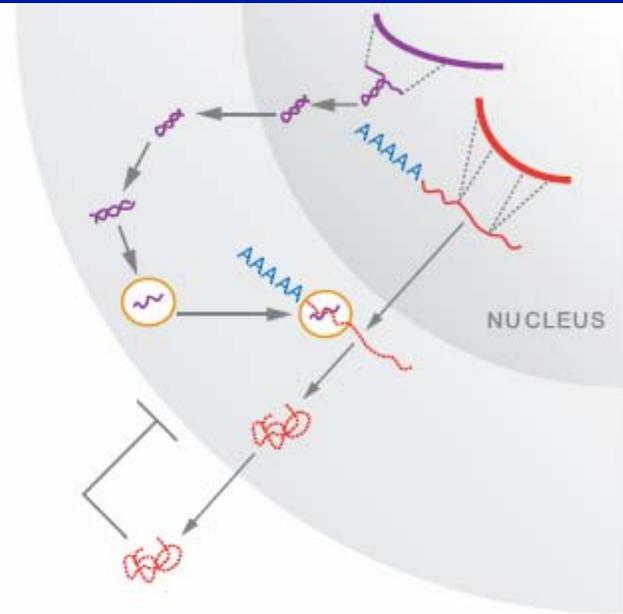
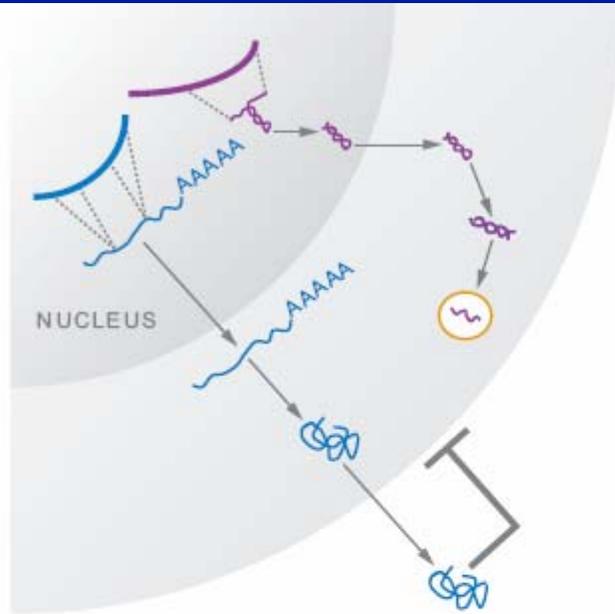


1) Identificação de um QTL no cromossomo 2



Expressão da miostatina (proteína)





Wild-type sheep



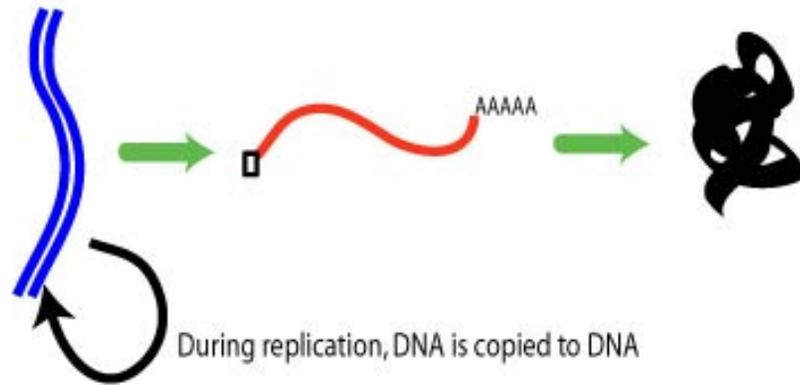
Texel sheep

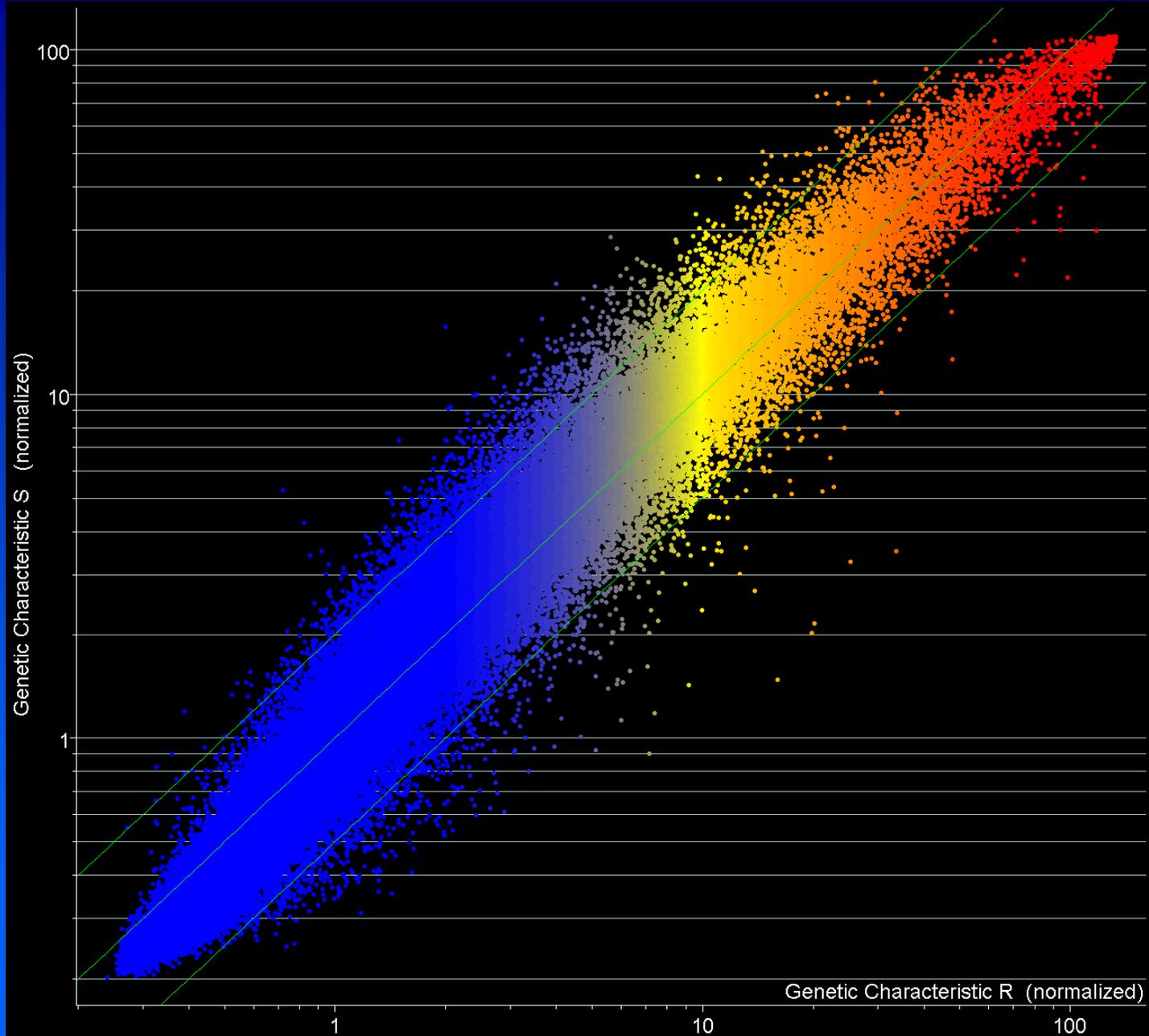
Georges, 2007

The Central Dogma

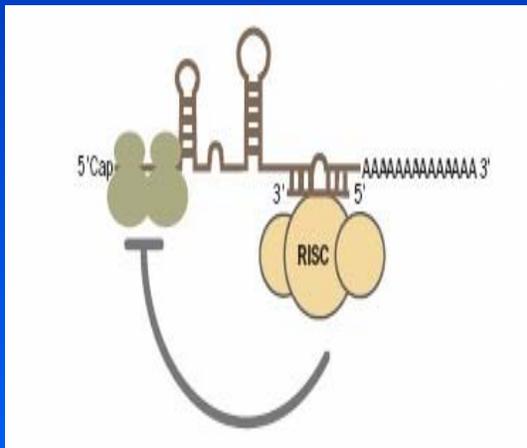
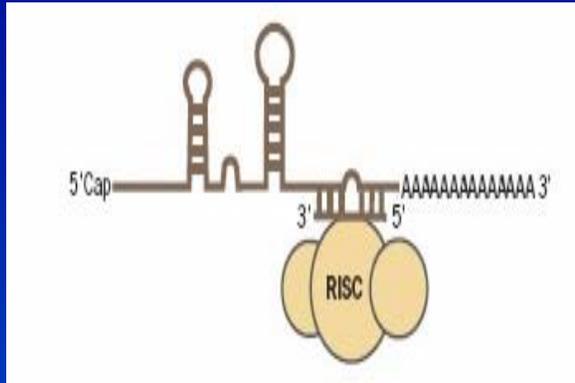
The Central Dogma

DNA is transcribed to RNA is translated to PROTEIN

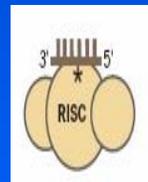




X-axis: All samples 4177 (Genetic Characteristic) : Genetic C... Colored by: All samples 4177 (Genetic Characteristic)
Y-axis: All samples 4177 (Genetic Characteristic) : Genetic C... Gene List: all genes (87042)



Controle da tradução



Degradação de RNAm



EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE – CPPSE

TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR
APLICADAS À PRODUÇÃO ANIMAL

ANÁLISE PROTEÔMICA

Marcelo D. Cantú, *Ph.D.*

DOW BRASIL S.A.

São Carlos, 12 de junho de 2007

SUMÁRIO

- ⇒ **Definições** {
 - ✓ Proteoma
 - ✓ Análise proteômica

- ⇒ **Estratégias para abordar um estudo proteômico** {
 - ✓ Bottom-up
 - ✓ Top-down

- ⇒ **Técnicas analíticas** {
 - ✓ Eletroforese bidimensional
 - ✓ Cromatografia líquida
 - ✓ Espectrometria de massas

- ⇒ **Busca de proteínas em bancos de dados – sistemática de busca empregada pelos principais softwares (*MASCOT* e *SEQUEST*)**

- ⇒ **Interpretação de espectros de massas de peptídeos (sequenciamento de peptídeos)**

PROTEOMA

Conjunto completo de proteínas codificadas e expressas por uma célula ou organismo num determinado momento e sob condições específicas

PORQUE ESTUDAR PROTEÍNAS???

- ➔ responsáveis pelas principais funções celulares
- ✓ *crescimento*
- ✓ *diferenciação*
- ✓ *proliferação*
- ✓ *morte celular*

ANÁLISE PROTEÔMICA

Conjunto de metodologias analíticas aplicadas para a caracterização (qualitativa e quantitativa) de um proteoma

- ✓ **ESTRUTURA** (modificações pós-traducionais)
- ✓ **NÍVEIS** (concentração)
- ✓ **FUNÇÃO**
- ✓ **INTERAÇÃO**

Estratégias para abordar um estudo proteômico

“Bottom-up”

“Top-down”

ANÁLISE PROTEÔMICA

“Bottom-up”



Digestão enzimática



MS e MS/MS

*Análise individual dos peptídeos
(MM e sequência primária)*

Ferramentas de
bioinformática



VANTAGENS

👍 Instrumentação (espectrômetros de massas) menos sofisticada

LIMITAÇÕES

👎 Baixa cobertura da sequência de aminoácidos

👎 Dificuldade de analisar peptídeos com modificações pós-traducionais

➡ **ELETRÓFORESE BIDIMENSIONAL**

MALDI-TOF-TOF

LC-ESI-MS/MS

*Busca em
banco de dados*

ANÁLISE PROTEÔMICA

“Top-down”



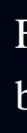
MS



Determinação da MM da proteína intacta



MS/MS



Ferramentas de
bioinformática



VANTAGENS

- 👍 Cobertura total da sequência
- 👍 Permite a análise de peptídeos com modificações pós-traducionais

DESVANTAGENS

- 👎 Requer o uso de espectrômetros de massas de altíssimo custo
- 👎 Maior dificuldade para a interpretação dos resultados

**ANÁLISE PROTEÔMICA, detalhamento de um
estudo empregando a estratégia “*BOTTOM-UP*”**



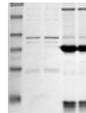
ANÁLISE PROTEÔMICA

“Bottom-up”

✓ De uma maneira geral, é possível descrever um estudo proteômico empregando MS em seis etapas

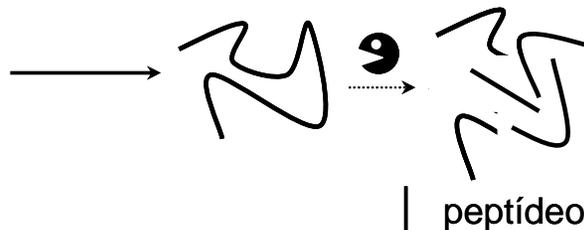
i) Preparo da amostra

Extração e pré-fracionamento da amostra



→ SDS-PAGE
→ eletroforese bidimensional

ii) Digestão Enzimática

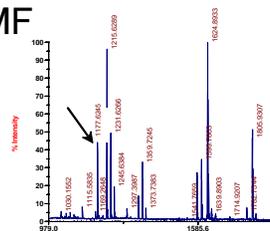


| <u>Enzima</u> | <u>Clivagem*</u> |
|----------------|------------------|
| tripsina | K, R |
| quimiotripsina | F, Y, W |

* C terminal

peptídeos

iv) PMF



MS

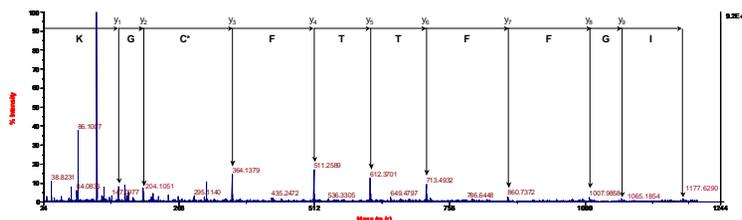
Analizador de íons

iii)

Separação – LC { - troca iônica
- fase reversa

Ionização { - ESI
- MALDI

v) MS/MS



vi) Busca em banco de dados
(NCBI; Swiss-Prot; MSDB; ...)

Ferramentas:

✓ Mascot ✓ Sequest

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

PRIMEIRA DIMENSÃO (IEF)



IPGPhor – GE Healthcare

SEGUNDA DIMENSÃO (SDS-PAGE)



Ettan Dalt six Electrophoresis
GE Healthcare



Protean II Ready Gel System
Bio-Rad

OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS

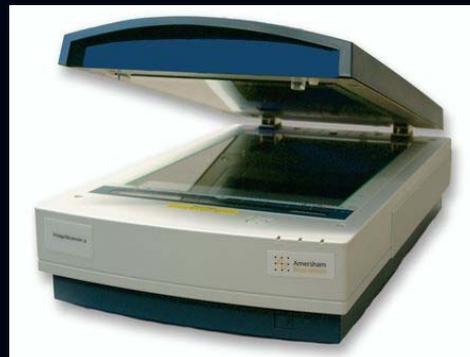


Image Scanner
GE Healthcare

Software de análise das imagens:
Image Master 2D
GE Healthcare

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

⇒ Promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes

PRIMEIRA DIMENSÃO



Focalização isoelétrica (IEF)

separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI)

SEGUNDA DIMENSÃO

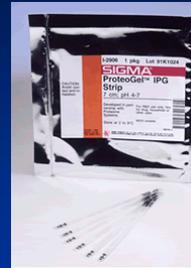


SDS-PAGE

separa as proteínas de acordo com suas MM relativas

Primeira Dimensão: IEF

Fitas com gradiente de pH immobilizado – Fitas IPG



Remover o filme que protege o gel da fita IPG



Cobrir o gel com cover fluid



Segunda Dimensão: SDS-PAGE



Exemplo de aplicação: análise comparativa do extrato proteico de plantas cítricas sadia e infectada pela *Morte Súbita dos Citros*

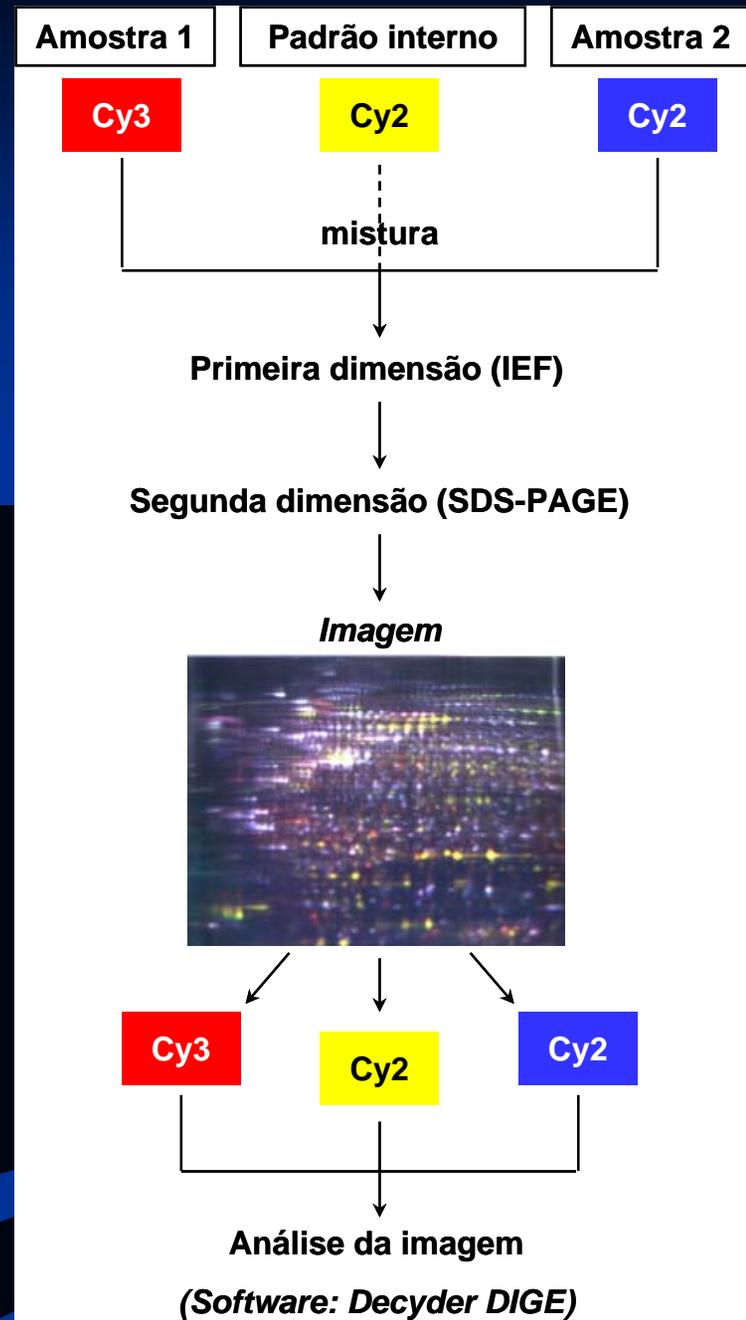
PLANTA DOENTE

PLANTA SADIA

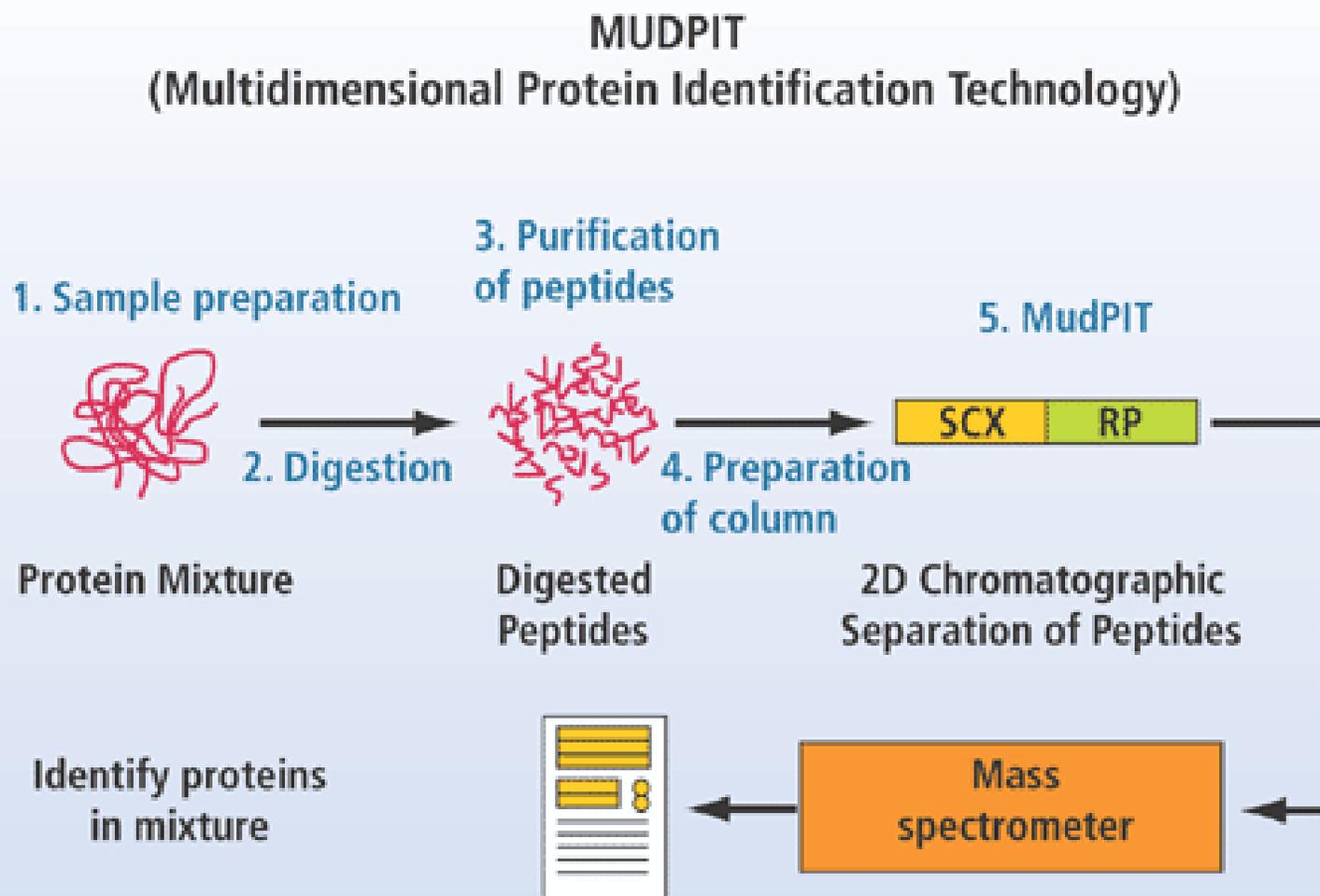


“State-of-the-art”

Differential Gel Electrophoresis (DIGE)



CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MULTIDIMENSIONAL - MUDPIT



ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

- ⇒ A MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa

Esquema básico de um espectrômetro de massas

Fontes de ionização

- ⇒ ESI
- ⇒ MALDI



Analisadores de massas

- ⇒ Quadrupolo
- ⇒ Ion-Trap
- ⇒ Time-of-Flight (TOF)

Sistema de aquisição de dados

Detector

- ⇒ Eletromultiplicadoras

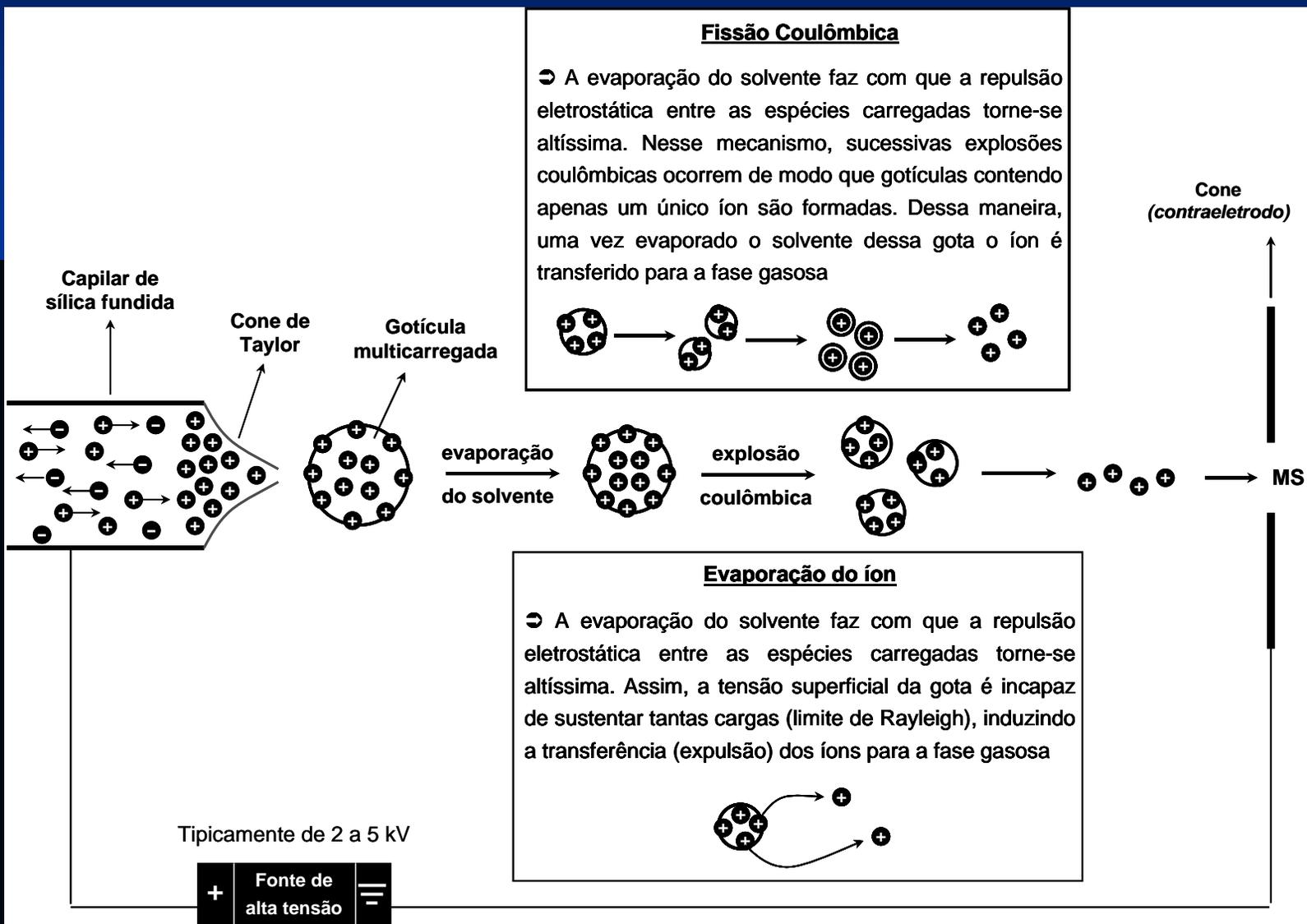


ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

Técnicas de ionização

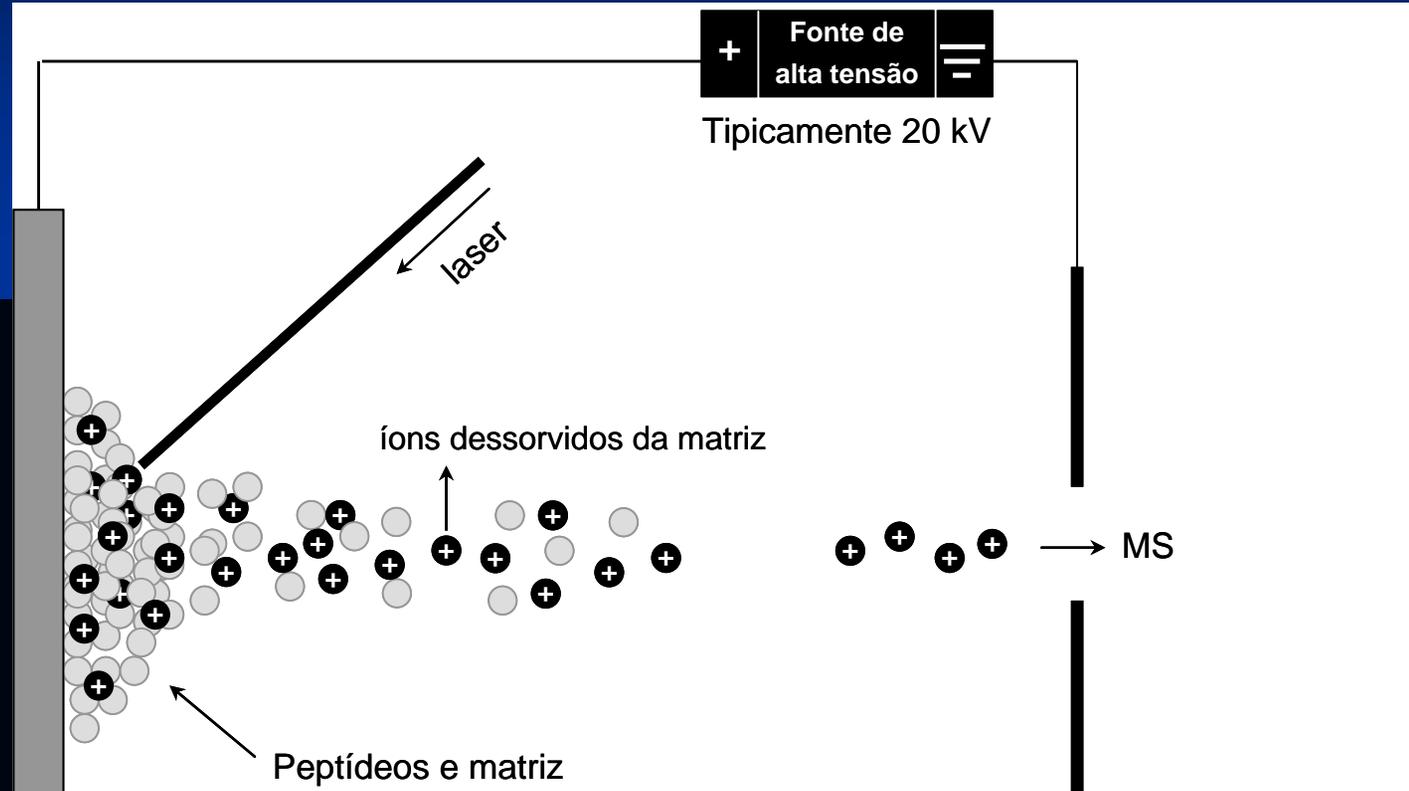
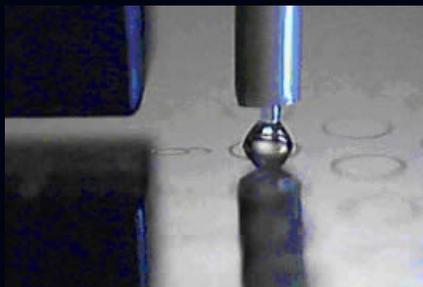
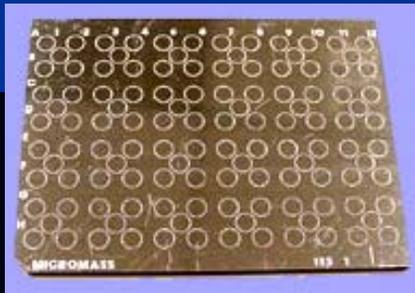
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Técnica de ionização: *Electrospray*



ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Técnica de ionização: *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)*



⇒ As proteínas/peptídeos a serem analisados são misturados a um grande excesso de matriz, que normalmente trata-se de um ácido orgânico que absorve fortemente energia na região do UV, de modo que ocorre a co-cristalização da amostra com a matriz. Um feixe de laser com comprimento de onda adequado para a matriz em uso é incidido no cristal a fim de promover a sublimação e transferência da matriz, e conseqüentemente da espécie não volátil, para a fase gasosa. Após inúmeras colisões íon-molécula que ocorrem durante esse processo, há a formação quase que exclusiva de moléculas monocarregadas, as quais são aceleradas em direção ao analisador de massas

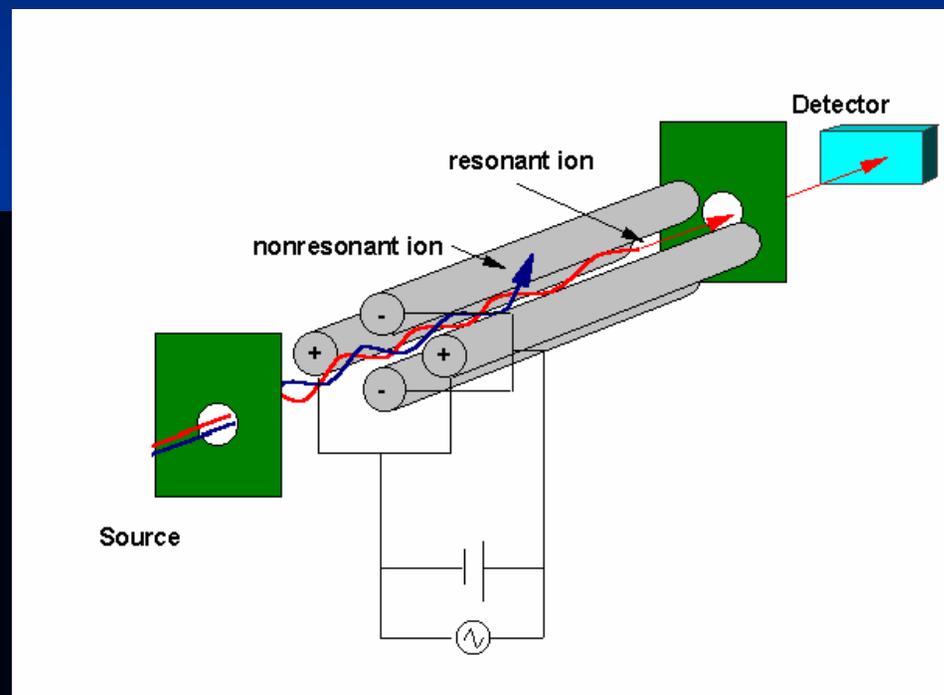
ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

Analísadores de íons

The background of the slide is black. A horizontal blue band is at the top. Below it, the text 'ESPECTROMETRIA DE MASSAS:' is written in white, bold, uppercase letters. Below that, the text 'Analísadores de íons' is written in a yellow, italicized font. On the right side of the slide, there are several thick, blue, wavy lines that curve downwards and to the right, creating a sense of motion or a path.

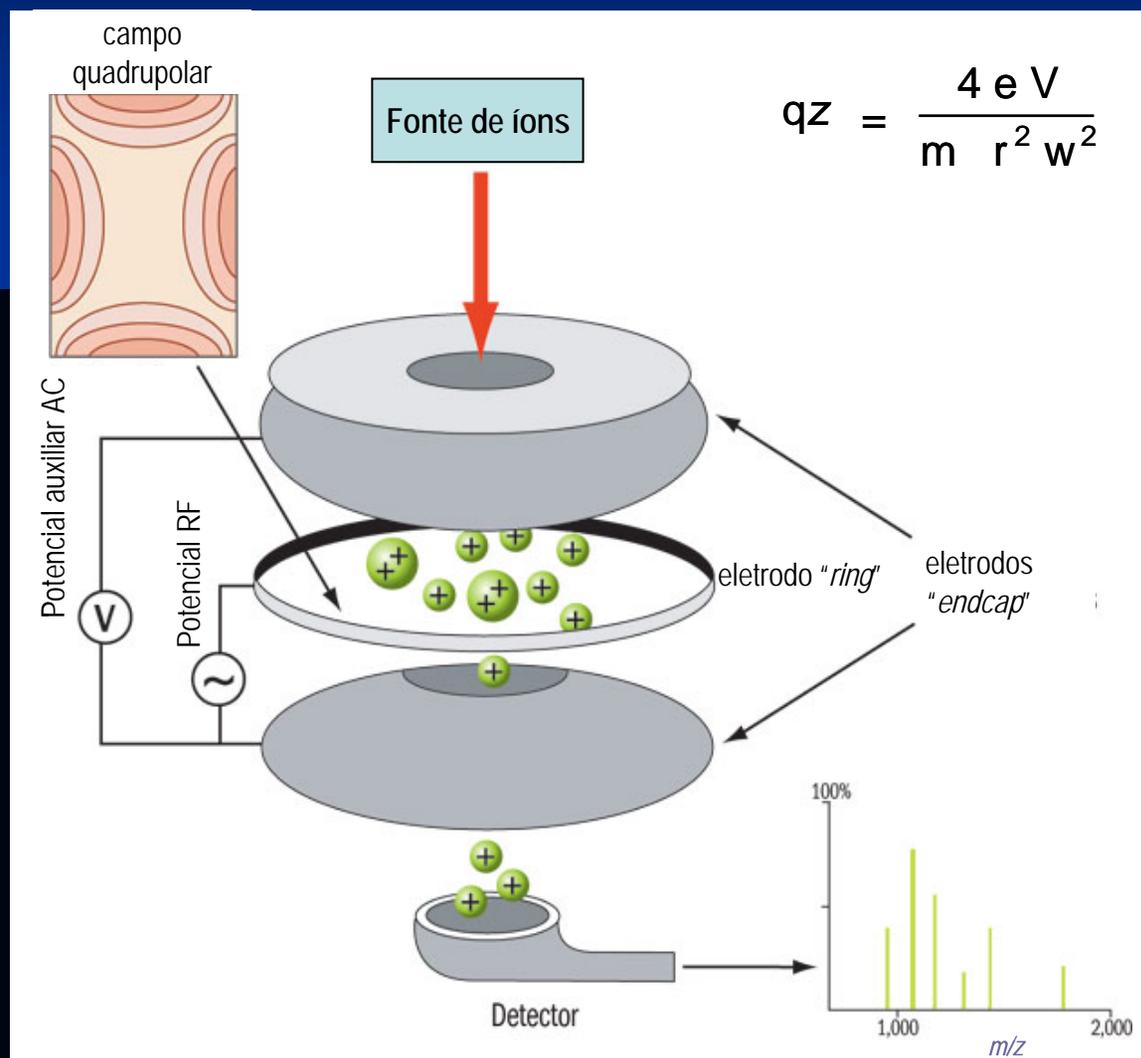
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Analizador de íons: *Quadrupolo*



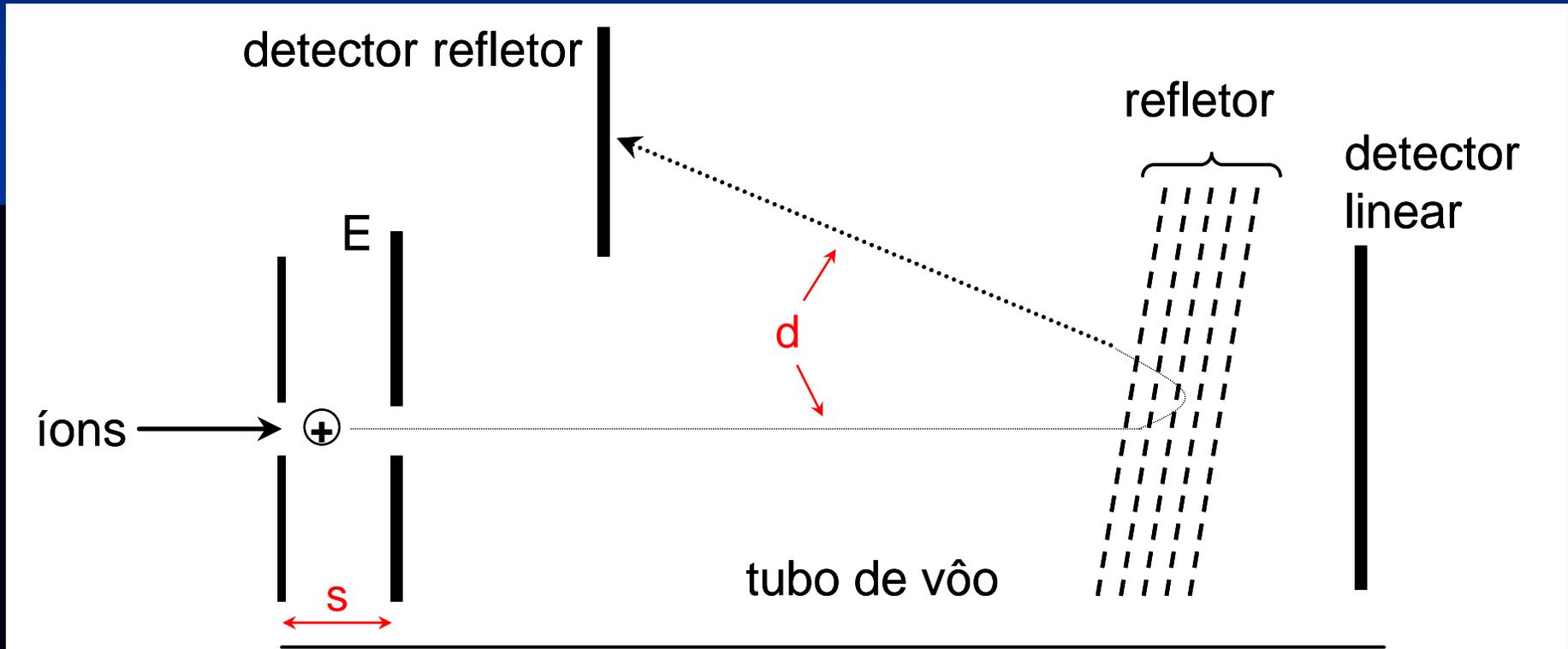
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Analizador de íons: *Ion Trap*



ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Analizador de íons: *Time-of-flight (TOF)*

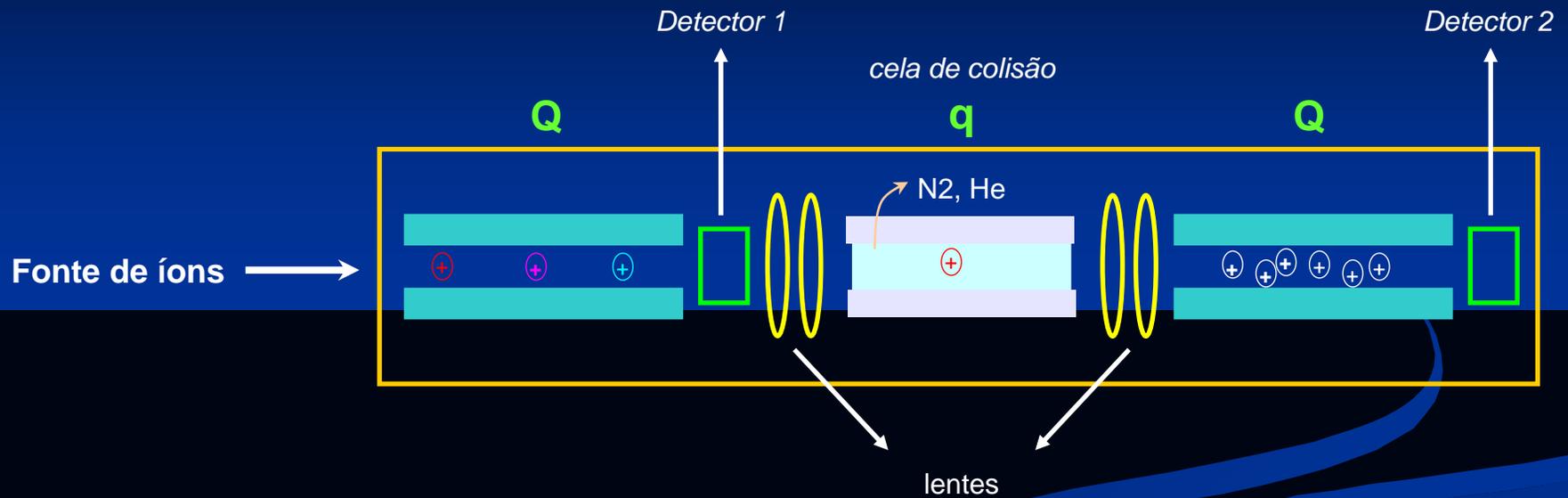


$$\frac{m}{z} = 2 e E s \left(\frac{t}{d} \right)^2$$

ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

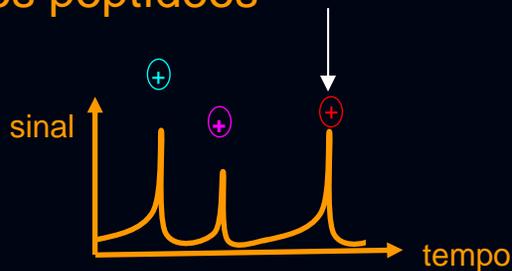
Equipamentos que permitem a realização de experimentos em sequência (tandem)

Triplo quadrupolo (QqQ)

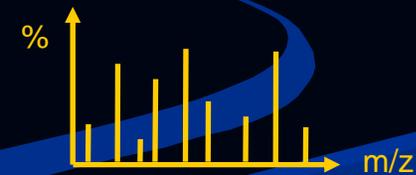


☑ Cromatograma do íon total:

MM dos peptídeos



☑ MS/MS: sequência de aminoácidos dos peptídeos

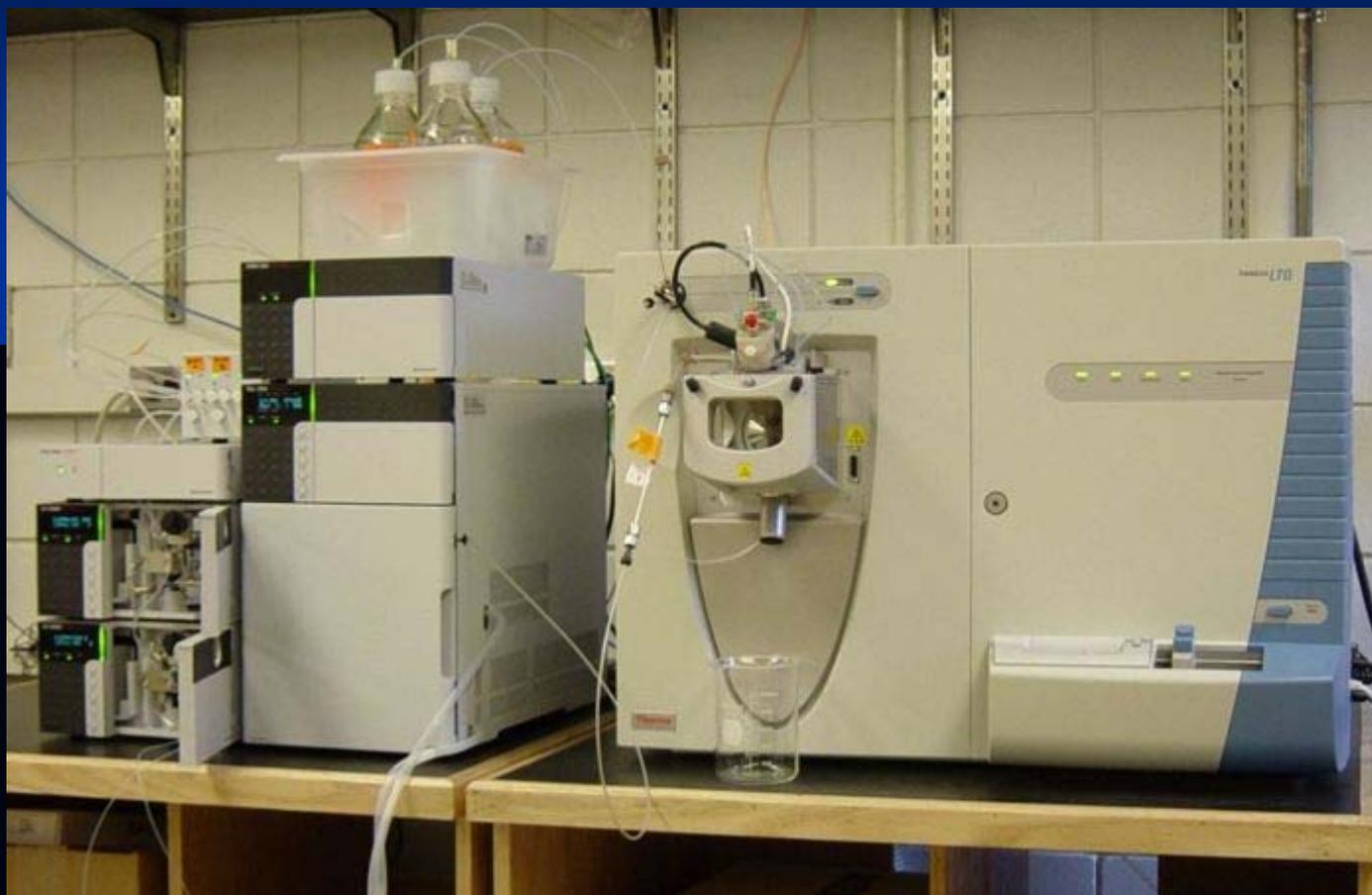


Triplo quadrupolo (QqQ) (ESI)



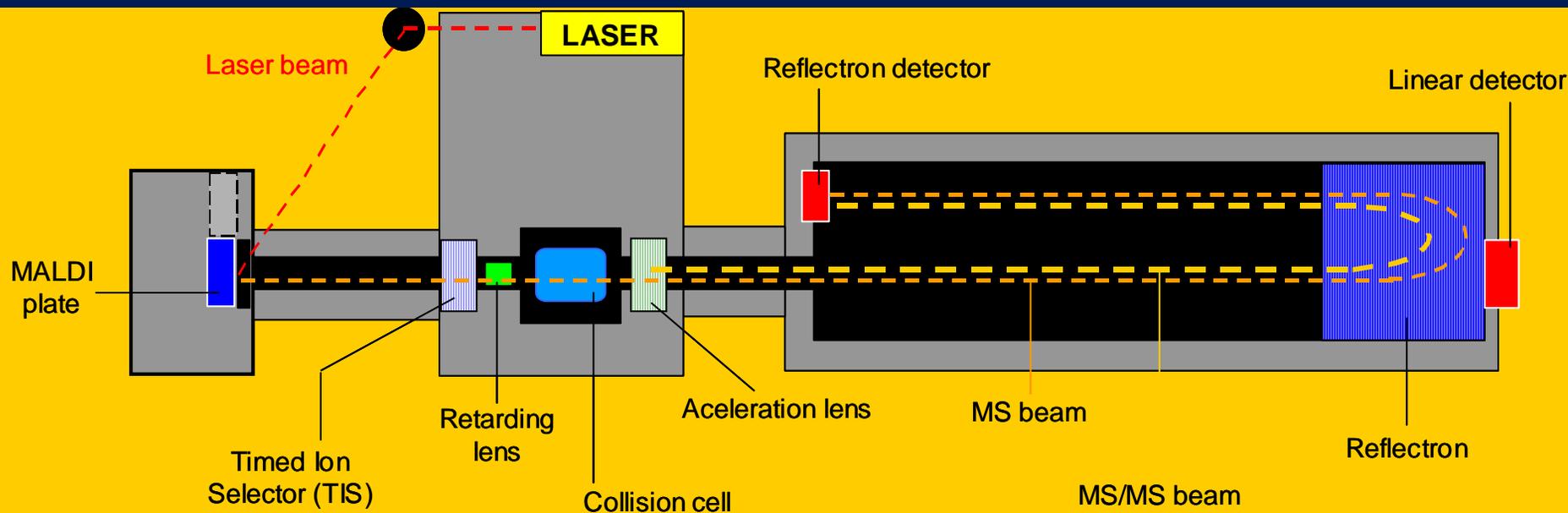
API 5000 – Applied Biosystems

ION TRAP (ESI)



LTQ – Thermo Electro Co.

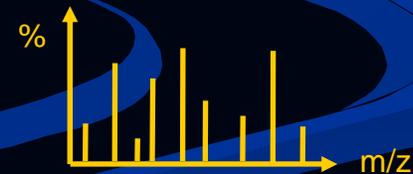
MALDI-TOF-TOF



☑ **Peptide Mass Fingerprint (PMF):**
 massa molecular dos peptídeos



☑ **MS/MS:** sequência de aminoácidos dos peptídeos



MALDI-TOF-TOF

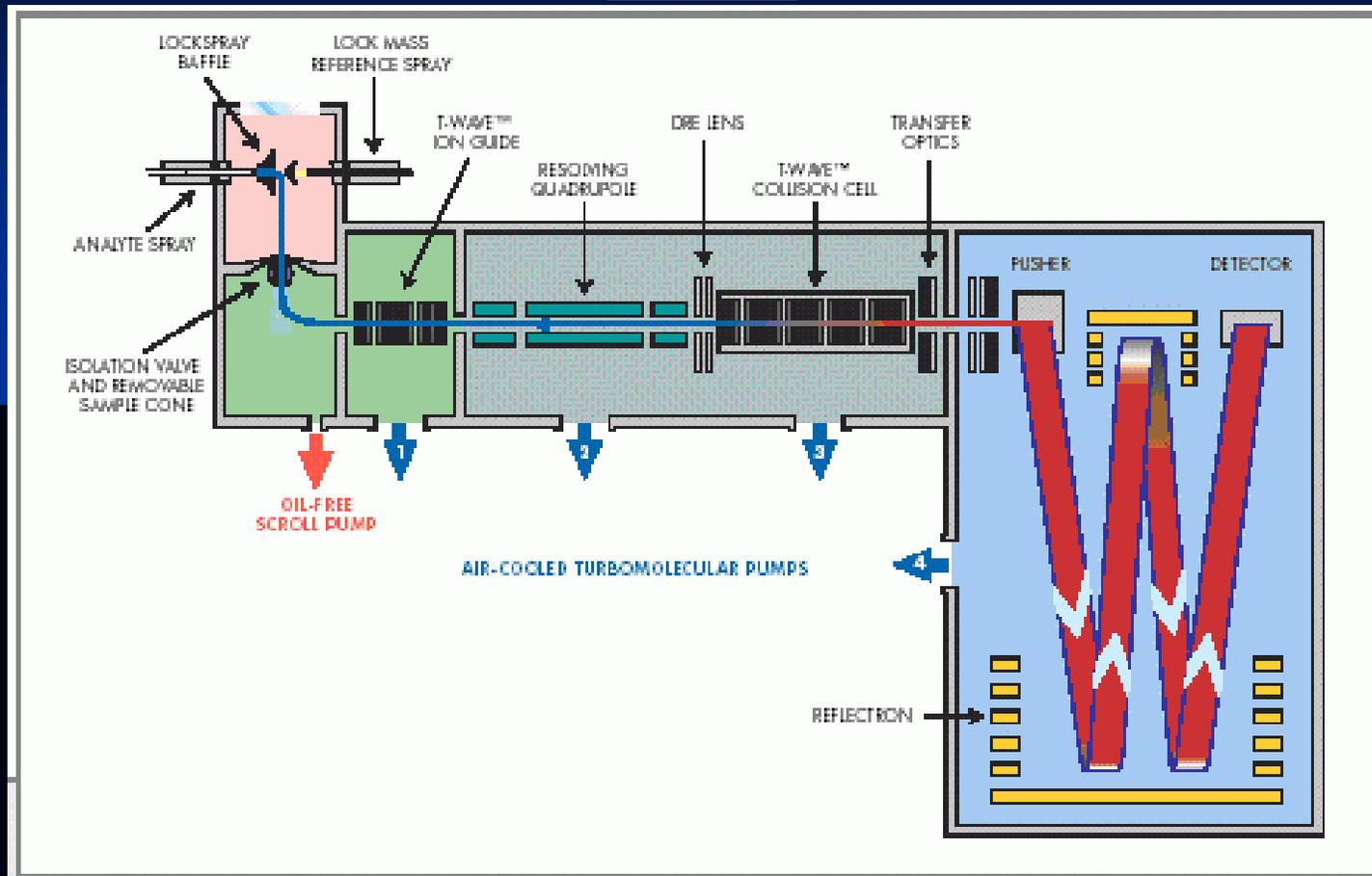


4700 – Applied Biosystems

Ultraflex - Bruker

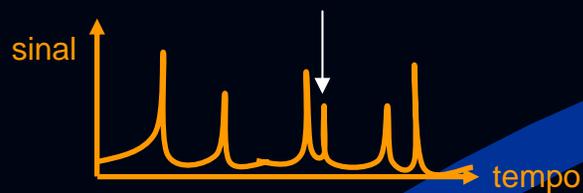


Q-TOF

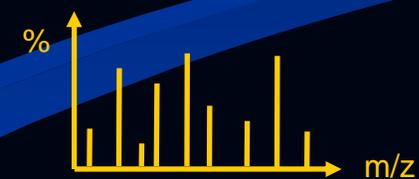


☑ **Cromatograma do íon total:**

MM dos peptídeos



☑ **MS/MS:** sequência de aminoácidos dos peptídeos



Q-TOF

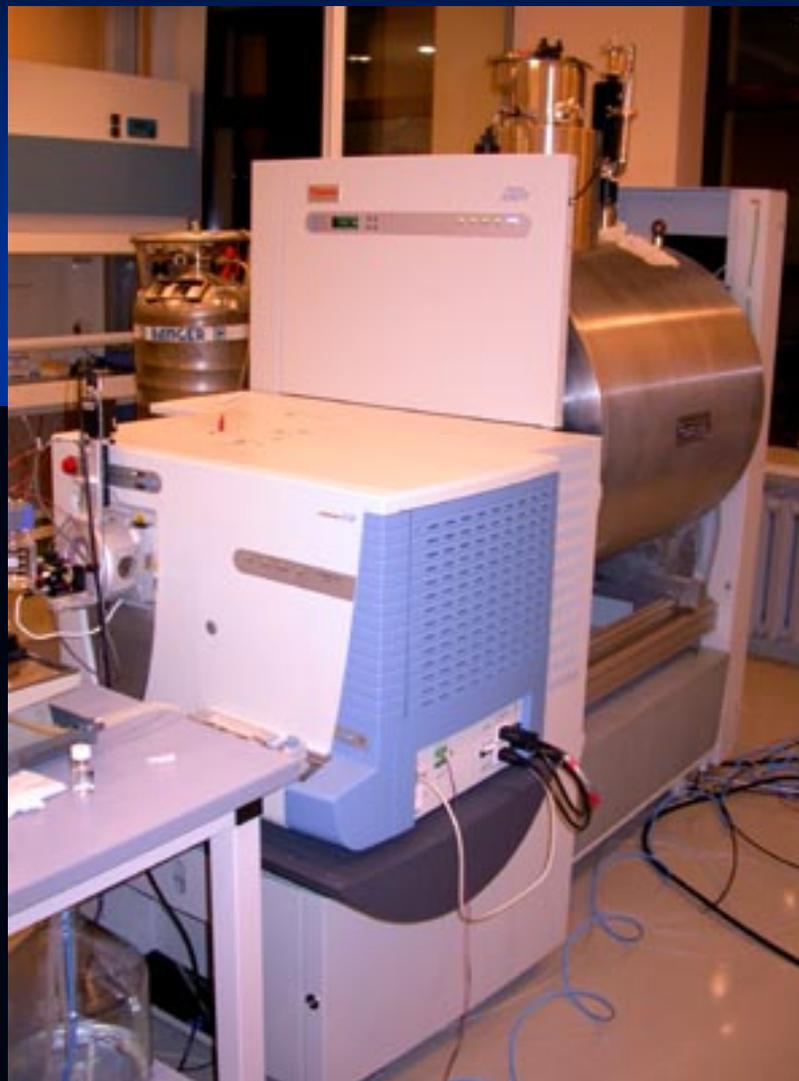


Premier - Waters

MicrOTOF - Bruker



FTICR



FTICR – Thermo Electro Co.

LTQ-ORBITRAP



LTQ-Orbitrap – Thermo Electro Co.

⇒ Em posse dos dados de **PMF** e **MS/MS**

Busca em banco de dados

Ferramentas de busca mais comumente empregadas

MASCOT

www.matrixscience.com

SEQUEST

Thermo Electro Co.

Busca em banco de dados

MASCOT

MATRIX SCIENCE HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP | PRODUCTS | SUPPORT

Mascot > MS/MS Ions Search

MASCOT MS/MS Ions Search

| | | | |
|---------------------|--|---|--|
| Your name | <input type="text" value="Marcelo D Cantu"/> | Email | <input type="text" value="marceloc@iqsc.usp.br"/> |
| Search title | <input type="text" value="Citrus Sudden Death Disease"/> | | |
| Database | <input type="text" value="NCBIInr"/> | | |
| Taxonomy | <input type="text" value="... Viridiplantae (Green Plants)"/> | | |
| Enzyme | <input type="text" value="Trypsin"/> | Allow up to | <input type="text" value="1"/> missed cleavages |
| Fixed modifications | <input type="text" value="Biotin (K)"/> <input type="text" value="Biotin (N-term)"/> <input type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/> <input type="text" value="Carbamyl (K)"/> <input type="text" value="Carbamyl (N-term)"/> | Variable modifications | <input type="text" value="Methylthio (C)"/> <input type="text" value="NIPCAM (C)"/> <input type="text" value="Oxidation (M)"/> <input type="text" value="Oxidation (HW)"/> <input type="text" value="Phospho (ST)"/> |
| Protein mass | <input type="text"/> kDa | ICAT | <input type="checkbox"/> |
| Peptide tol. ± | <input type="text" value="0.1"/> Da | MS/MS tol. ± | <input type="text" value="0.3"/> Da |
| Peptide charge | <input type="text" value="1+"/> | Monoisotopic | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/> |
| Data file | <input type="text" value="C:\MALDI-TOF-TOF-spot61.txt"/> <input type="button" value="Browse..."/> | | |
| Data format | <input type="text" value="Mascot generic"/> | Precursor | <input type="text"/> m/z |
| Instrument | <input type="text" value="MALDI-TOF-TOF"/> | | |
| Overview | <input type="checkbox"/> | | |
| | <input type="button" value="Start Search ..."/> | Report top | <input type="text" value="20"/> hits |
| | | <input type="button" value="Reset Form"/> | |

Busca em banco de dados

SEQUEST

Run TurboSequest

Sequest

Protein

Utilities

Microchem

Help

Home

Searchflow: Default, Trypsin, nr (Indexed), 2005-10-03

Load

Cancel

Delete

Directory: Single Multiple

Cantu, M. (M181-GT2_2007) - 07/03/08

Dta Files: All Selected [Select...](#) Clear OUTs?

Database & Enzyme

First: nr.fasta.hdr

Second:

Options: Auto Protein Nucleotide

Enzyme: Trypsin

Cleaves At: Either Ends

Server Options

Sequest Queue: 0 Dir 0 Procs

Priority: 5

Continue: Oper: mdc [Run SEQUEST](#) [Help](#)

Differential Modifications

| Symbol | AA | DiffMass |
|--------|--------|----------|
| * | M | 15.9949 |
| # | C | 57.0214 |
| @ | | 79.9663 |
| ^ | | 31.9898 |
| ~ | | |
| \$ | | |
|] | N-term | |
| [| C-term | |

Options

Edit Add-Mass

Edit Advanced

Parent Mass Type: Mono AvgFragment Mass Type: Mono AvgPeptide Mass Units: amu mmu ppm

Peptide Mass Tolerance: 50 ppm

Fragment Ion Tolerance: 1.0000

Output Lines: 12

Description Lines: 12

Neutral Losses (H₂O/NH₃)

a: b: y:

Ion Series Weightings

a: 0.0 b: 1.0 c: 0.0

d: 0.0 v: 0.0 w: 0.0

x: 0.0 y: 1.0 z: 0.0

Normalize XCorr Values:

Sequence Header Filter:

Partial Sequence:

Use different parameters to continue

Load params from selected directory

[Refresh](#)Show Fragment Ions:

Sistemática da busca empregada tanto
pelo **MASCOT** quanto pelo **SEQUEST**



Sistemática da busca – **Mascot e Sequest**

Peptídeo em estudo

Ex.: _____

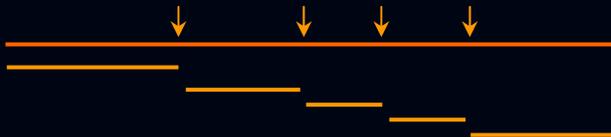
MS - Informações referentes ao peptídeo

✓ *MM (PMF)*

✓ *Espectro de Fragmentação (MS/MS)*

SwissProt, NCBI, MSDB ...

Banco de dados



Digestão teórica (*in silico*) com a enzima escolhida

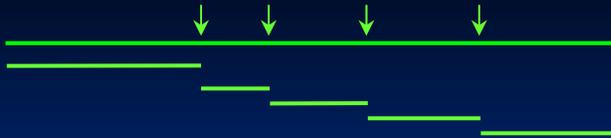


Levando em consideração o erro da medida, a proteína do banco de dados possui algum peptídeo com a mesma MM do peptídeo em estudo?

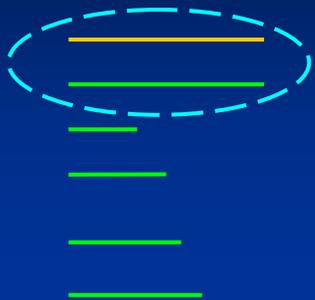
NÃO



Testar próxima proteína!!!



Digestão teórica (*in silico*) com a enzima escolhida

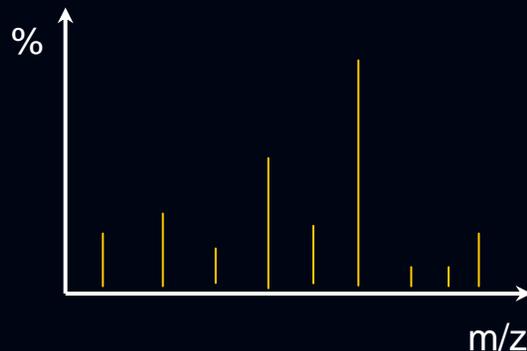


Levando em consideração o erro da medida, a proteína do banco de dados possui algum peptídeo com a mesma MW do peptídeo em estudo?

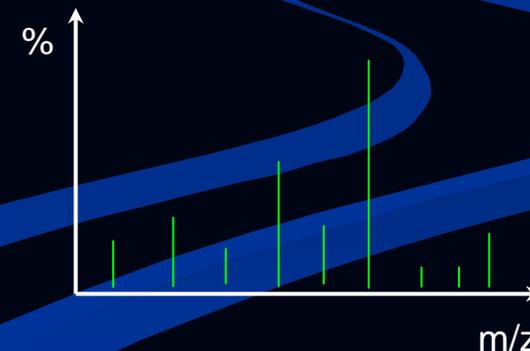
SIM !!!

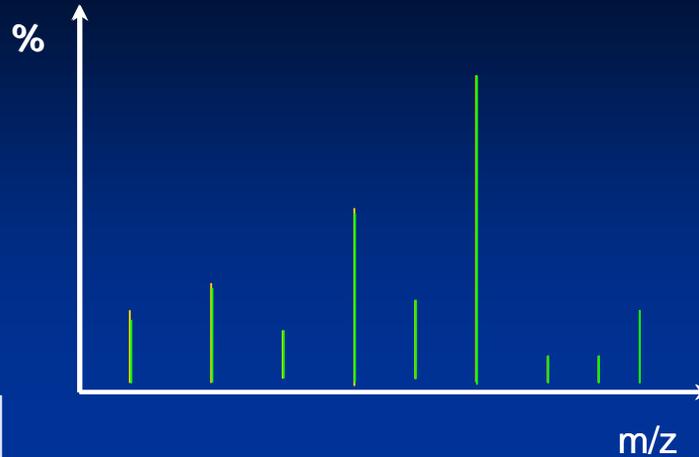
Comparação dos espectros de MS/MS:

Experimental



Teórico





“Ranking” dos resultados

MASCOT

www.matrixscience.com

Sequest

Thermo Electro Co.

Score = - log P

onde P é a probabilidade de que um match ocorra ao acaso

Xcorr = cross correlation value

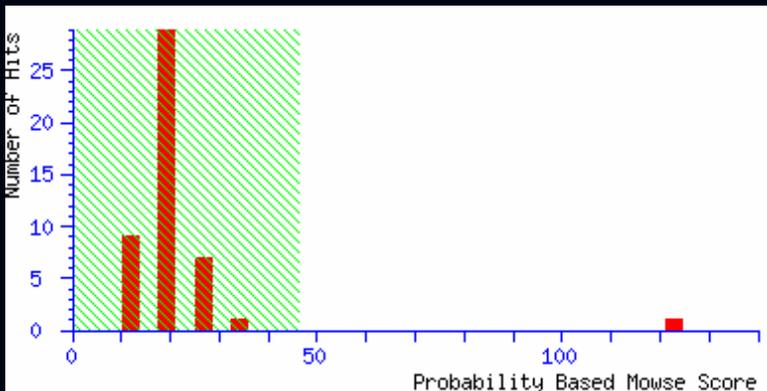
ΔCn = indica a diferença entre o primeiro e os demais “matches”

Xcorr > 3,75 (+3)

Xcorr > 2,20 (+2)

ΔCn > 0,10

Xcorr > 1,90 (+1)



Se o score de um particular match exceder o valor limite, a chance de que esse match tenha ocorrido ao acaso é inferior a 5%

Sequest Summary

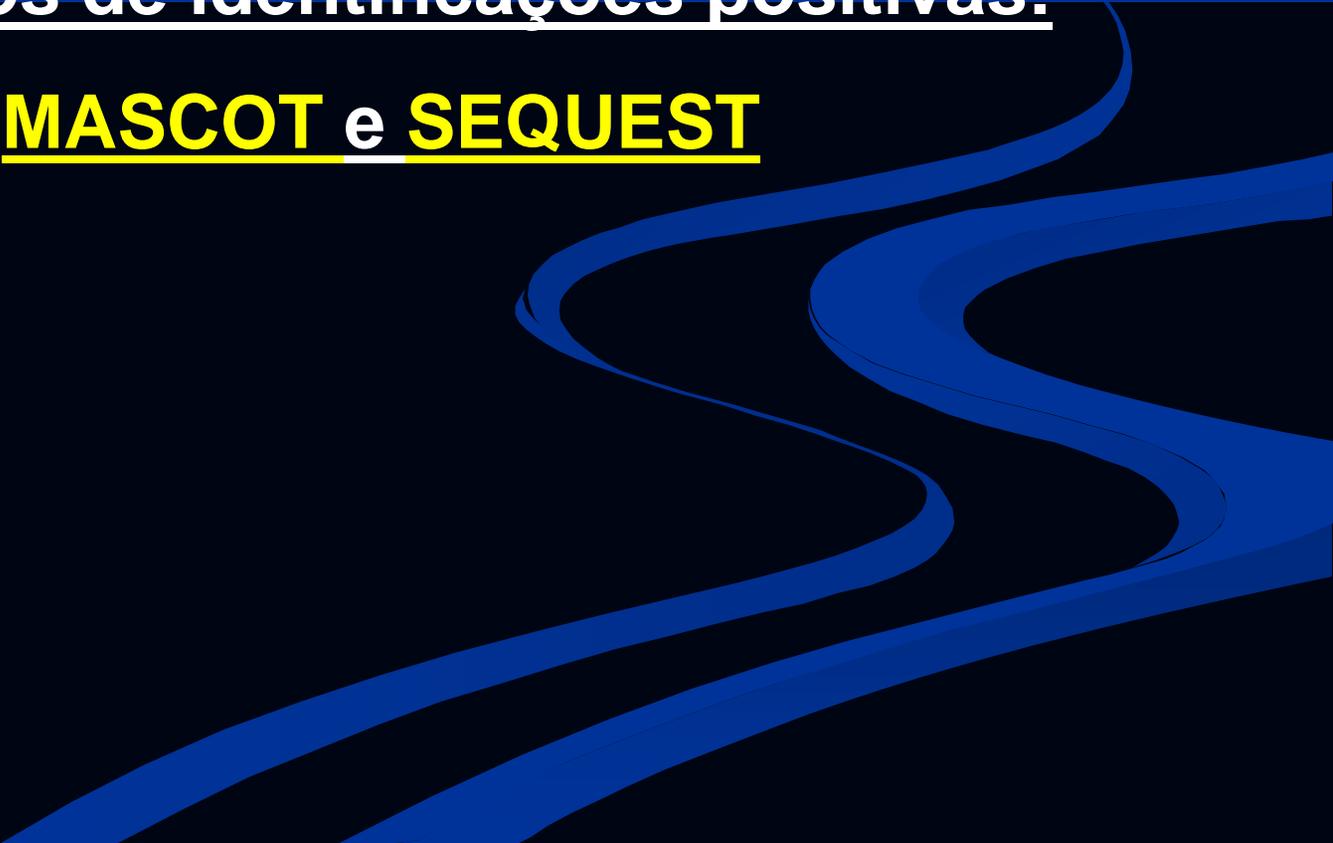
Sample: [Cantun_M \(M168-GT\) 25352](#) mdc
 OutFiles: [14441202](#)
 DataFiles: [M168-GT \(01/19/06-01/19/06\)](#)
 Database: [nr \(turbo\) \(03/16/2006\)](#) 7.19.135
 Directory: [mcanburn168-gt](#) Info 26K [Citrus spp.](#)
 Diff Mods: [M*+15.99491](#)
 Enzyme: [Trypsin](#)
 Mass: [±2.5000 \(Mono\)](#)
 Max list: [113](#)
 Intensity: [9,0e6](#) MS2

Avg ppm: 1.09±0.00 Of: -1.09 Recal: 0.0 amu ppm Filter: Last: Se Va Hide duplicates Depth: 2 XML

| # | TIC | Scan | RT | z | ppm | MH+ | xC | dCn | Sp | RSp | Ions | Sf | P | Sel | Ref | Sequence | Consensus |
|------|-------|---------------------------|-------|---|---------|-----------|------|------|------|-----|-----------------------|------|----|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| 413 | 8.8e4 | 3940-3991 | 24.12 | 3 | -288.9 | 1628.3611 | 5.14 | 0.25 | 1633 | 3 | 30/56 | 0.94 | 59 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 399 | 1.5e5 | 3901-4277 | 24.91 | 2 | -631.8 | 1628.9200 | 4.07 | 0.31 | 1573 | 1 | 19/28 | 0.92 | 29 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 816 | 4.9e3 | 4803 | 29.49 | 2 | -75.5 | 1260.7900 | 3.40 | 0.16 | 1490 | 6 | 16/20 | 0.88 | 32 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)AVEGLFQALNK(V) |
| 847 | 2.3e4 | 4865-5000 | 30.31 | 3 | -1921.8 | 1263.1261 | 4.07 | 0.10 | 1453 | 43 | 25/40 | 0.85 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)AVEGLFQALNK(V) |
| 1418 | 2.4e3 | 7183 | 44.68 | 2 | -139.5 | 1459.0200 | 3.16 | 0.15 | 574 | 1 | 17/26 | 0.65 | 73 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)YDVTYVQLGAIK(F) |
| 1395 | 2.0e3 | 5534 | 40.51 | 2 | 657.4 | 1628.8200 | 3.06 | 0.28 | 570 | 2 | 15/28 | 0.62 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 1313 | 2.8e3 | 5874 | 36.28 | 2 | -618.7 | 1459.7200 | 3.03 | 0.31 | 436 | 23 | 13/26 | 0.51 | 1 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)YDVTYVQLGAIK(F) |
| 533 | 4.7e3 | 4245 | 25.92 | 3 | -650.2 | 1628.9506 | 3.08 | 0.12 | 729 | 40 | 23/56 | 0.45 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 1427 | 2.1e3 | 7969 | 49.74 | 2 | -762.3 | 1459.9300 | 3.00 | 0.06 | 556 | 39 | 19/26 | 0.43 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)YDVTYVQLGAIK(F) |
| 691 | 2.6e3 | 4571 | 28.01 | 2 | -128.8 | 1628.1000 | 2.77 | 0.14 | 452 | 3 | 14/28 | 0.38 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 1498 | 3.5e3 | 5023 | 50.09 | 2 | -289.4 | 1261.0600 | 2.19 | 0.04 | 202 | 29 | 15/20 | 0.32 | 4 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)AVEGLFQALNK(V) |
| 869 | 3.2e3 | 4898 | 30.10 | 2 | -840.3 | 1629.2600 | 2.55 | 0.16 | 399 | 5 | 13/28 | 0.28 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |
| 1353 | 4.1e3 | 8020 | 37.21 | 2 | -1421.1 | 1630.2900 | 1.90 | 0.00 | 245 | 50 | 14/28 | 0.08 | 0 | <input checked="" type="checkbox"/> | gi 77417715 | +19 | (K)LVVETIANQDPLVTK(G) |

Exemplos de identificações positivas:

MASCOT e SEQUEST



Identificação das proteínas – MALDI-TOF-TOF (MASCOT)

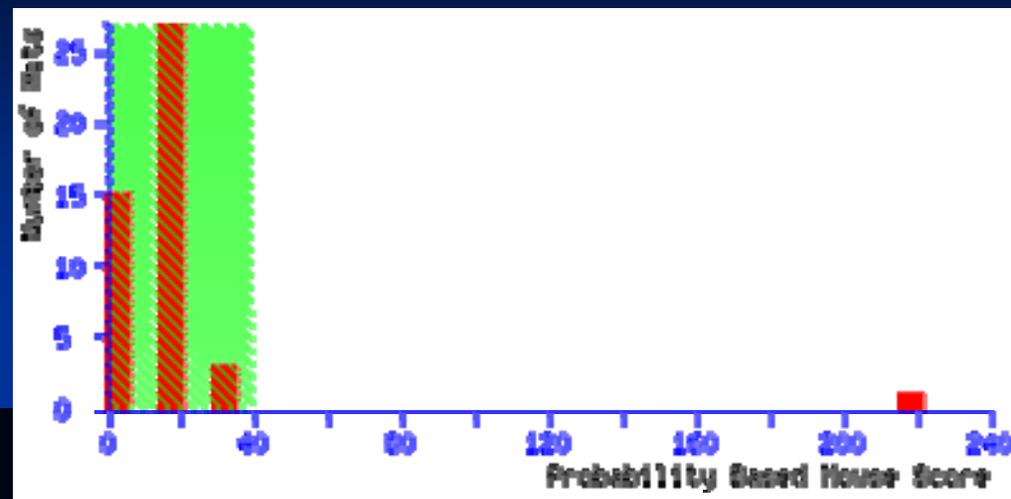
peptídeos identificados

NELCPLDVQLSSDSER

TSIINEDVDLNR

WFITGGVEGNPGAQTLK

ALAVVLVPGNER



Proteína putativa similar a miraculina 2 (ABL67650)

1 MSTPFVTAIS FLLTFATKP LVGLADPLVD VNGNKVEASR DYYLVSAIRG

51 AGGGGLTLFR GRNELCPLDV VQLSSDSERG TRLRFSMSDK TSIINEDVDL

101 NVRFSTETRC NEPTVWRVDS YDPSRGKWFI TTGGVEGNPG AQTLKNWFKF

151 ERIGRDRATY KIVHCPSVCE SCVSLCNDVG VSNDHARRLA LTNGRALAVV

201 LVPGNERSAS CAS

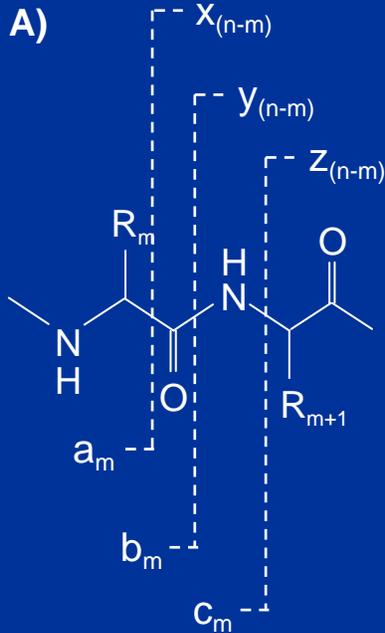
Cobertura: 28%

| | pI | MM (kDa) |
|--------------|-------|----------|
| experimental | 7 - 9 | ≈ 20 |
| teórico | 8,18 | 23,2 |

**Fragmentação de peptídeos por espectrometria
de massas: É indispensável compreender**

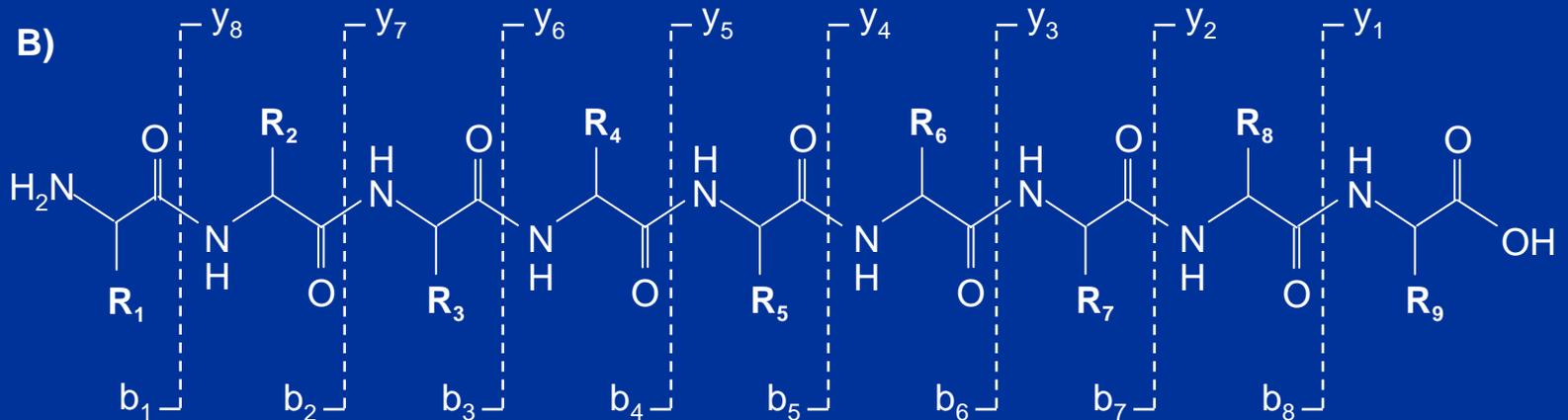
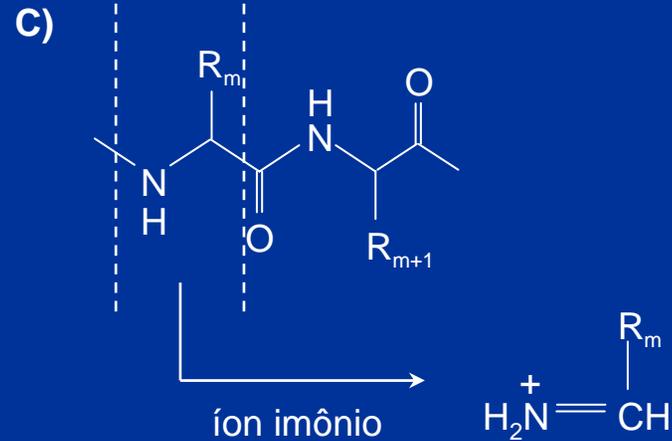


NOMENCLATURA: Roepstorff–Fohlmann–Biemann



n: número total de resíduos no peptídeo

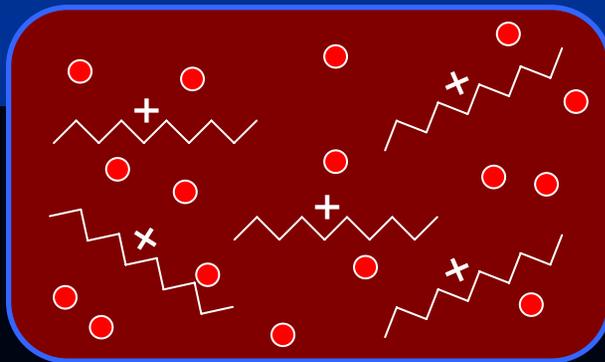
m: número de resíduos correspondentes aos íons a, b ou c



Métodos de ionização mais comumente usados em MS

Collision Activation Dissociation (CAD)

Collision Induced Dissociation (CID)



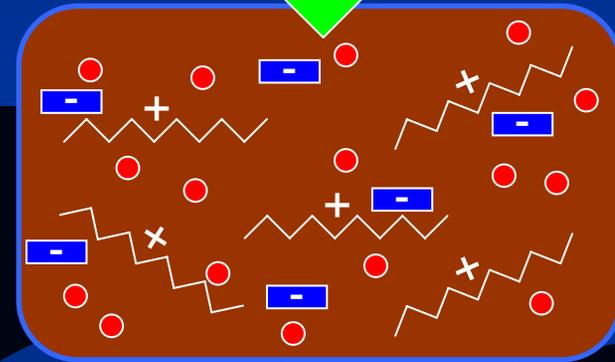
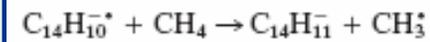
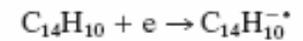
● collision gas

Formação de íons **b** e **y**

Electron Transfer Dissociation (ETD)

Fonte Cl

antraceno



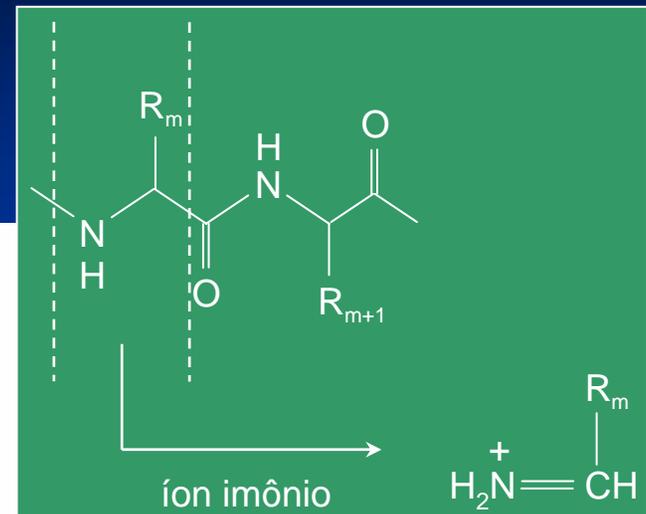
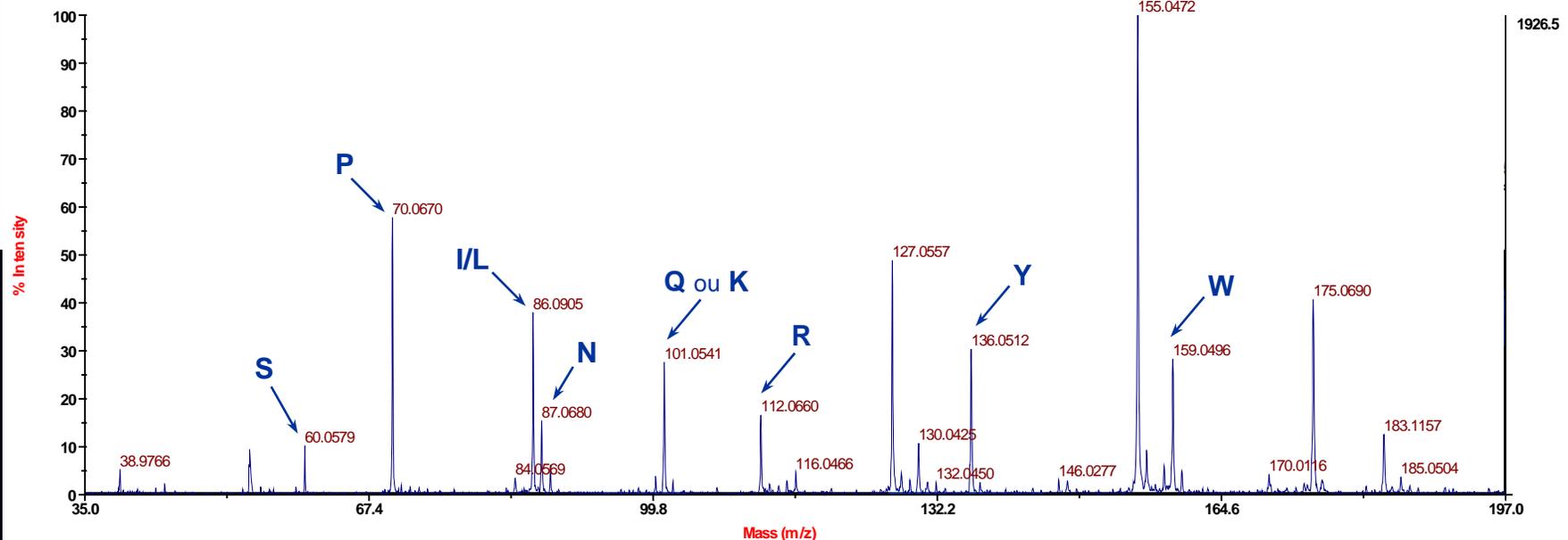
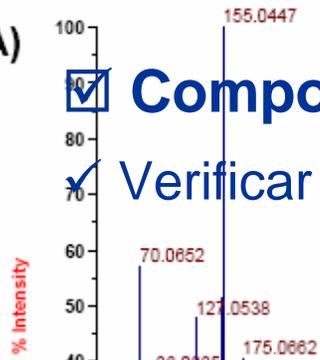
Formação de íons **c** e **z**



Interpretação de espectros – Regras básicas

Exemplo de um espectro obtido em um instrumento do tipo **TOF/TOF**

- A)
- Composição de aminoácidos
 - Verificar a presença dos íons imônio

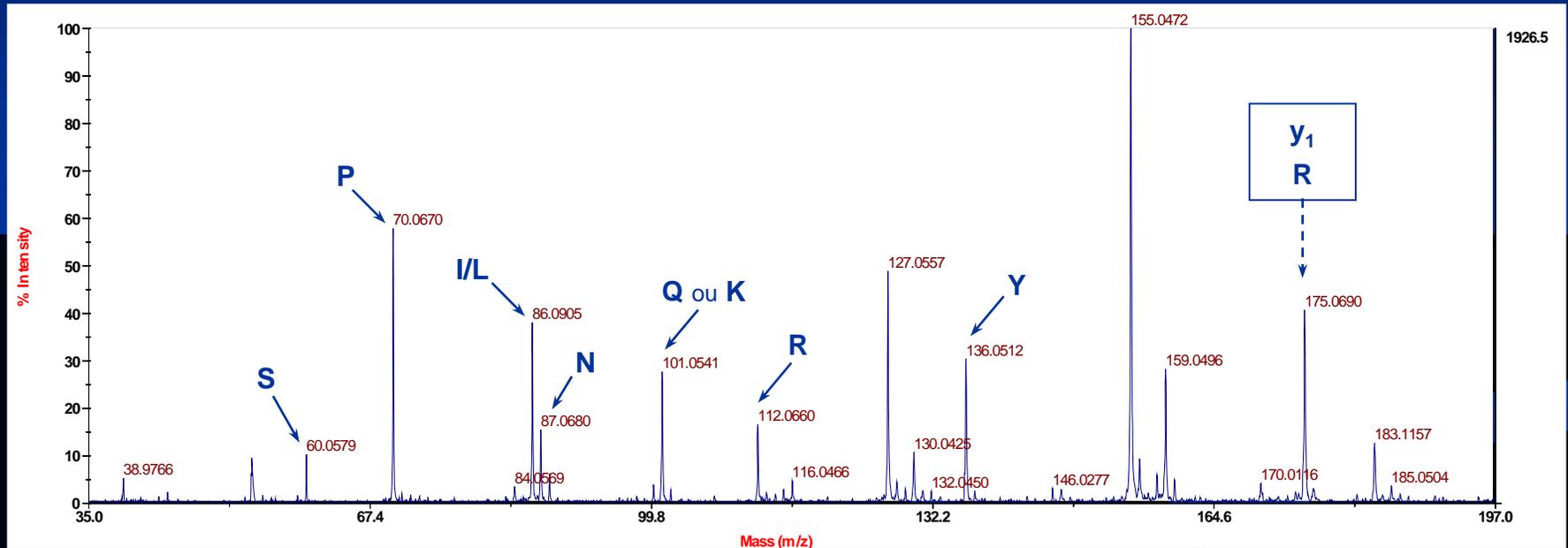


1657.3

0

☑ Determinação do aminoácido presente na posição C-terminal

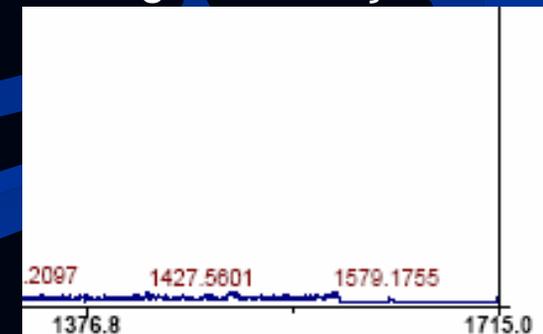
✓ Se os peptídeos a serem sequenciados são oriundos de digestão triptica, verificar a existência dos íons diagnóstico y_1 : 147 para K ou 175 para R.



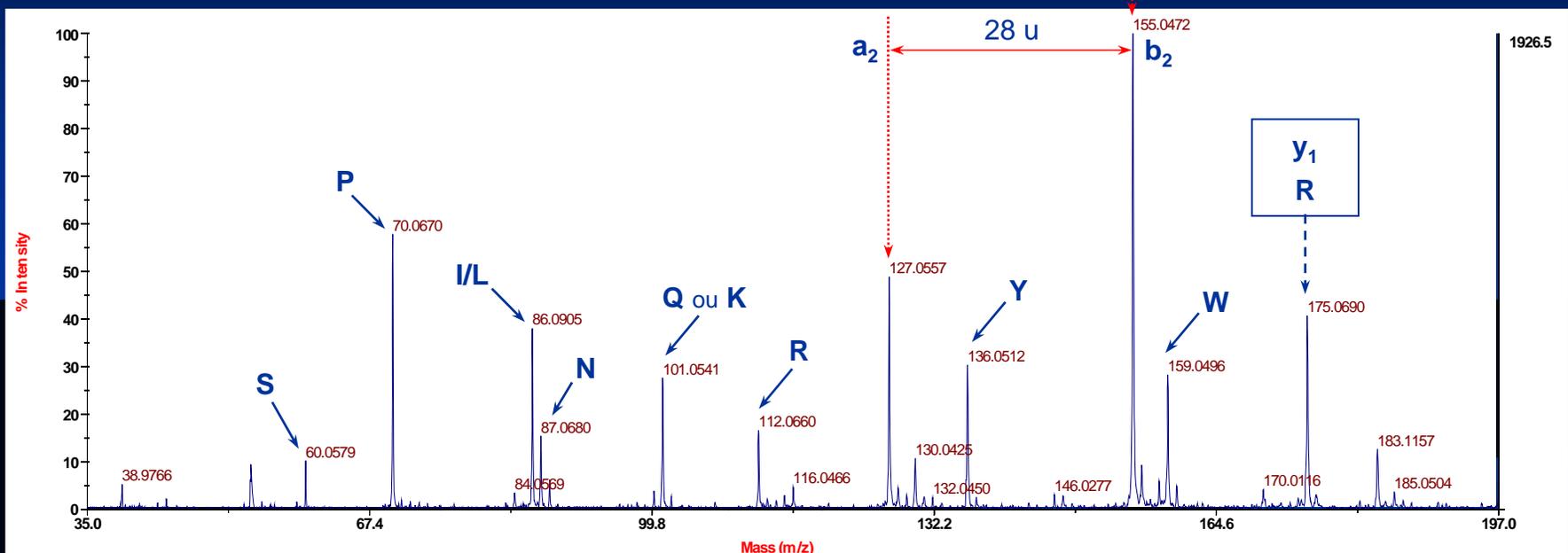
Um vez verificada a presença de um destes íons (y_1), determinar o correspondente íon b_{n-1} (na região de alta massa) por meio da seguinte relação:

$$b_{n-1} = (M+H)^{1+} - y_1 + 1$$

$$b_{n-1} = 1623,7 - 175 + 1 = 1449,7$$



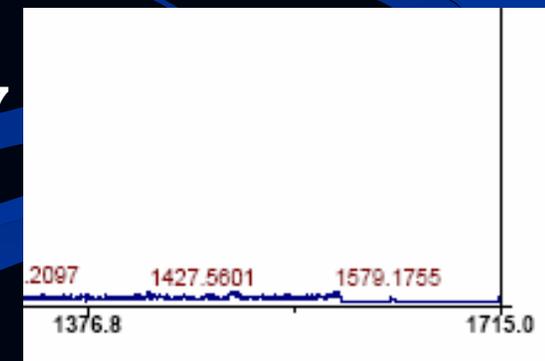
✓ Verificar / confirmar a presença do íon b_2 . Geralmente esses íons podem ser identificados por meio da seguinte razão: íon b_2 / íon a_2 separados por 28 Da.



Novamente, uma vez encontrada a razão m/z do íon b_2 , esta é usada para calcular a m/z do correspondente íon y_{n-2} fazendo uso da relação:

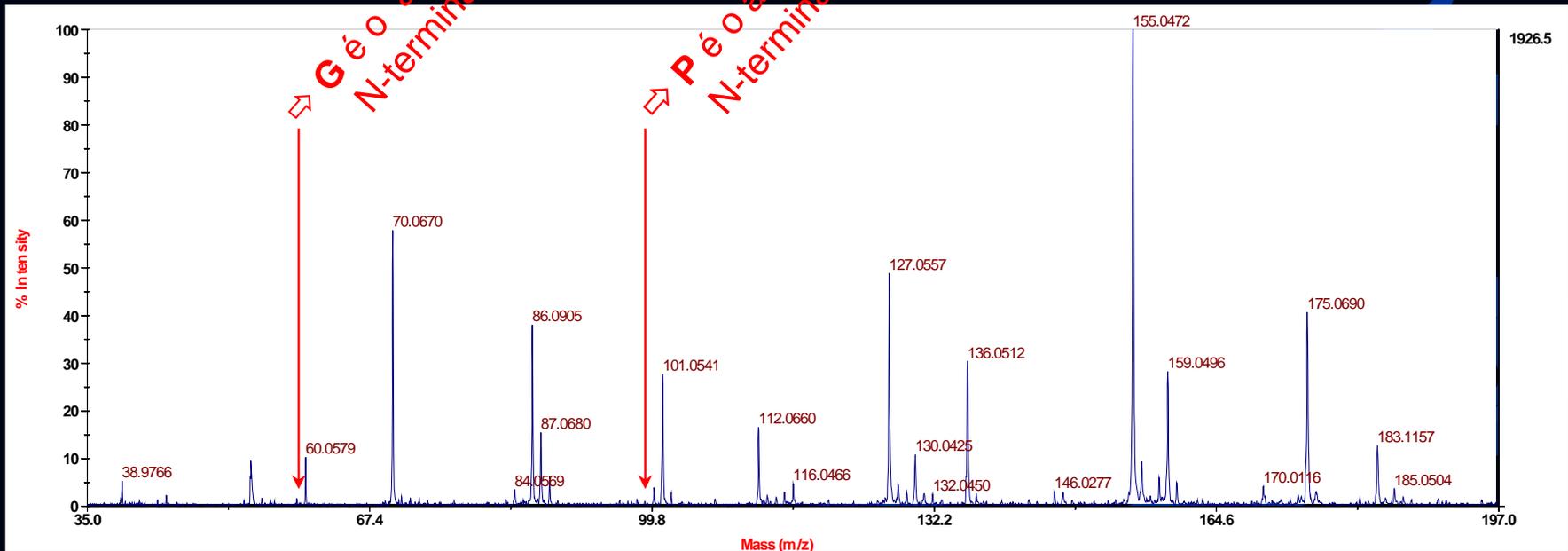
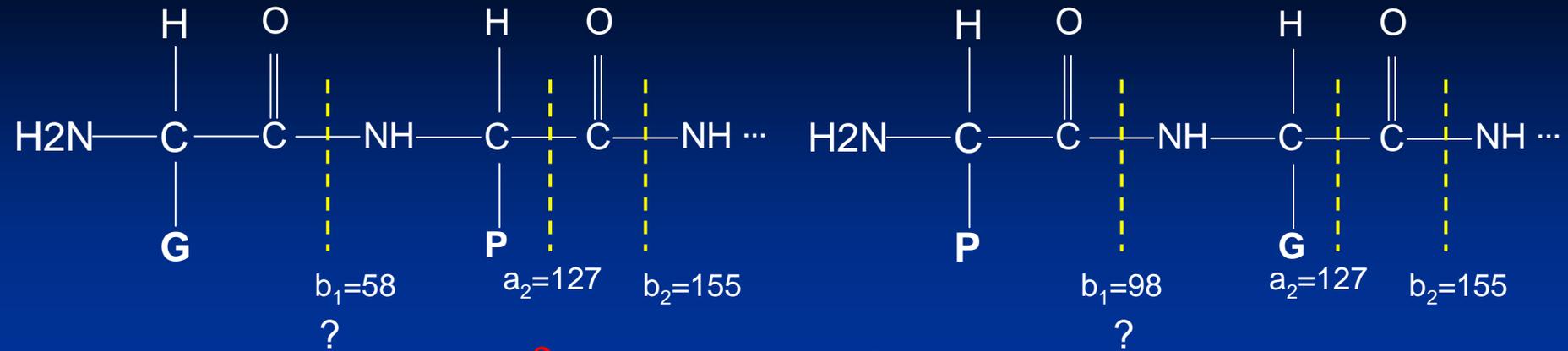
$$y_{n-2} = (M+H)^{1+} - b_2 + 1$$

$$y_{n-2} = 1623,7 - 155,05 + 1 = 1469,7$$



Lista de dipetídeos – determinação de íons b2.

| | | G | A | S | P | V | T | C | I/L | N | D | Q/K | E | M | H | F/M* | R | C** | Y | W |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| | | 57 | 71 | 87 | 97 | 99 | 101 | 103 | 113 | 114 | 115 | 128 | 129 | 131 | 137 | 147 | 156 | 161 | 163 | 186 |
| G | 57 | 114 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 71 | 129 | 143 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S | 87 | 145 | 159 | 175 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P | 97 | 155 | 169 | 185 | 195 | | | | | | | | | | | | | | | |
| V | 99 | 157 | 171 | 187 | 197 | 199 | | | | | | | | | | | | | | |
| T | 101 | 159 | 173 | 189 | 199 | 201 | 203 | | | | | | | | | | | | | |
| C | 103 | 161 | 175 | 191 | 201 | 203 | 205 | 207 | | | | | | | | | | | | |
| I/L | 113 | 171 | 185 | 201 | 211 | 213 | 215 | 217 | 227 | | | | | | | | | | | |
| N | 114 | 172 | 186 | 202 | 212 | 214 | 216 | 218 | 228 | 229 | | | | | | | | | | |
| D | 115 | 173 | 187 | 203 | 213 | 215 | 217 | 219 | 229 | 230 | 231 | | | | | | | | | |
| Q/K | 128 | 186 | 200 | 216 | 226 | 228 | 230 | 232 | 242 | 243 | 244 | 257 | | | | | | | | |
| E | 129 | 187 | 201 | 217 | 227 | 229 | 231 | 233 | 243 | 244 | 245 | 258 | 259 | | | | | | | |
| M | 131 | 189 | 203 | 219 | 229 | 231 | 233 | 235 | 245 | 246 | 247 | 260 | 261 | 263 | | | | | | |
| H | 137 | 195 | 209 | 225 | 235 | 237 | 239 | 241 | 251 | 252 | 253 | 266 | 267 | 269 | 275 | | | | | |
| F/M* | 147 | 205 | 219 | 235 | 245 | 247 | 249 | 251 | 261 | 262 | 263 | 276 | 277 | 279 | 285 | 295 | | | | |
| R | 156 | 214 | 228 | 244 | 254 | 256 | 258 | 260 | 270 | 271 | 272 | 285 | 286 | 288 | 294 | 304 | 313 | | | |
| C** | 161 | 219 | 233 | 249 | 259 | 261 | 263 | 265 | 275 | 276 | 277 | 290 | 291 | 293 | 299 | 309 | 318 | 323 | | |
| Y | 163 | 221 | 235 | 251 | 261 | 263 | 265 | 267 | 277 | 278 | 279 | 292 | 293 | 295 | 301 | 311 | 320 | 325 | 327 | |
| W | 186 | 244 | 258 | 274 | 284 | 286 | 288 | 290 | 300 | 301 | 302 | 315 | 316 | 318 | 324 | 334 | 343 | 348 | 350 | 361 |



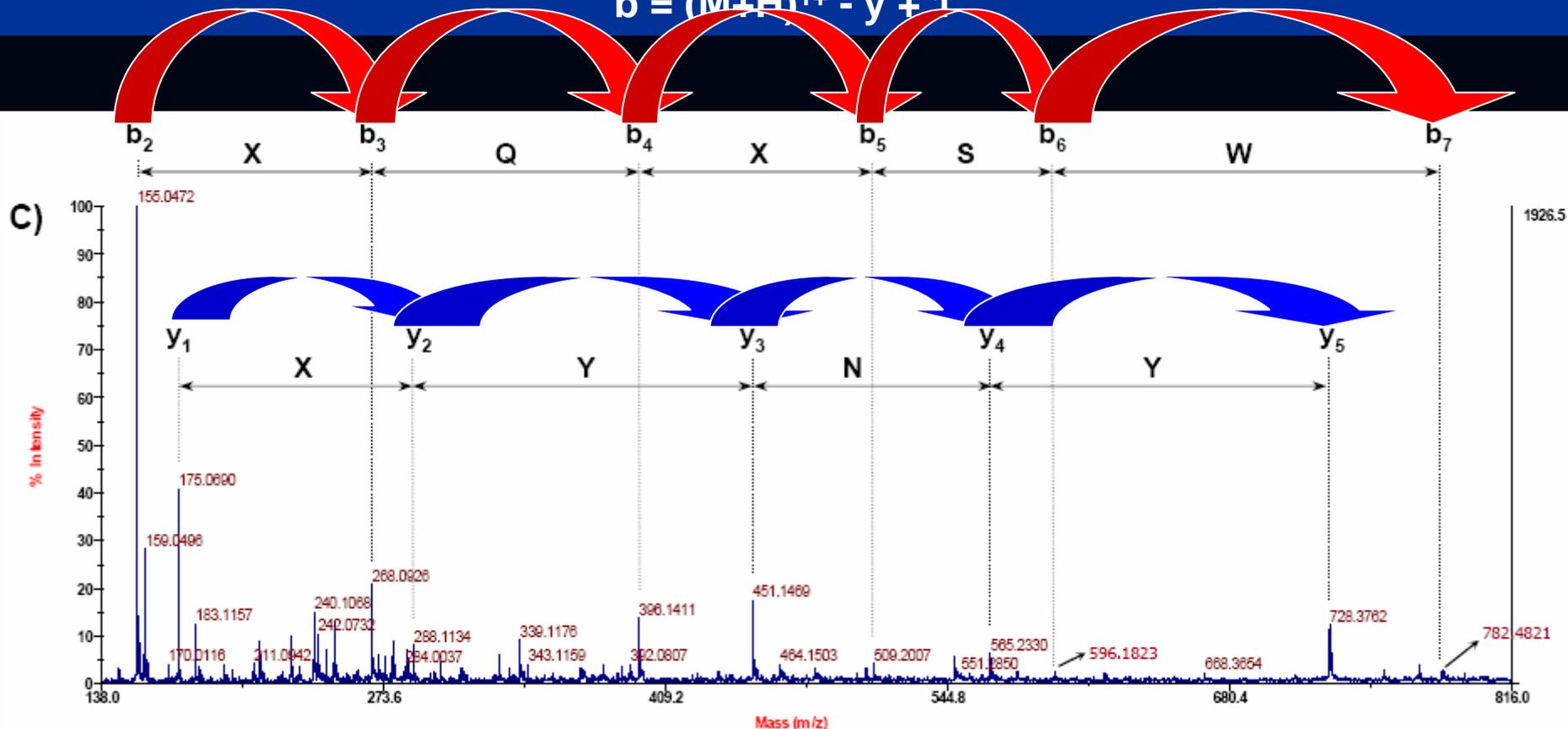
Impossível concluir!!!!

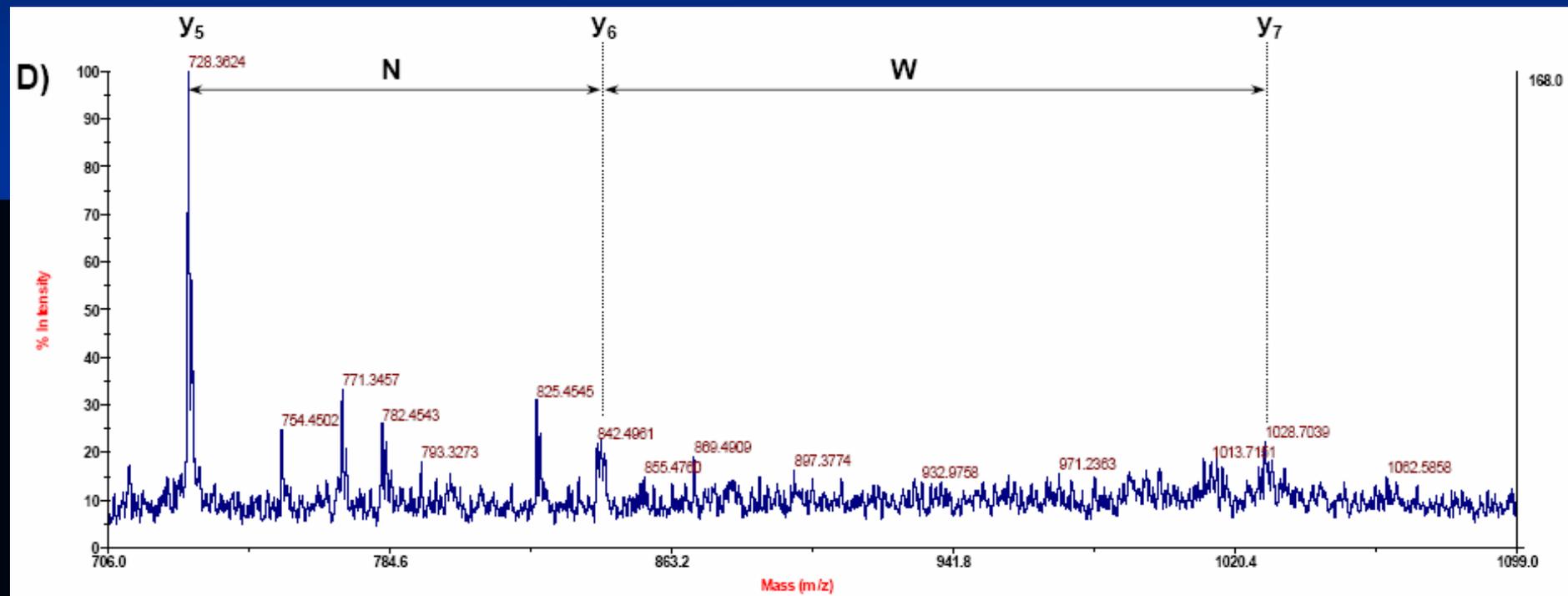
✓ Estender as sequências de íons **b** ou **y**. Basta acrescentar ou subtrair (dependendo da massa do íon em questão) a massa dos resíduos de aminoácidos sucessivamente a partir da **G** até o **W**.

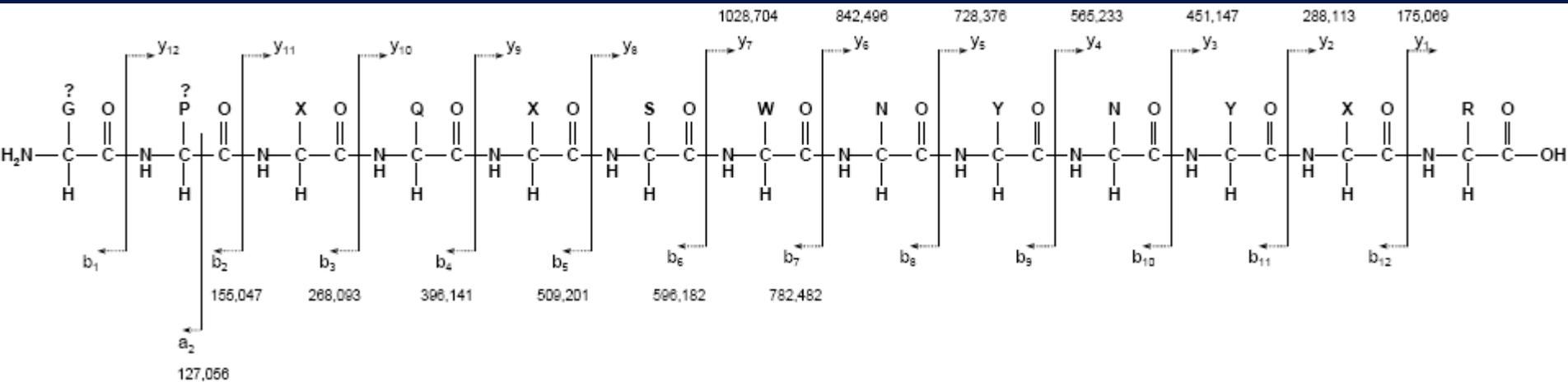
Uma vez determinada a massa de um íon **b** ou **y**, o correspondente íon **y** ou **b** pode ser calculado usando as seguintes relações gerais:

$$y = (M+H)^{1+} - b + 1$$

$$b = (M+H)^{1+} - y + 1$$



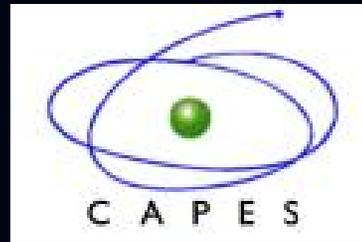




GPXQXSWNYNYXR

PGXQXSWNYNYXR

AGRADECIMENTOS



Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

OBRIGADO!!!

TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PARASITAS UTILIZADAS NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

Profa. Dra. Semíramis Guimarães F. Viana



Depto. de Parasitologia

IBB/Unesp/Botucatu

Século XXI



Doenças parasitárias



Altas taxas de morbidade

Importância das doenças parasitárias no contexto da produção animal e na Saúde Pública

Relação parasita-hospedeiro

Mecanismos???

Relação parasita-hospedeiro

Trypanosoma cruzi

Plasmodium spp

Toxoplasma gondii

Leishmania spp

Entamoeba histolytica

Schistosoma mansoni

Boophilus microplus



Relação parasita-hospedeiro

PROTEÍNAS

Ciclo evolutivo

Patogênese

Relação parasita-hospedeiro

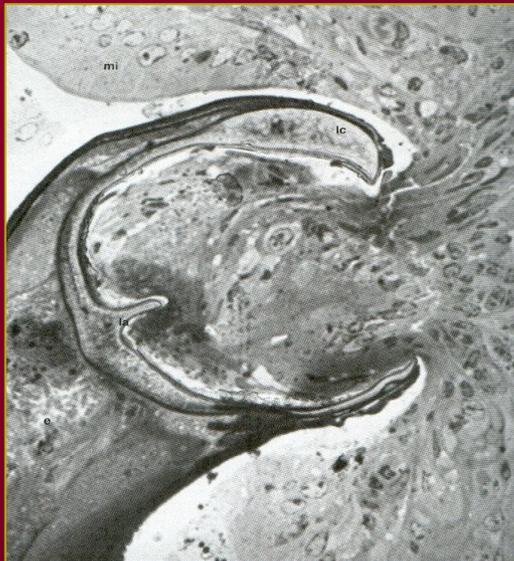


PROTEASES

PROTEASES

✓ Invasão tissular e celular

✓ Metabolismo



✓ **Imuno-evasão
e
modulação da resposta imune**

✓ **Virulência e patogenicidade**

✓ **Multiplicação e diferenciação**

PROTEASES

Imunogênicas

Ciclo de vida

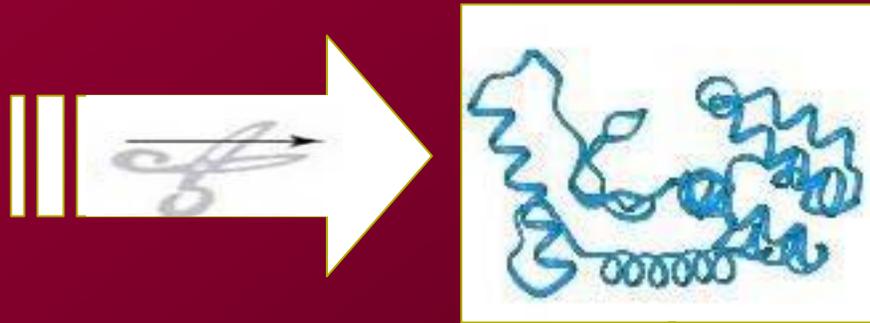
Diagnóstico

Vacinas

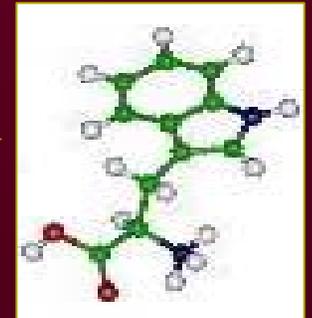
Antiparasitários

PROTEASES - PEPTIDASES ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

PROTEASES



Peptídeo



Aminoácido

PROTEASES

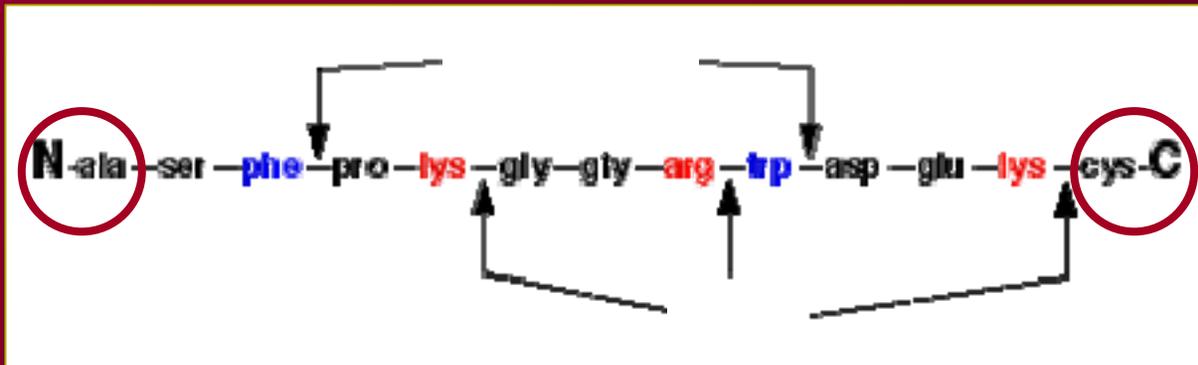
(EC 3.4.-.-) *

ENDOPEPTIDASES

(EC 3.4.11)

EXOPEPTIDASES

(EC 3.4.21)



* Enzyme Comission (International Union of Biochemistry)

ENDOPEPTIDASES

Cisteína-proteases*
(EC 3.4.22)

Serina-proteases*
(EC 3.4.21)

Metallo-proteases*
(EC 3.4.24)

Aspartil proteases
(EC 3.4.23)

Treonina
Ácido glutâmico

Cisteína-proteases

Serina-proteases



Metallo-proteases

Aspartil proteases

**Plasmodium spp*

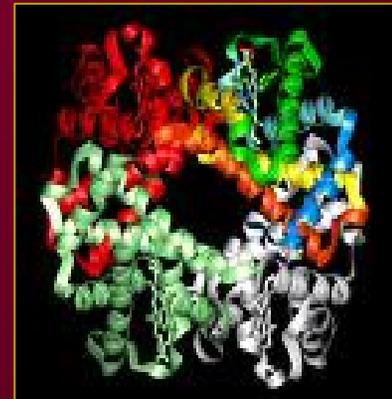
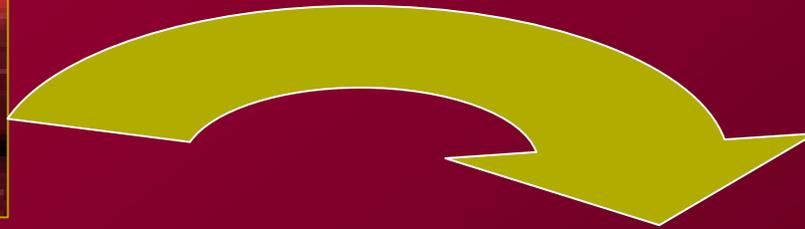


**Plasmodium spp*

**Aspartil proteases
(plasmepsinas)**

**Cisteína-protease
(falcipaína)**

**Metallo-protease
(falcilisina)**



Hemoglobina

MÉTODOS ???



PROTEASES



Técnicas convencionais

X

Técnicas de última geração

✓ **Objetivo(s) do estudo**

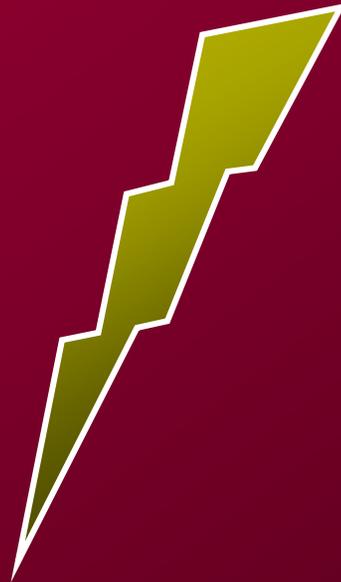
✓ **Características físico-químicas**

✓ **Características biológicas**

✓ **Grau de aprofundamento**

Obtenção das proteases

Mudanças
Físico-químicas



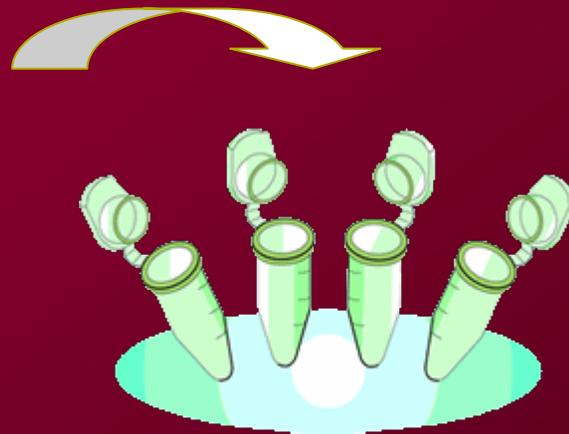
Natureza
Estabilidade (°C, pH)

PROTEASES
(Atividade)

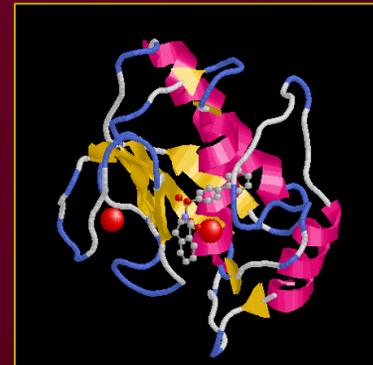
Preparações complexas



Proteases purificadas



Troca iônica
Gel de filtração
Afinidade



Preparações dos parasitas

Preparações complexas Proteases purificadas

Extratos totais

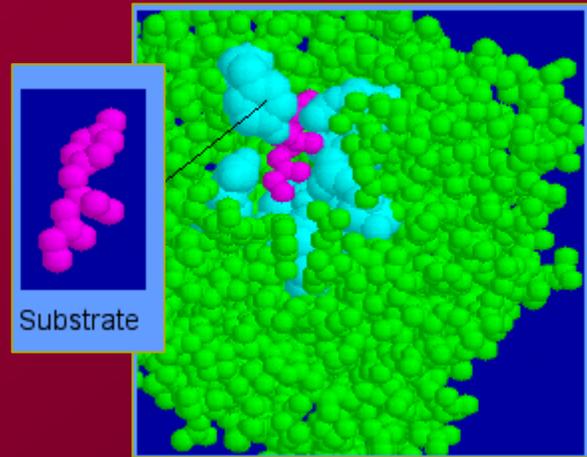
Proteínas de membrana plasmática

Proteínas citoplasmáticas

Produtos de excreção/secreção*

Rendimento

Escolha dos substratos



**Atividade
proteolítica**

Preparações complexas

Proteases purificadas

Atividade proteolítica

Ensaio – substratos protéicos

Ensaio – substratos sintéticos

PROTEASES

Preparações complexas*

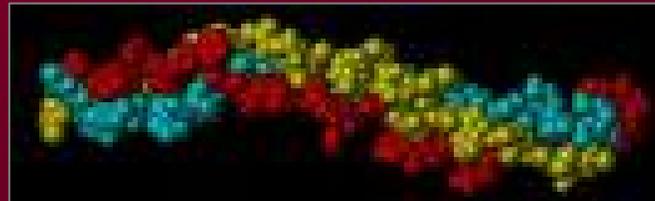
Proteases purificadas



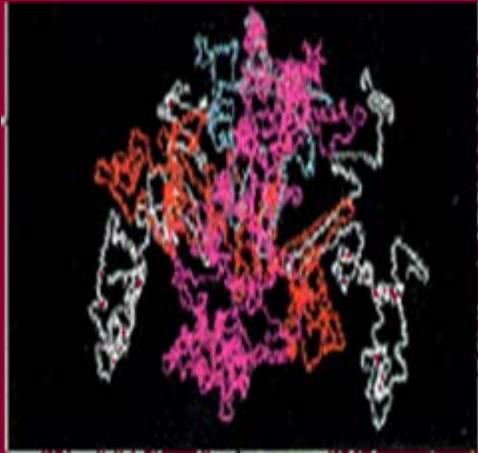
Substratos protéicos



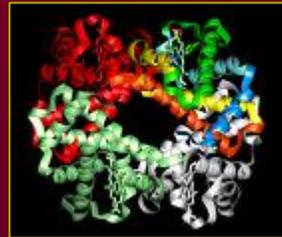
Gelatina



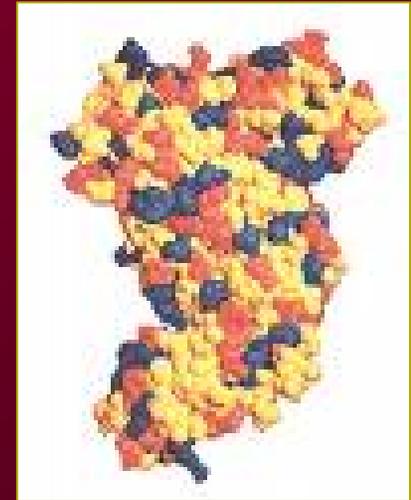
PROTEASES



Caseína



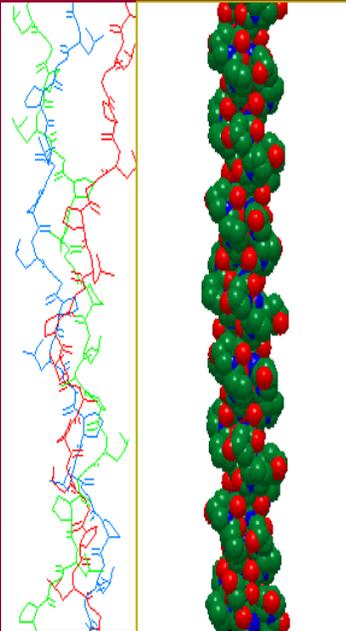
Hemoglobina



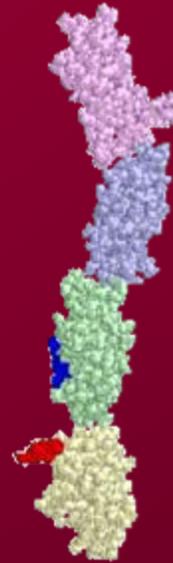
BSA

* Especificidade

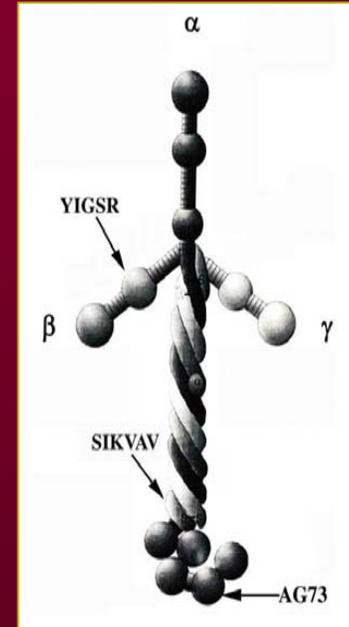
PROTEASES



Colágeno



Fibronectina



Laminina

Schistosoma mansoni (cercárias)
Haemonchus contortus (vermes adultos)
Larvas de dípteros causadoras de miasas

PROTEASES

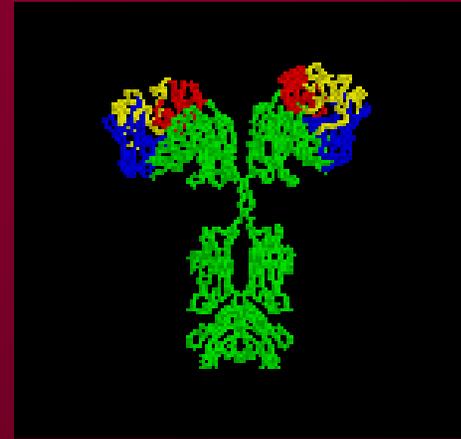


Hemoglobina

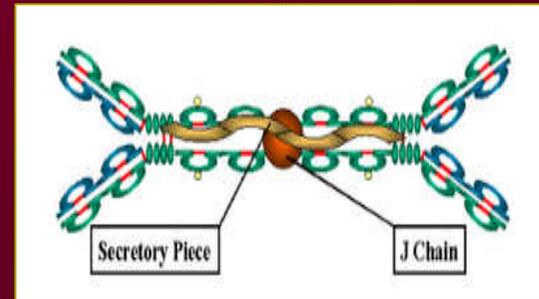
Haemonchus contortus

Schistosoma mansoni

Plasmodium spp



IgG



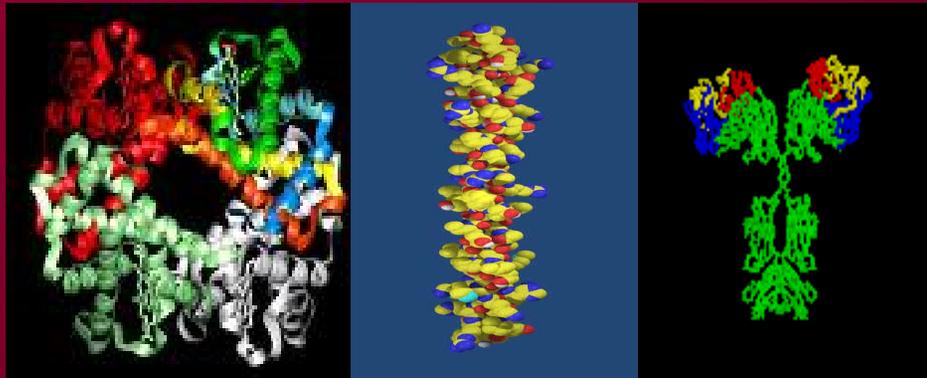
IgA



PROTEASES



"in vitro"



"in vivo"

Relação parasita-hospedeiro

PROTEASES

Preparações complexas

Proteases purificadas*



Substratos sintéticos



Investigar a especificidade

Procedimentos de purificação

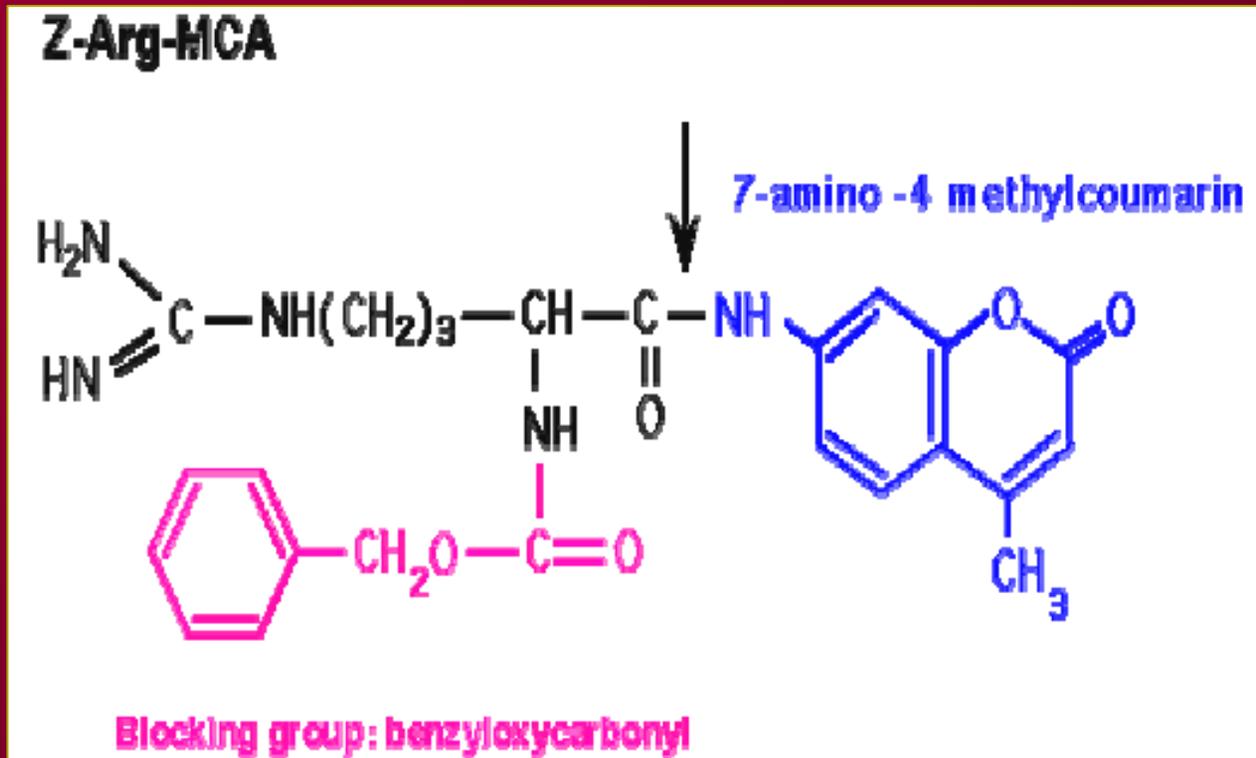
Interação protease - inibidor

Quantificar a atividade hidrolítica

Caracterização quanto às classes

P- nitroalinida

Bapna



Ensaio para a detecção das proteases dos parasitas

Avaliar a atividade enzimática

Detecção eletroforética das proteases

Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

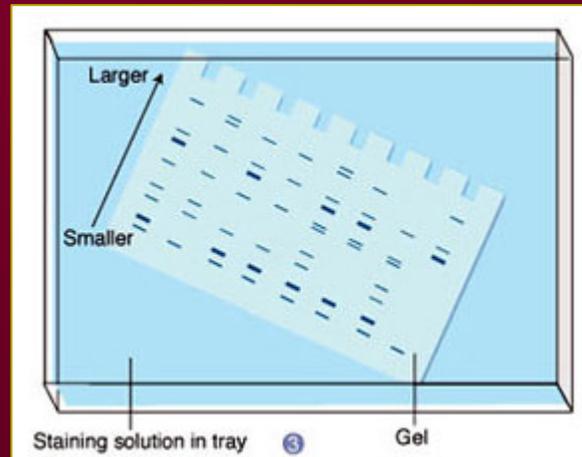
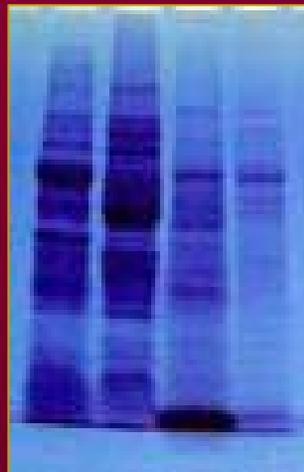
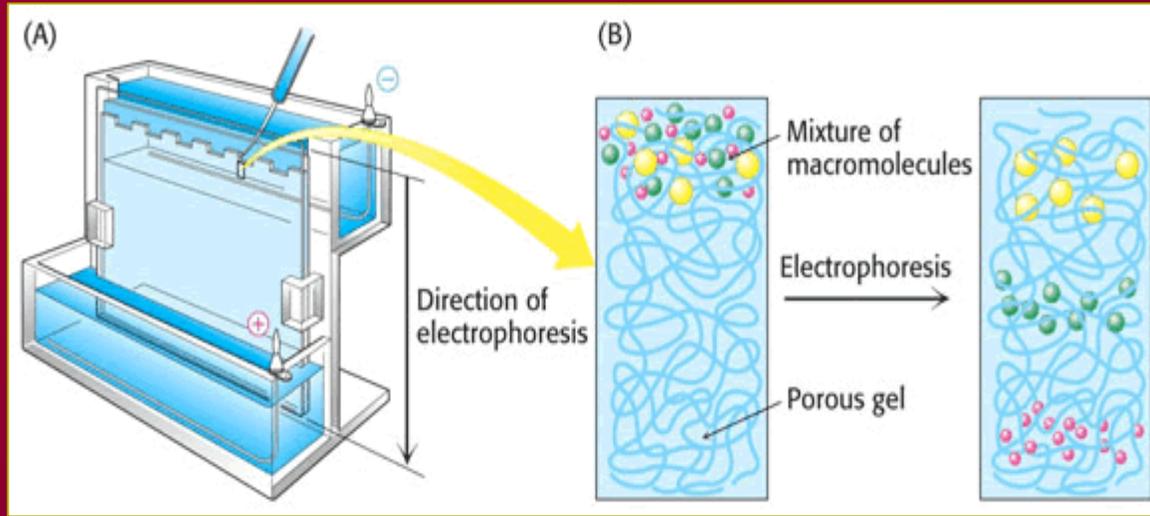
SDS-PAGE

Tiselius, 1937

Raymond & Weintraub, 1959

Laemmli, 1970

SDS-PAGE



Detecção em gel contendo substrato

SDS-PAGE-Substrate

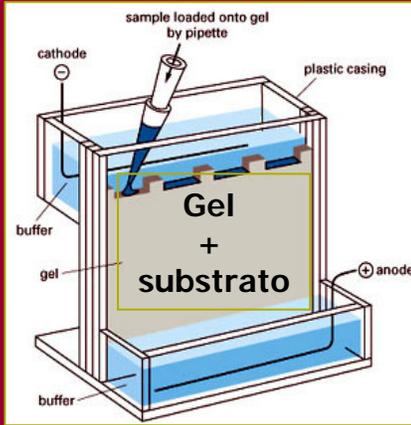
(HEUSSEN & DOWDLE, 1980)

Atividade proteolítica

Preparações complexas Proteases purificadas

Condições nativas

Levemente desnaturantes



Gelatina
Caseína
BSA

Colágeno
Laminina
Fibronectina

Hemoglobina
Imunoglobulinas



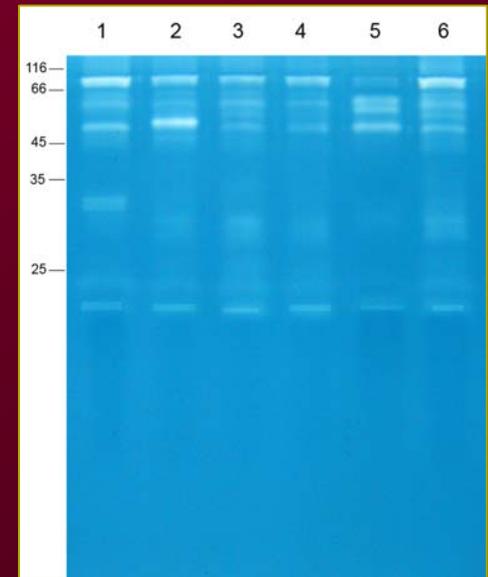
GEL
+
TRITON X-100



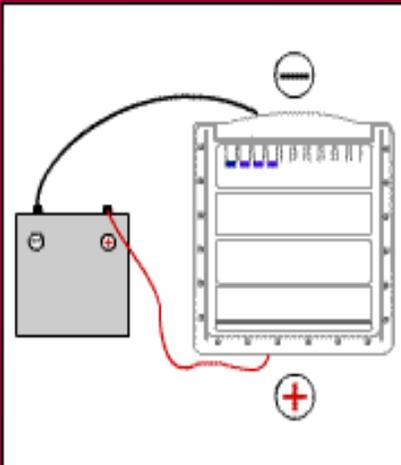
GEL
TAMPÃO DE ATIVAÇÃO (pH)
AGENTE REDUTOR
°C

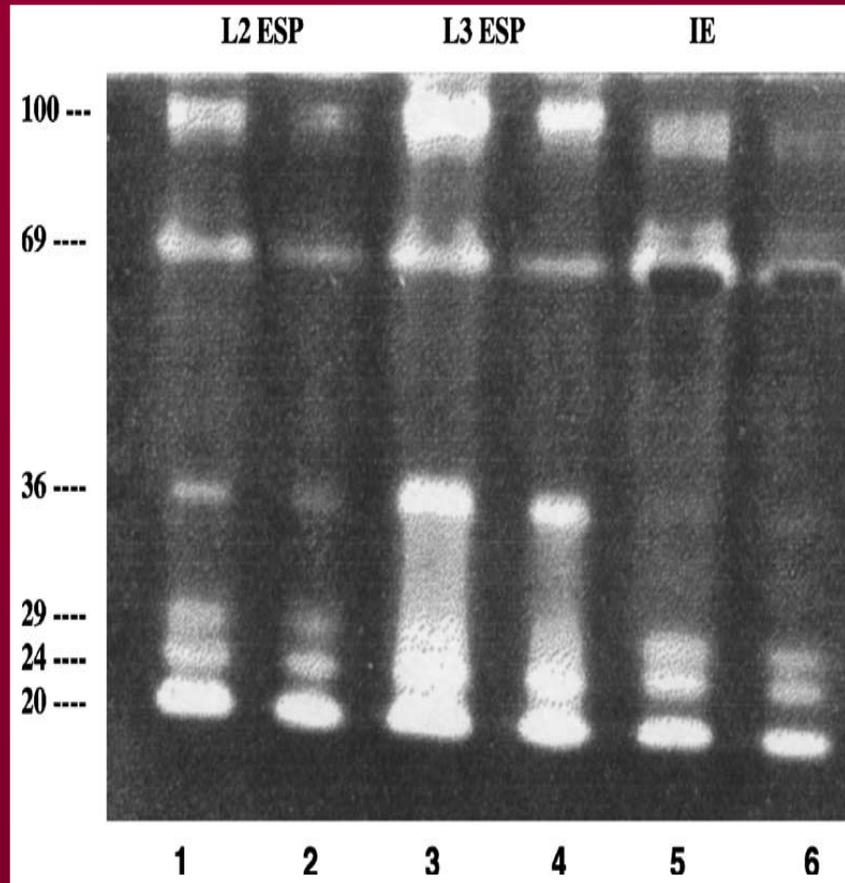


Zimograma



Azul de Coomassie
Amido Black

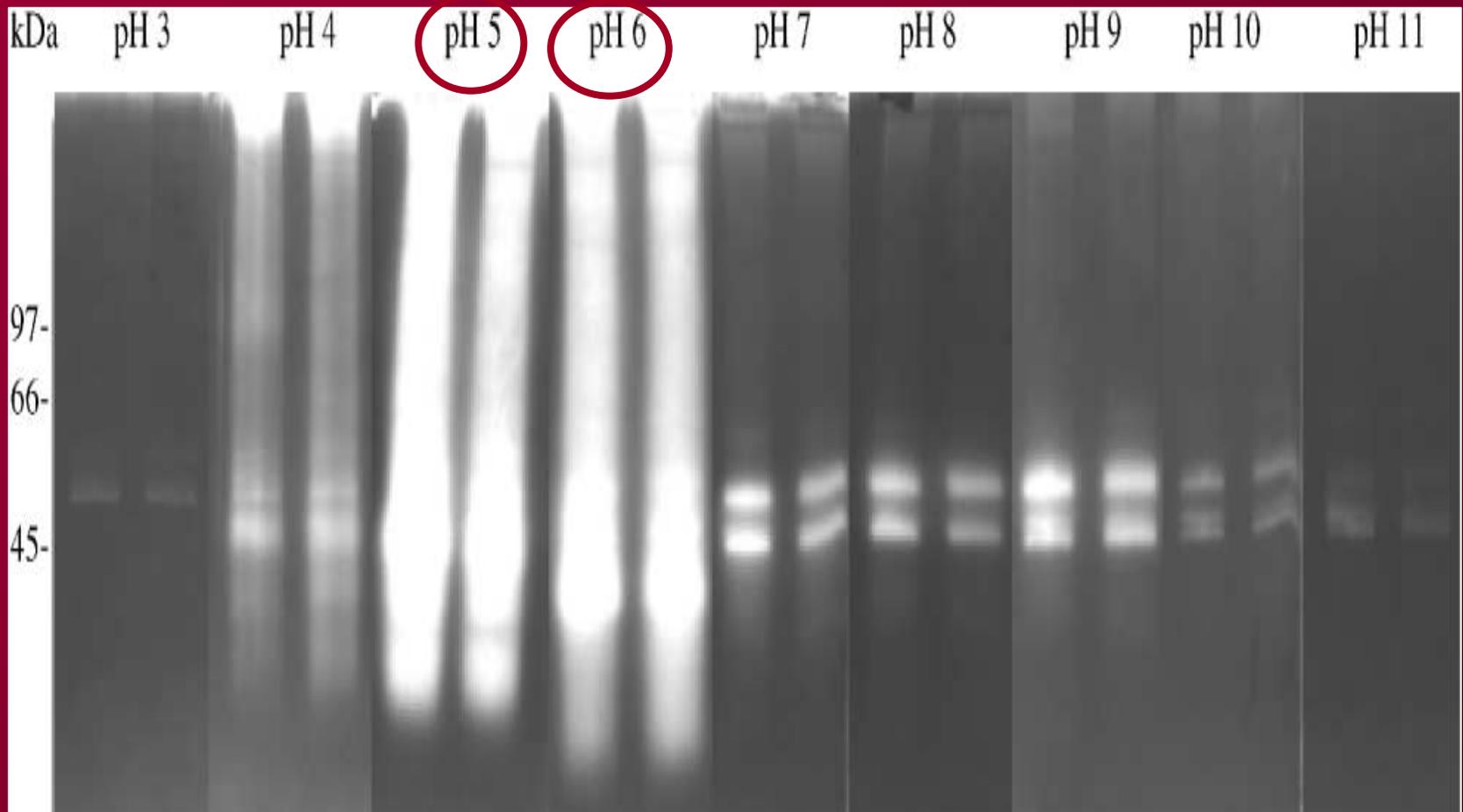




Protease activity in excretory–secretory products
of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae

Tabouret al., 2003 (Veterinary Parasitology)

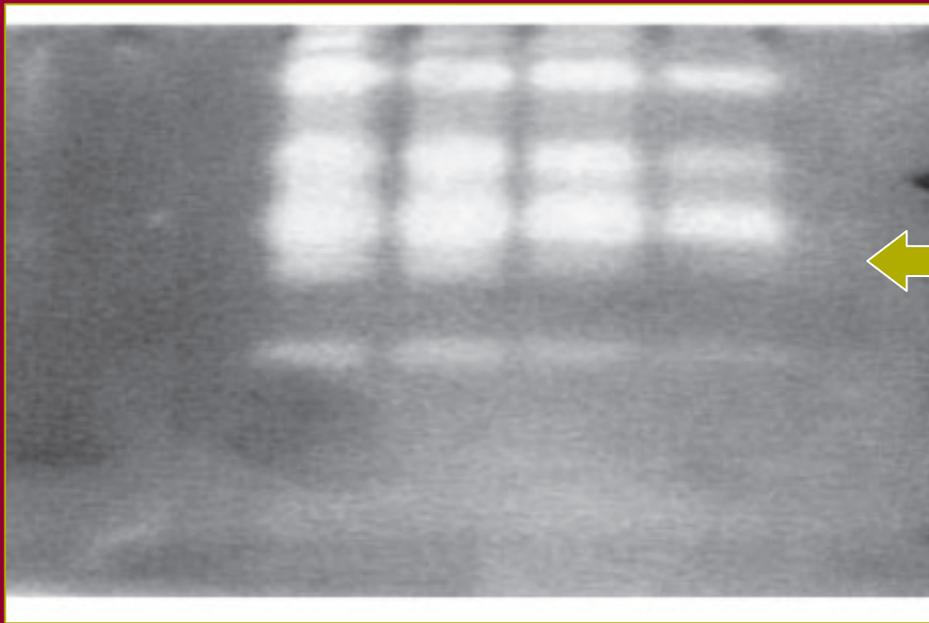
SDS-PAGE-gelatina



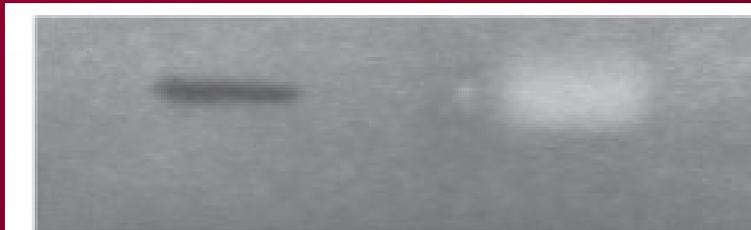
The proteinases of *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite—
their diversity and substrate specificity

Kenyon & Knox, 2000 (Veterinary Parasitology)

SDS-PAGE-gelatina



← 40 kDa

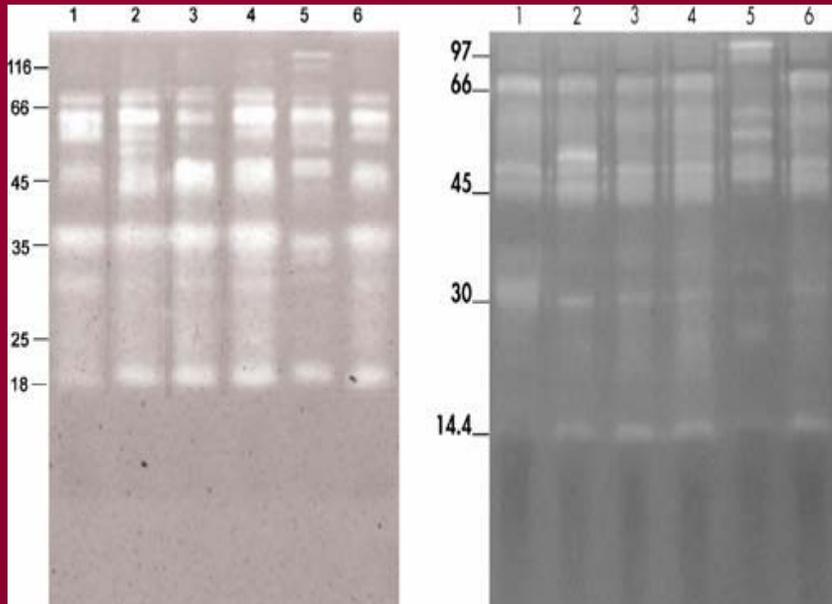


← 40 kDa

**Purification and Characterization of a Hemoglobin Degrading
Aspartic Protease from the Malarial Parasite *Plasmodium vivax***

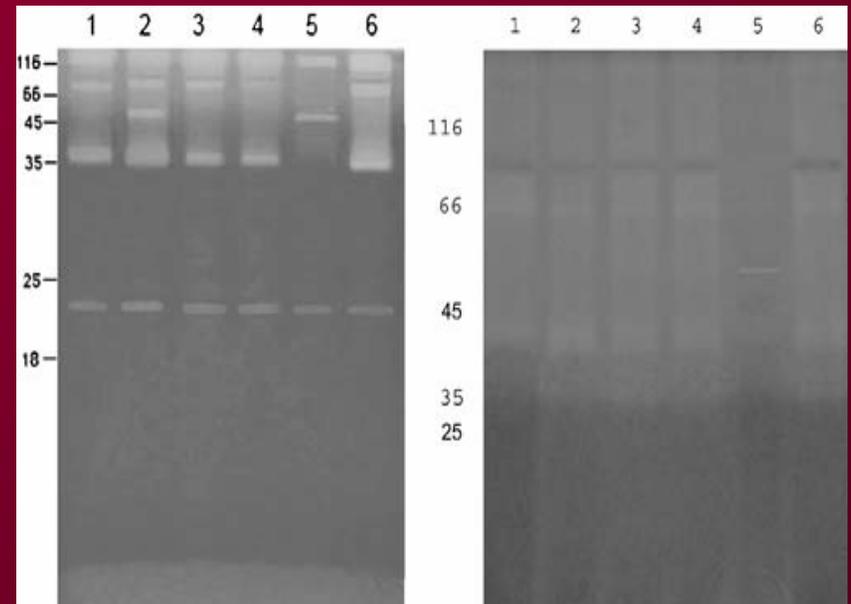
Sharma et al., 2005 (Journal of Biochemistry)

SDS-PAGE-substrato



Colágeno

Gelatina



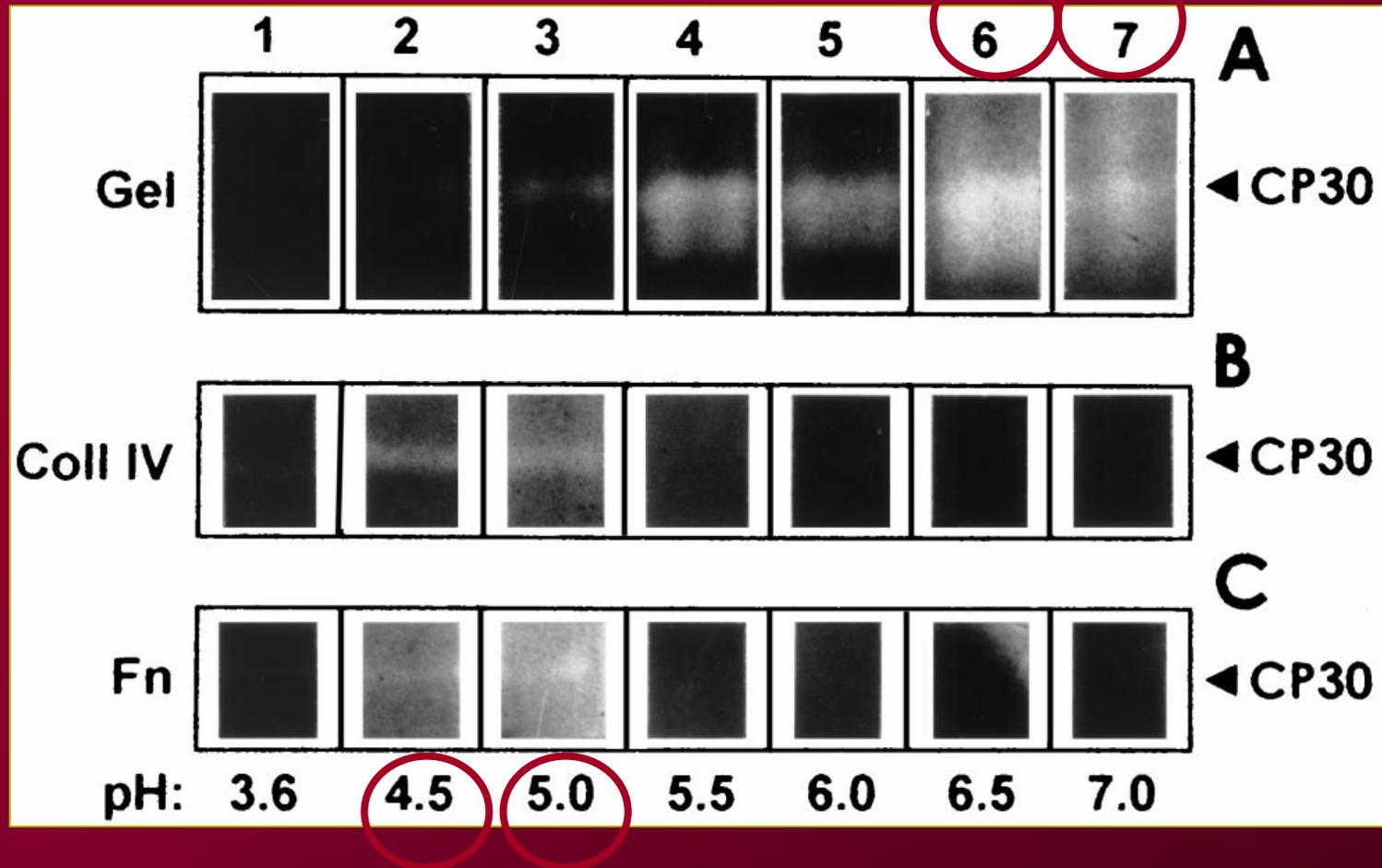
BSA

Hemoglobina

***Giardia duodenalis*: protein substrates degradation
by trophozoite proteases**

Coradi & Guimarães, 2006 (Parasitology Research)

SDS-PAGE-substrato



**CP30, a Cysteine Proteinase Involved in
Trichomonas vaginalis Cytoadherence**

Mendoza-Lopez et al., 2000 (Infection and Immunity)

VANTAGENS

- ✓ Recuperar a atividade das proteases
- ✓ Estimar o peso molecular
- ✓ Estudo de diversos tipos de proteínas
- ✓ Simplicidade e sensibilidade
- ✓ Padrões de hidrólise reprodutíveis

LIMITAÇÕES

- ✓ Algumas proteases perdem a atividade
- ✓ Detecção das endoproteases
- ✓ Gelatina não é substrato – proteases
- ✓ Substrato - interferir na migração proteínas

Ensaaios de inibição da atividade proteolítica

Caracterização **PROTEASES**

Atividade enzimática

Efeito de inibidores

Cisteína-proteases

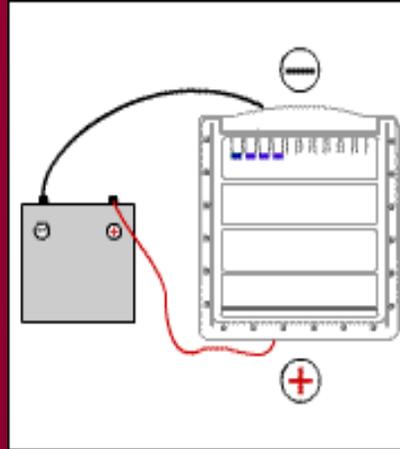
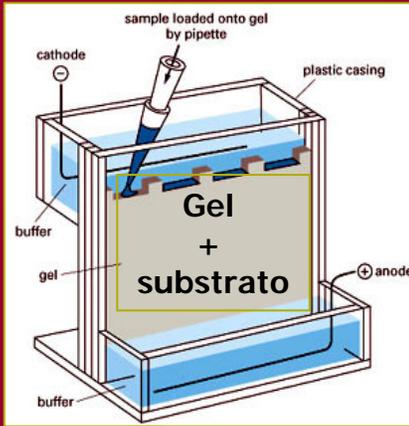
Serina-proteases

Metallo-proteases

Aspartil-proteases

Inibidores sintéticos de proteases

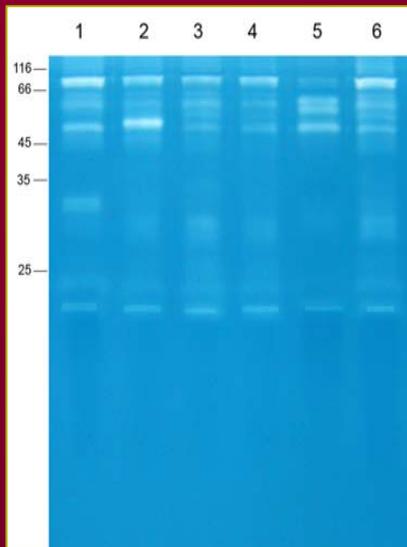
| Inibidores* | Enzimas Alvo |
|---------------------|---------------------------|
| E-64 | Cisteína-proteases |
| IAA | Cisteína-proteases |
| PMSF | Serina-proteases |
| TPCK | Serina-proteases |
| TLCK | Serina-proteases |
| Leupeptina | Serina/Cisteína-proteases |
| Antipaina | Serina/Cisteína-proteases |
| Elastatinal | Serina-proteases |
| Pepstatina | Aspartil proteases |
| Bestatina | Amino-peptidases |
| EDTA e Fenantrolina | Metallo-proteases |



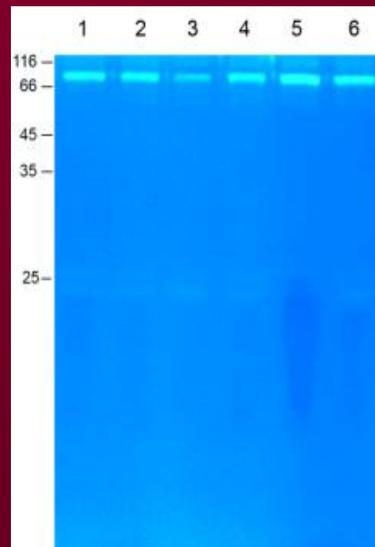
**GEL
+
TRITON-X 100**



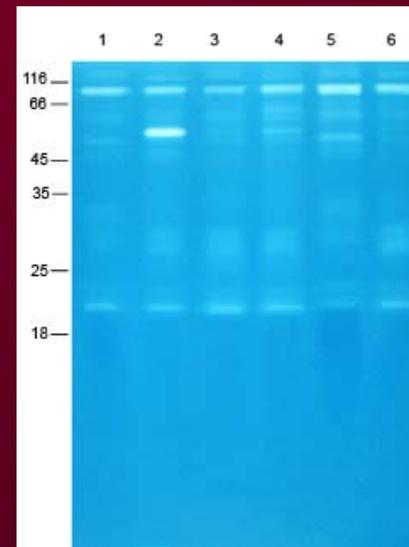
**GEL
TAMPÃO DE ATIVAÇÃO (pH)
AGENTE REDUTOR, °C
INIBIDOR**



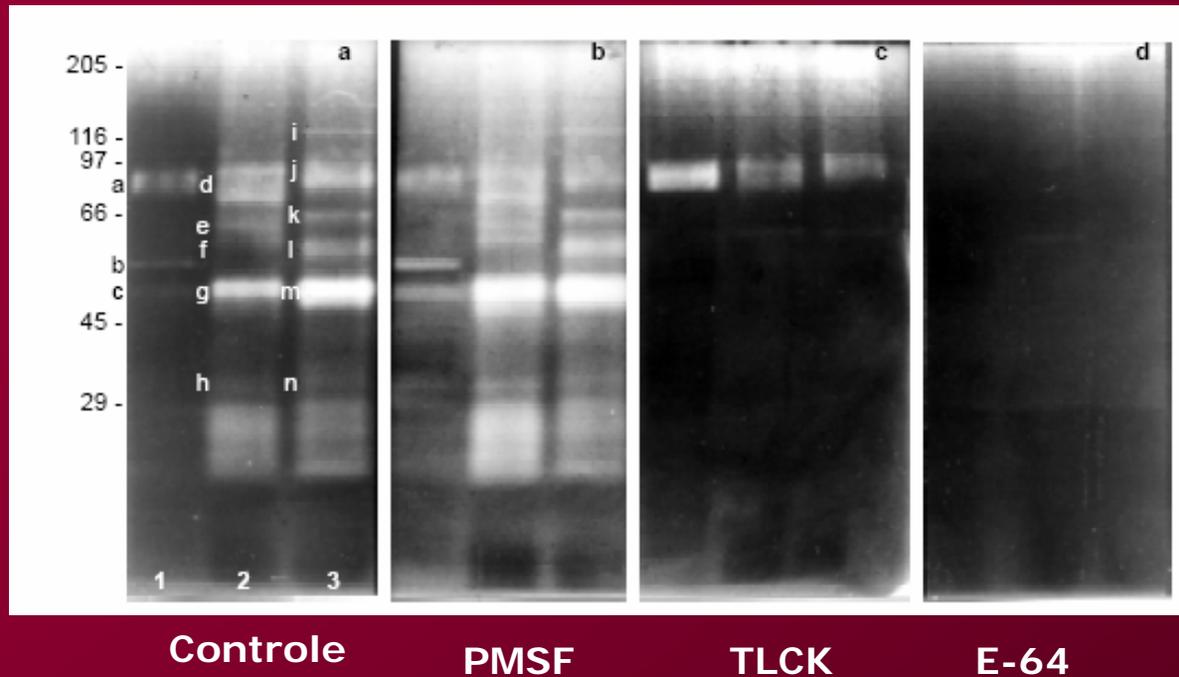
Controle



E-64

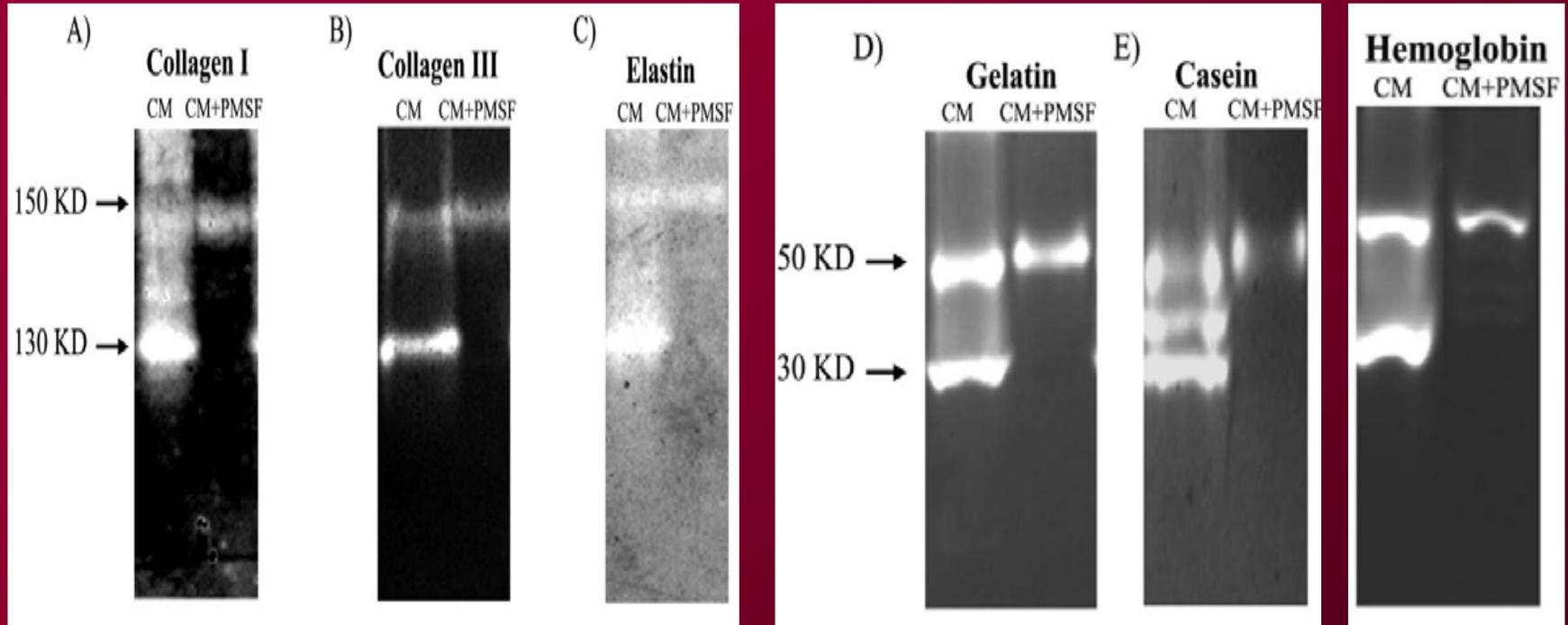


PMSF



Protease Activity in *Giardia duodenalis* Trophozoites of Axenic Strains Isolated from Symptomatic and Asymptomatic Patients

Guimarães et al., 2003 (Mem. Inst. Oswaldo Cruz)



Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis

Sissons et al., 2006 (BMC Microbiology)

Ensaio Espectrofotométrico

Quantificar a atividade hidrolítica
(degradação dos substratos)

Substratos sintéticos

Azocaseína
Azoalbumina



Preparações complexas

Proteases purificadas*



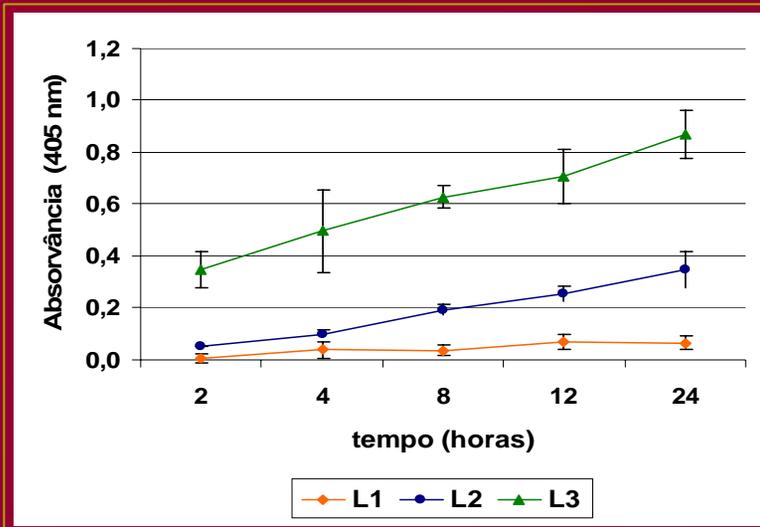


Figura 7. Cinética da atividade hidrolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* sobre a AZOCASEÍNA.

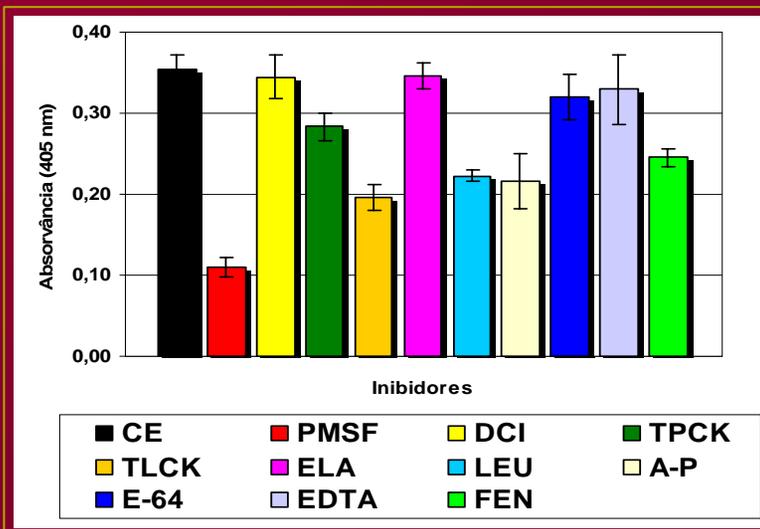


Figura 9. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*, tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre a AZOCASEÍNA.

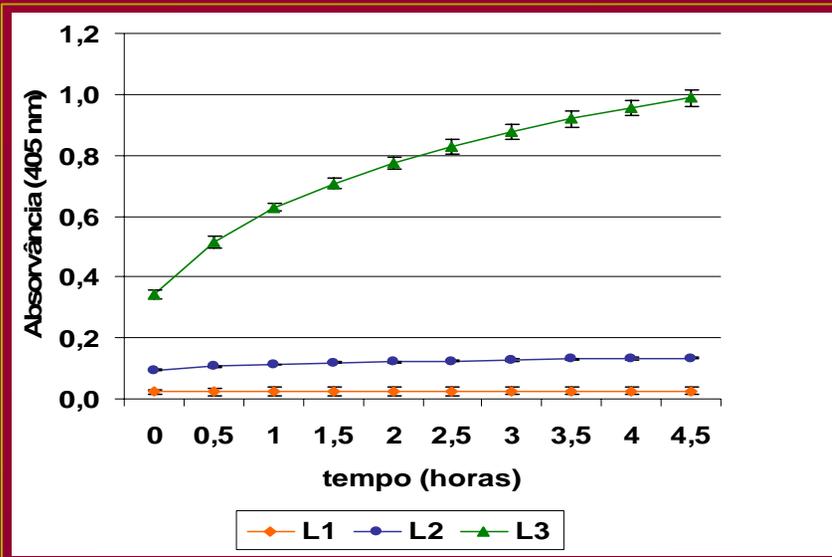


Figura 11. Cinética da atividade hidrolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* sobre BAPNA.

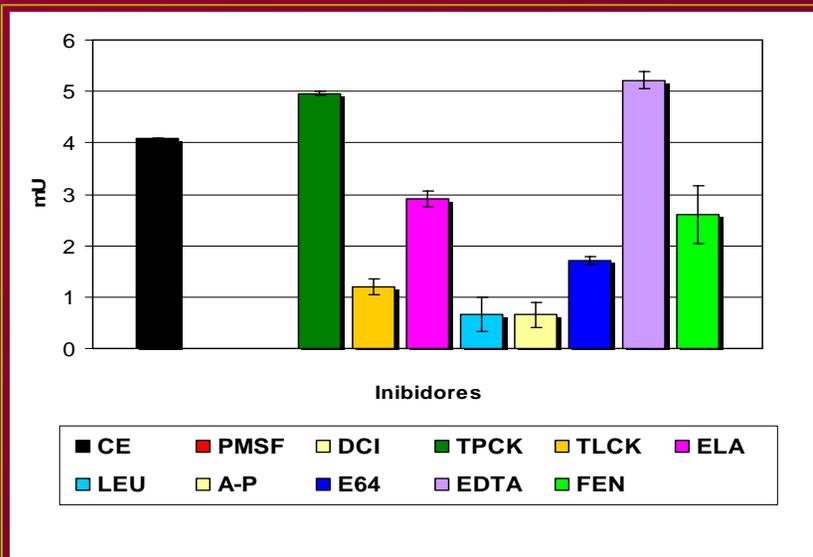


Figura 12. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*, tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre BAPNA.

PROTEASES

????

Relação parasita-hospedeiro

OBRI GADA

TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EM ESTUDOS DE DOENÇAS DE INTERESSE VETERINÁRIO

Márcia Cristina de Sena Oliveira

DIAGNÓSTICO



Identificação do agente: “técnica ouro”



Pesquisa de anticorpos



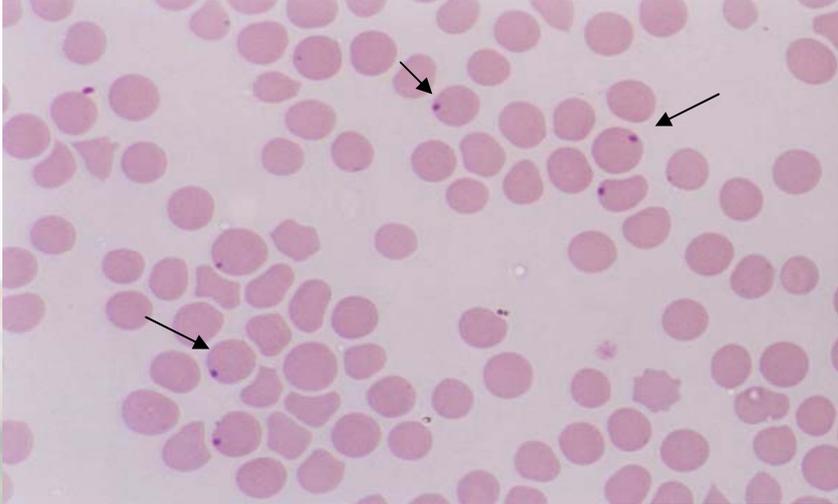
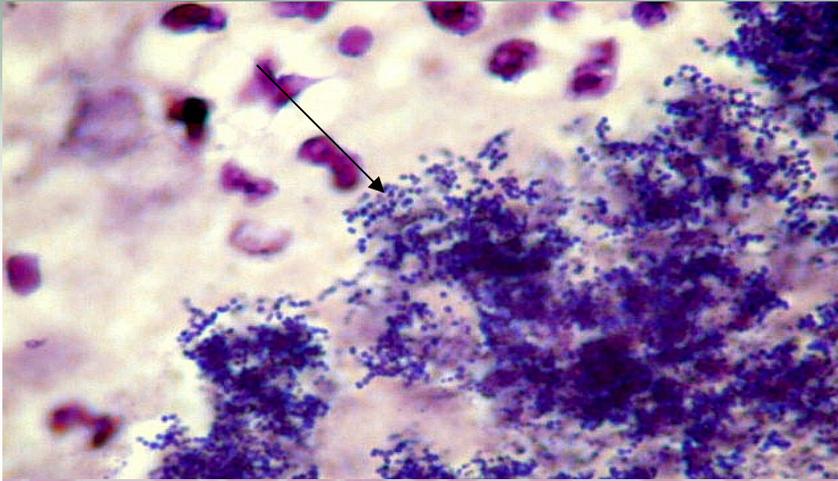
PARASITISMO

Organismo vive juntamente ou sobre outro organismo vivo

Helmintos, fungos, protozoários, bactérias, vírus

Nem sempre provocam doença no hospedeiro

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS



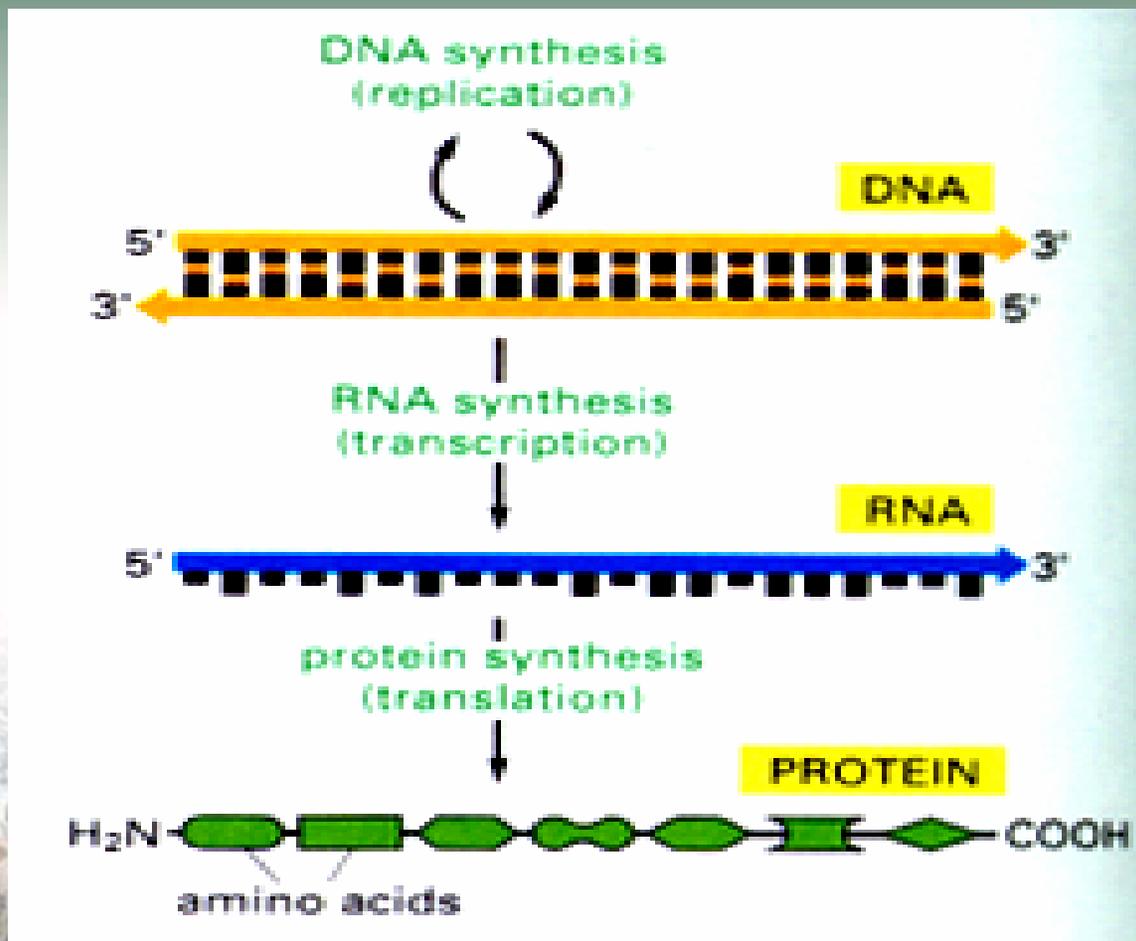
Técnicas Moleculares

**Trabalhar com os ácidos nucleicos é
a maneira mais fácil e prática de se
chegar a uma proteína**

Os ácidos nucleicos são formados de apenas
4 tipos de monômeros

Proteínas - 20 tipos de aminoácidos

Técnicas Moleculares



Detecção do DNA dos parasitas

A informação genética em todos os animais é escrita por meio das mesmas seqüências de DNA



Técnicas bioquímicas simples

Ácidos nucleicos são moléculas muito mais simples que as proteínas

GENOMAS

SEQUÊNCIA COMPLETA DOS GENES

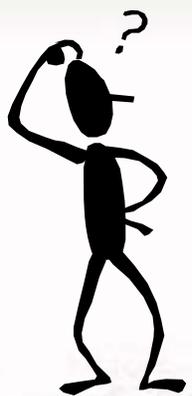
Caenorhabditis elegans

schistosoma mansoni

Plasmodium spp.

Entamoeba histolytica

Brugia malayi



Muitos parasitas cujas seqüências não
são ainda conhecidas

A REAÇÃO DE PCR

Três fases:

Desnaturação

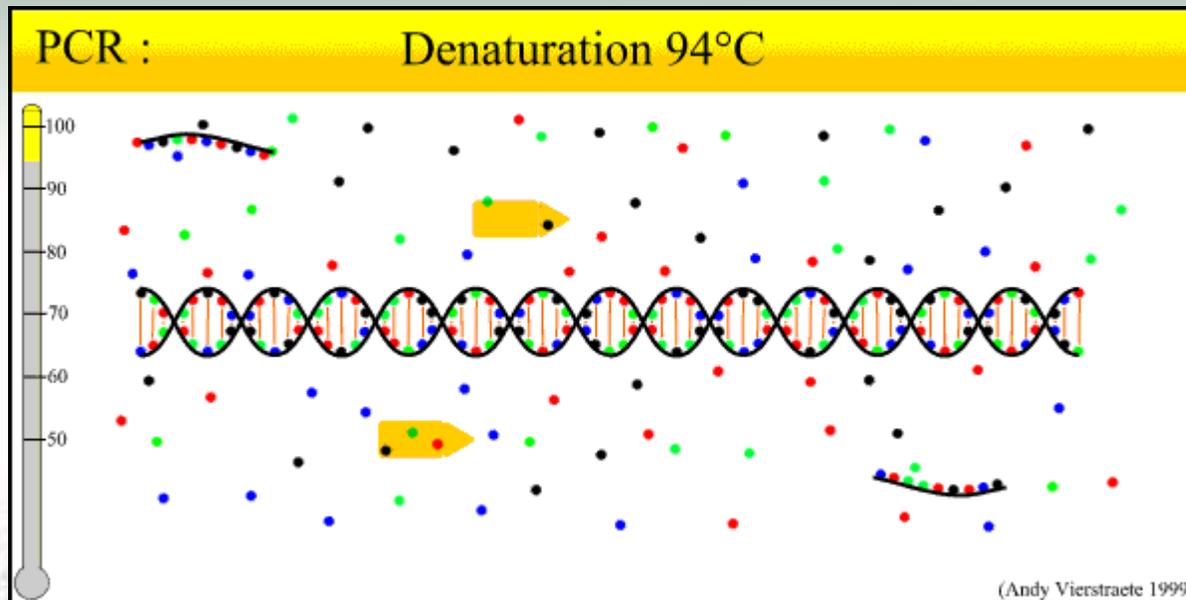
Anelamento

Extensão

No máximo 40 ciclos



A REAÇÃO DE PCR

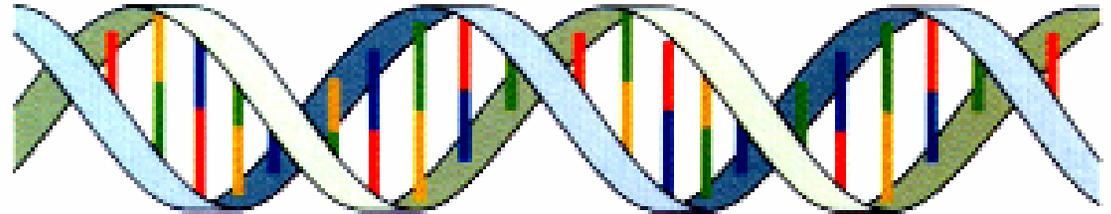


A REAÇÃO DE PCR

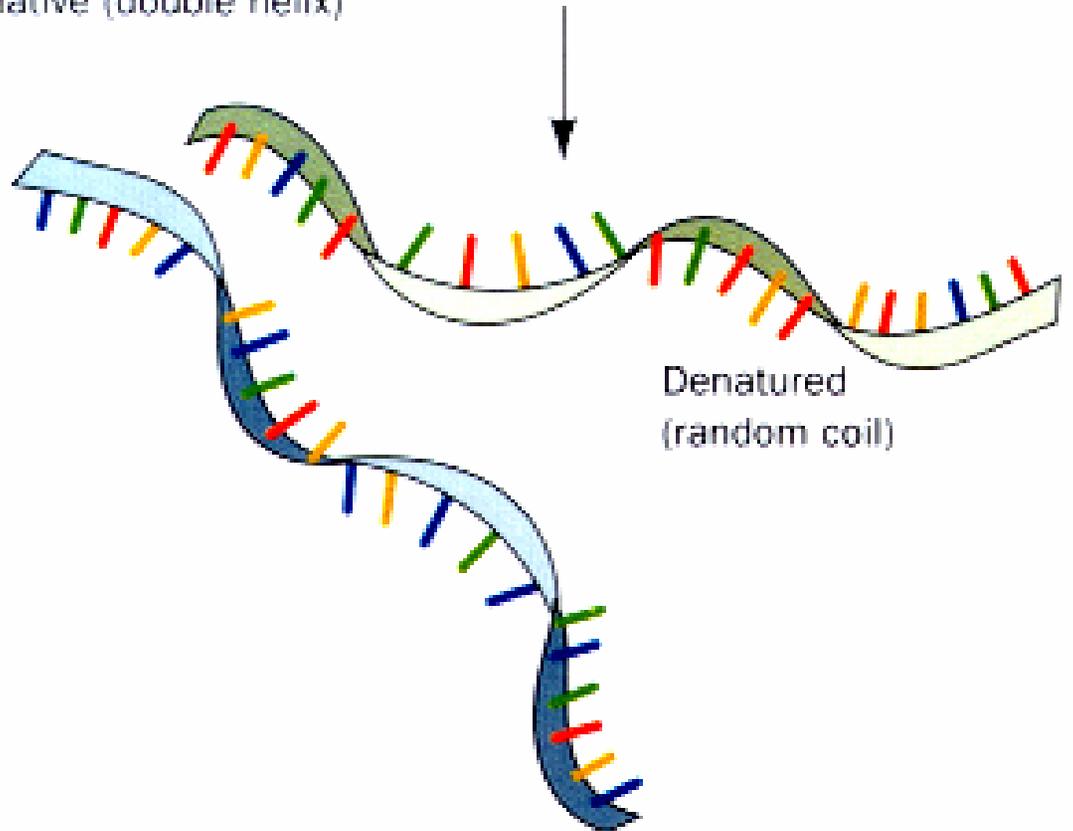
Desnaturação

Temperatura 95 °C

pH alcalino



Native (double helix)



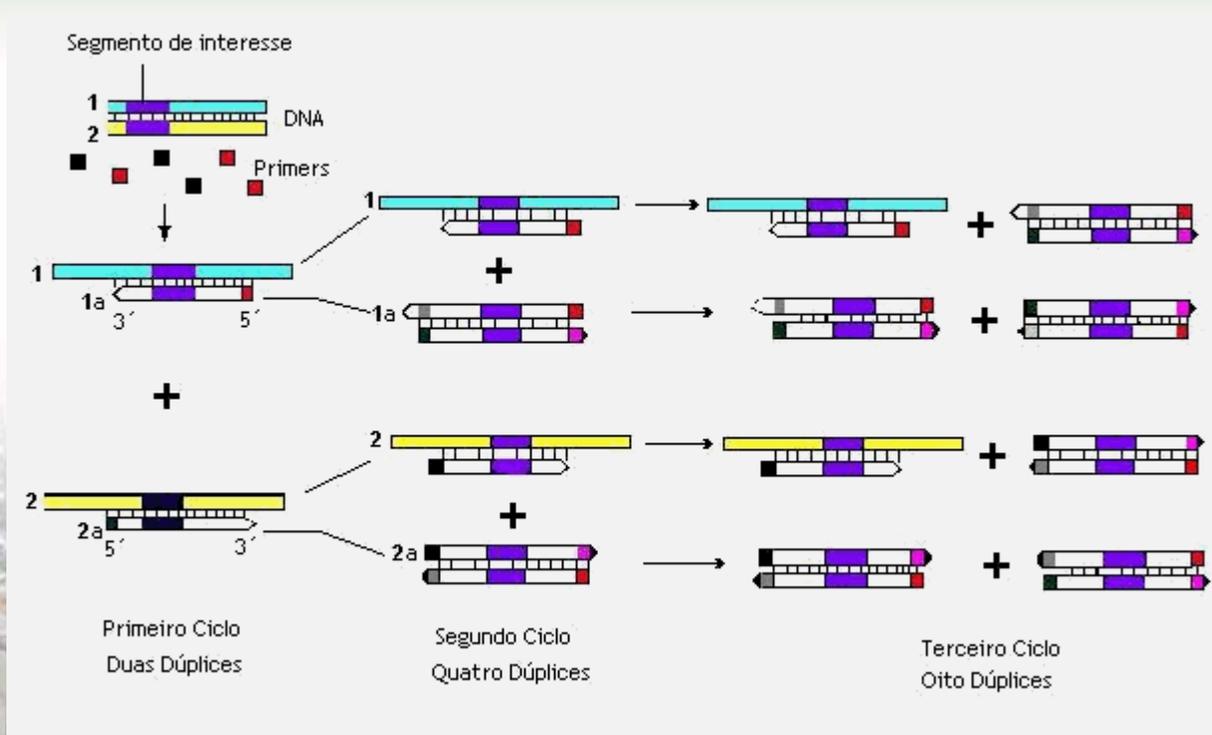
Denatured
(random coil)



A REAÇÃO DE PCR

Anelamento

Temperatura depende do “primer”



A REAÇÃO DE PCR

Extensão

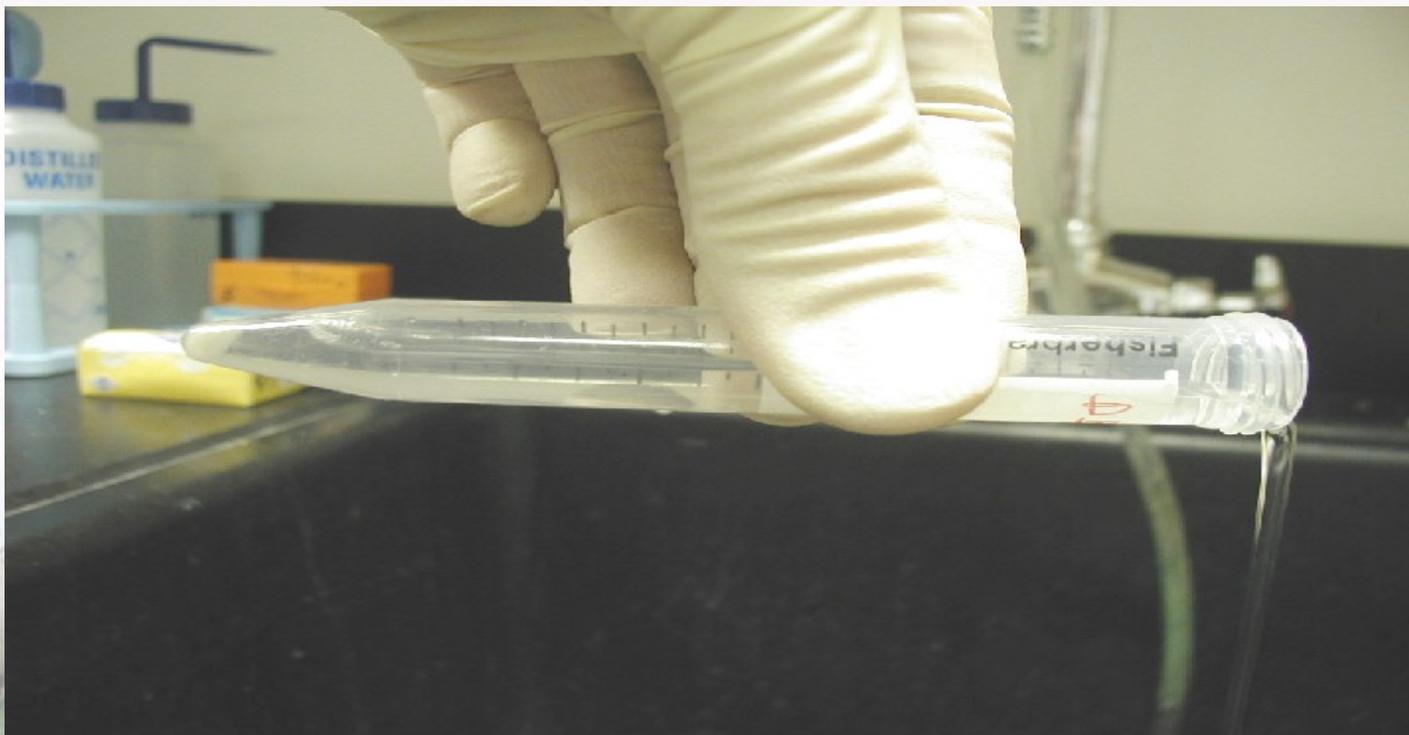
72°C



COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR

DNA QUE CONTÉM A SEQUÊNCIA ALVO

Padronização da técnica de extração



EXTRAÇÃO DE DNA

CUIDADOS

Uso de luvas

Espécimes clínicos adequados e bem preservados

Volume/quantidade da amostra

EXTRAÇÃO DE DNA



KITS



SOLUÇÕES

ANÁLISE DO DNA EXTRAÍDO

DNA absorve luz a 260 nm

Proteínas absorvem luz a 280 nm

Concentração de DNA = leitura da DO260 x 50 x
fator diluição .

Pureza: $DO_{260}/DO_{280} = \uparrow 1,8$

DNA



QUALIDADE DO DNA

VOLUME DE DNA USADO NA REAÇÃO

“Primers”



Gene 18s rDNA

Bibliotecas de DNA
genômico

RAPD-PCR

Programas disponíveis na internet

Primer 3

Primer Designer

“PRIMERS”

U. M. Morgan and R. C. A. Thompson

1. RAPD Profiles



common band

common band

Blot onto nylon membrane



2. Screen with human DNA, Faecal DNA, other parasites etc

Pick bands:

- specific to parasite amplified
- that do not cross react
- common to all isolates



3. Subclone, sequence and Design PCR primers

Fig. 1. Description of a method for developing diagnostic PCR primers for parasites using RAPD analysis.

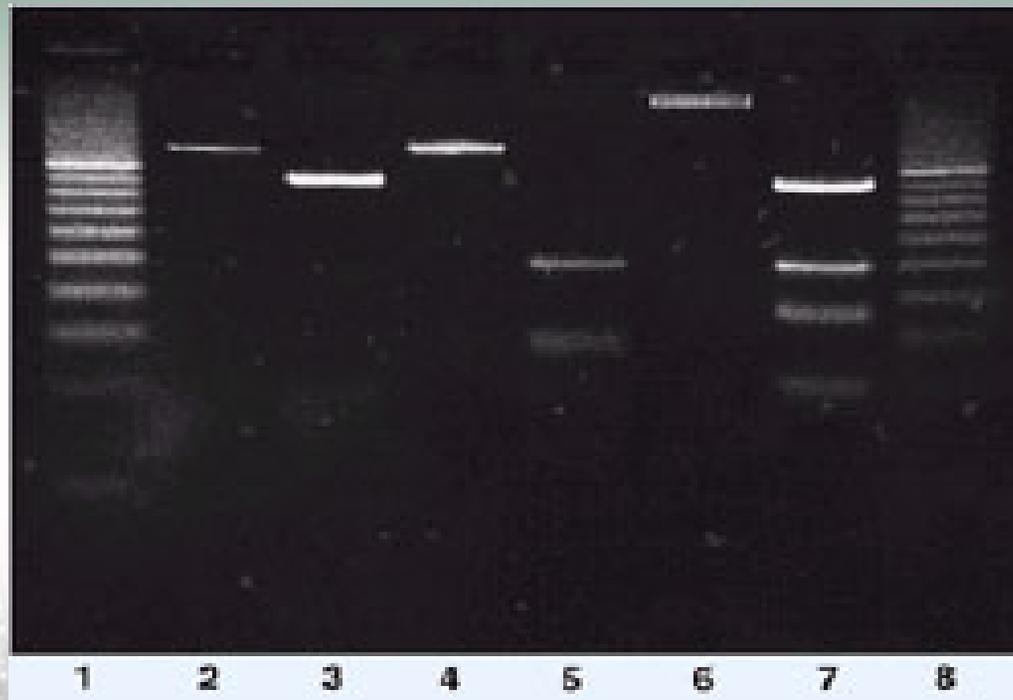
Reação de PCR

- ✓ Solução tampão (Mg)
- ✓ DNA
- ✓ "PRIMERS"
- ✓ dNTPs
- ✓ DNA polimerase



LEITURA DAS REAÇÕES DE PCR

Análise dos fragmentos amplificados



ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

LEITURA DAS REAÇÕES DE PCR

Análise dos fragmentos amplificados



Seqüenciamento



Digestão com enzimas de restrição



Hibridização ou Nested-PCR

Utilização da PCR no diagnóstico de doenças

SENSIBILIDADE (Controle Positivo)

ESPECIFICIDADE (Controle Negativo)

DIAGNÓSTICO POR MEIO DE PCR/N-PCR



PRIMEIRA REAÇÃO DE PCR

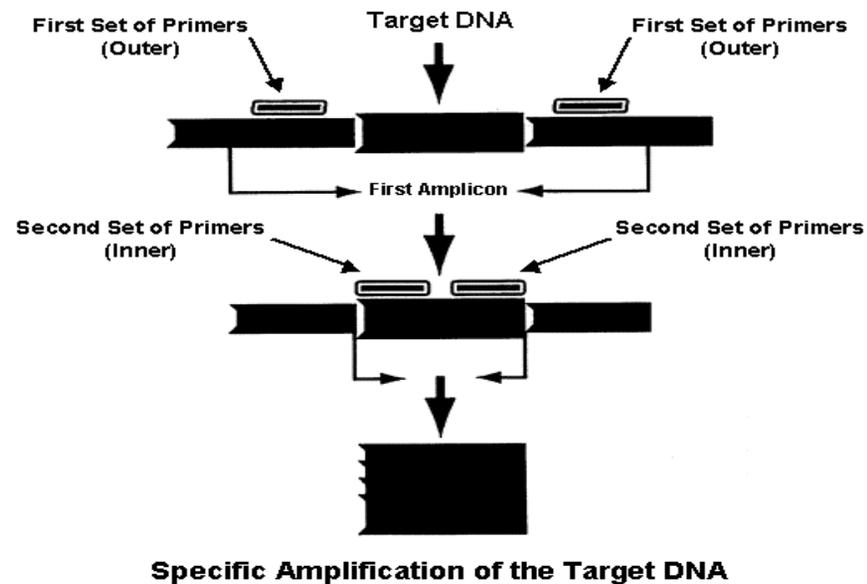


SEGUNDA REAÇÃO DE PCR

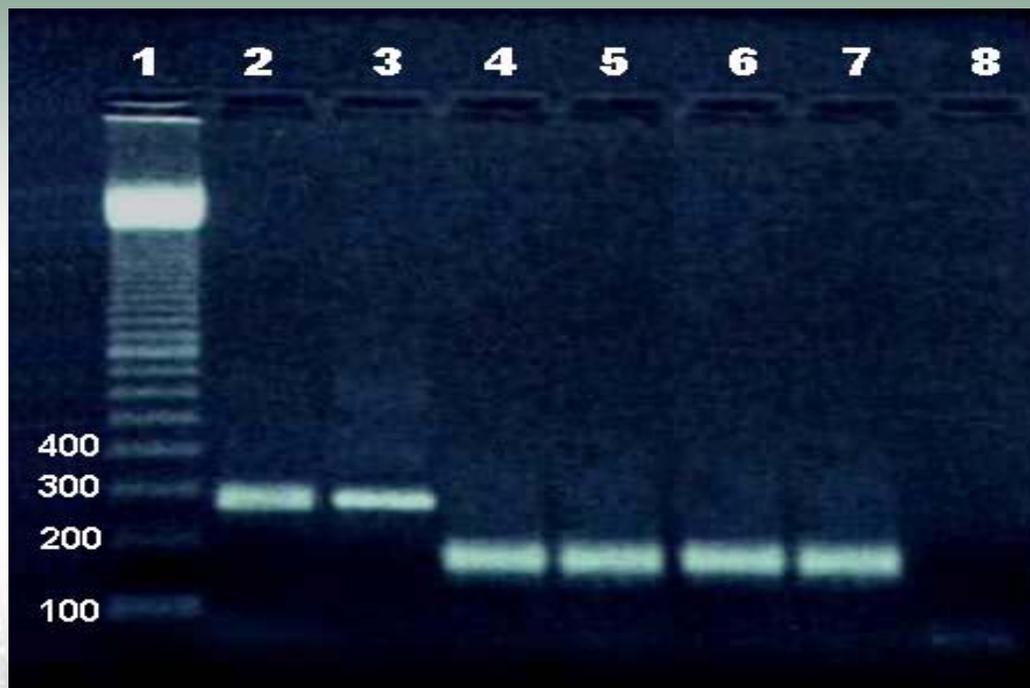


SIGNIFICATIVO DA
SENSIBILIDADE

DIAGNÓSTICO POR MEIO DE PCR/N-PCR



DIAGNÓSTICO POR MEIO DE PCR/N-PCR



Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bigemina*, pelas técnicas de PCR (1-2) e N-PCR (4-7).

PCR “MULTIPLEX”

- ✓ Amplificação simultânea de mais de uma seqüência alvo por reação
- ✓ Utilização de vários pares de “primers”
- ✓ Separar parasitas morfologicamente parecidos

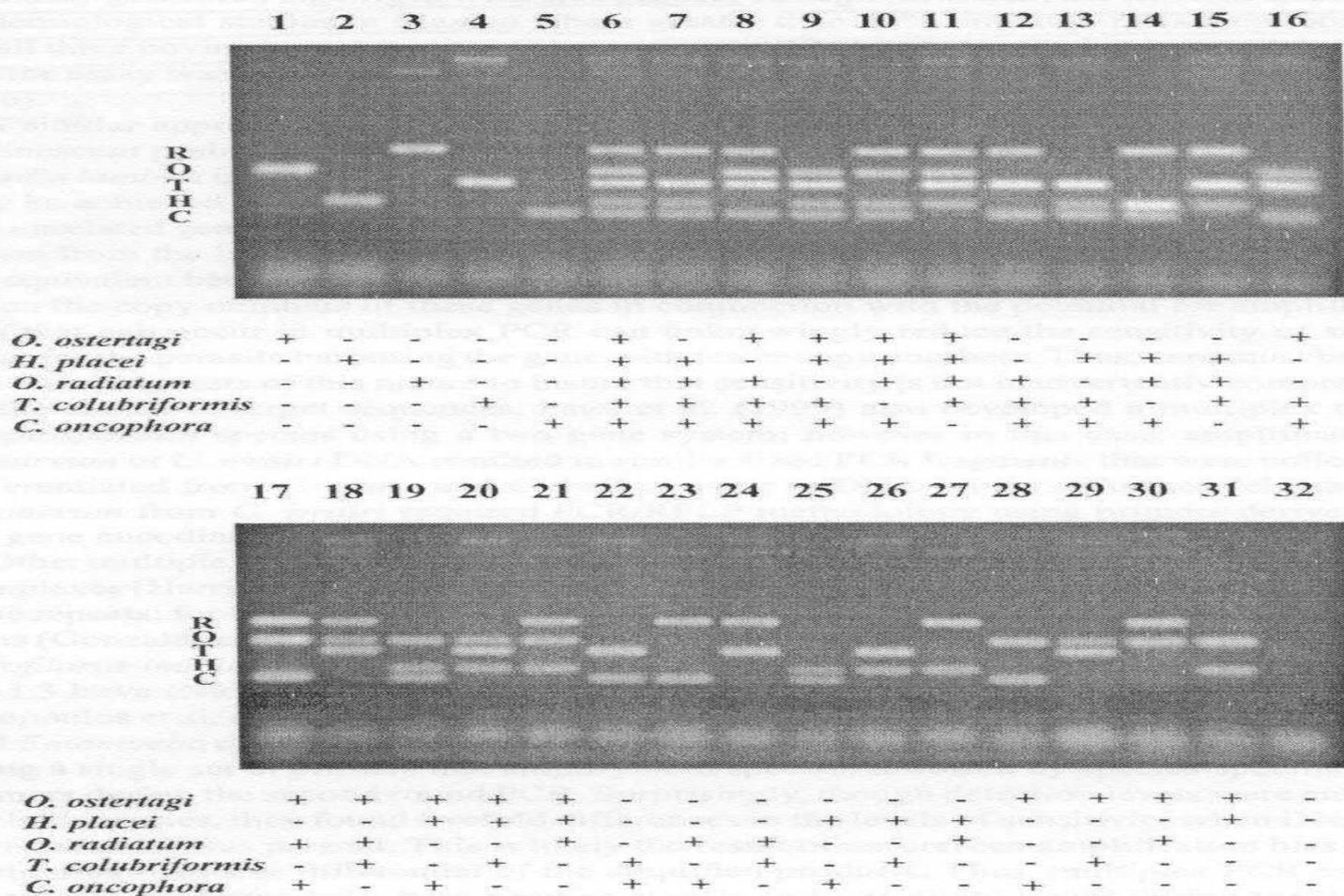


Fig. 1. Multiplex PCR of gastrointestinal nematode genomic DNA. Adult parasite-derived genomic DNAs from *O. radiatum* (R), *O. ostertagi* (O), *T. colubriformis* (T), *H. placei* (H) and *C. oncophora* (C) were mixed in equal quantities (20 pg/parasite sample) in the combinations as indicated in this figure by "+". PCR was performed in a 50 μ l reaction which contained all five primer sets, each of which is specific for one of the five species indicated above. Primers of the multiplex PCR primer mix are defined in Zarlenga et al. (2001). PCR products (10 μ l) were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. As demonstrated in the figure, even in the presence of all five primer sets, positive PCR signals were only observed in those samples where the homologous genomic DNA was included in the PCR reaction. This figure was reprinted from Zarlenga et al. (2001).

PCR-RAPD

- ✓ Amplificação usando primers escolhidos ao acaso
- ✓ Produtos amplificados são comparados entre amostras
- ✓ Similaridades e diferenças são analisadas

PCR-RAPD



Técnica facilmente executável

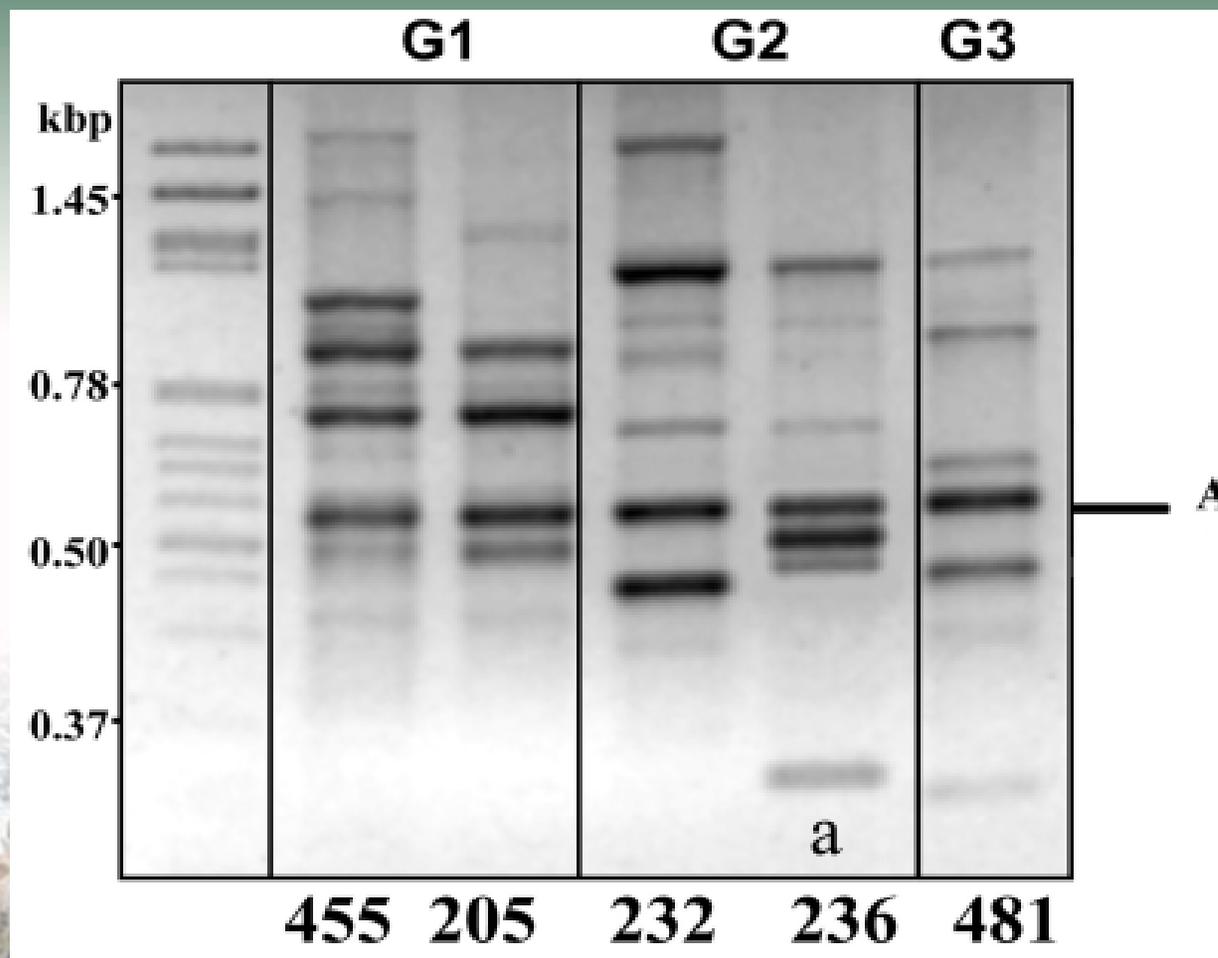


Influenciada por vários fatores:

Qualidade do DNA

Concentração do DNA alvo

PCR-RAPD



RT-PCR

- ✓ cDNA é sintetizado a partir do RNA (Transcriptase reversa)
- ✓ DNA é então amplificado por PCR
- ✓ Maior quantidade nas células
- ✓ RNA não é muito utilizado para diagnóstico

Análise do RNA

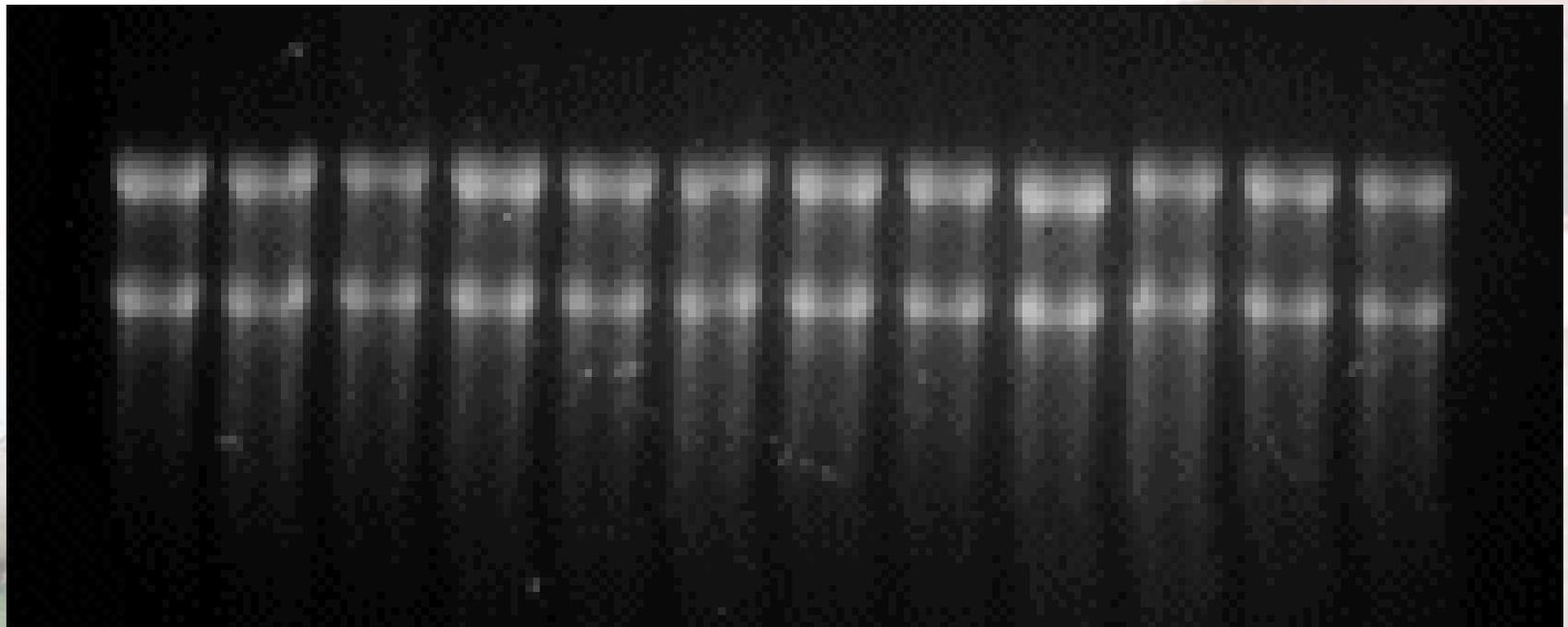
Espectrometria (relação 260/280)

Eletroforese capilar

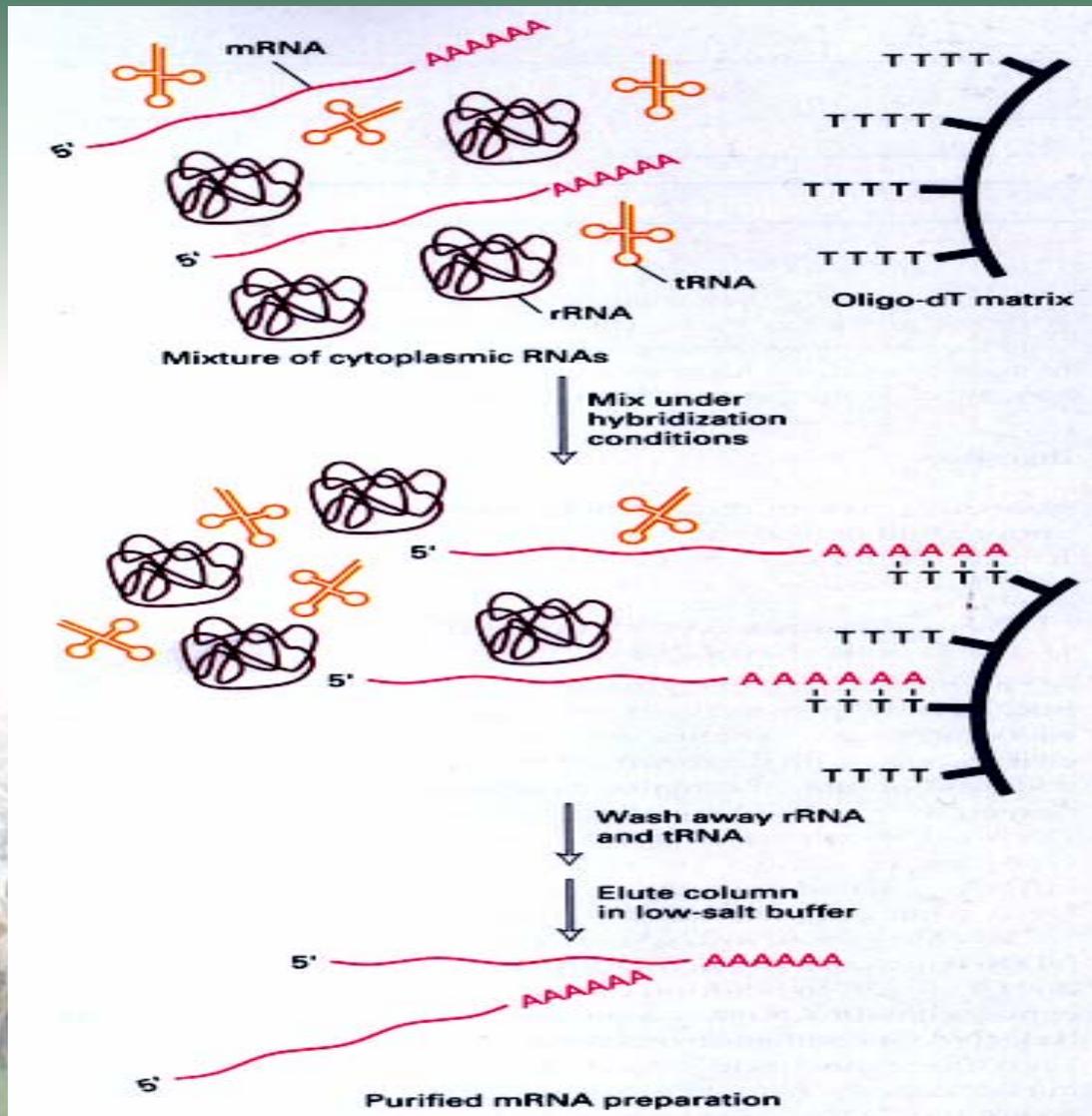
Eletroforese em gel desnaturante

28s

18s



Purificação do mRNA



TRANSCRIÇÃO REVERSA



Transcriptase reversa (mesófilas e termófilas)

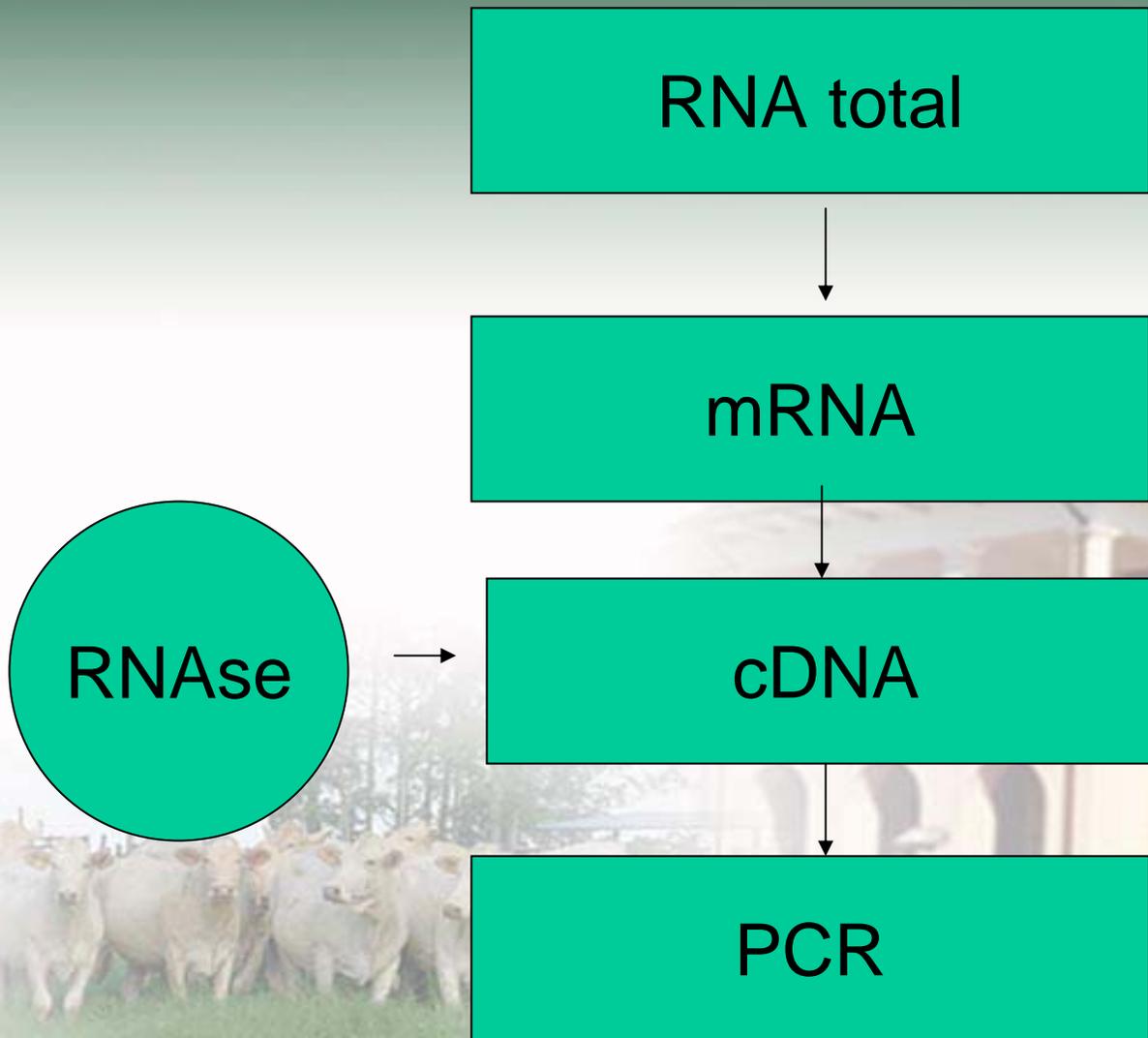


Necessita de um “primer” que se ligue a extremidade 3' OH livre ou o oligo dT



Otimização de todos os componentes da reação

RT-PCR



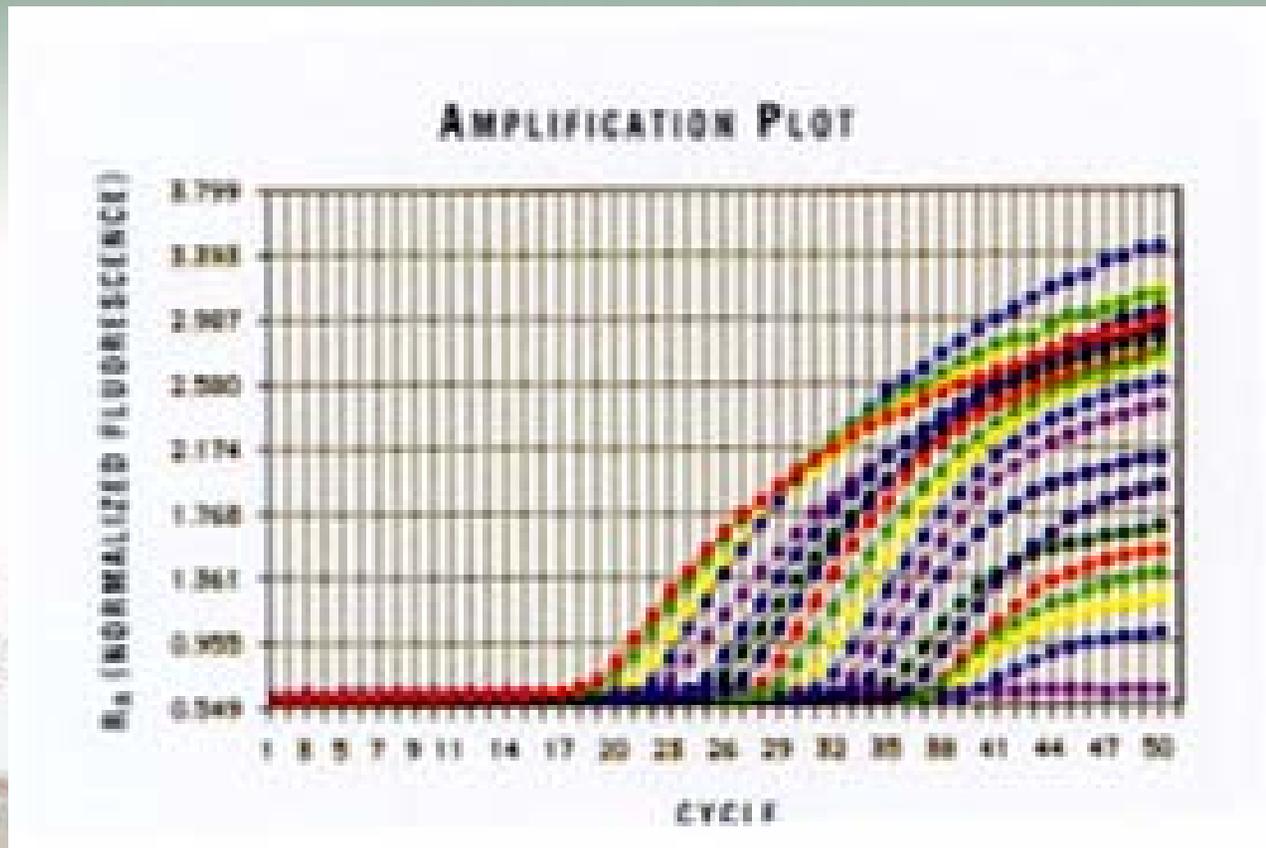
PCR Quantitativo

 Utilizado para quantificar infecções

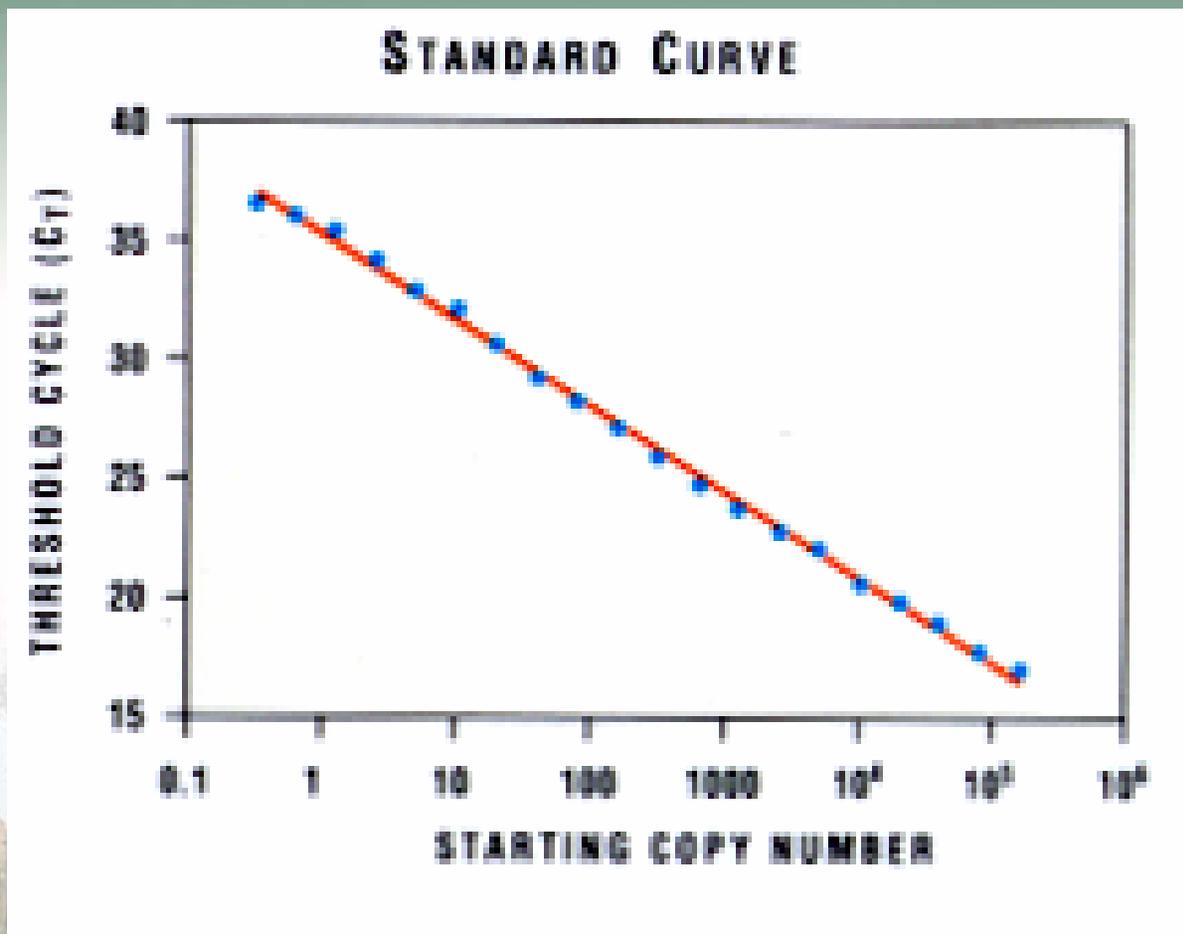
 Utiliza-se um corante fluorescente que aumenta de intensidade com a síntese de nova fita

 Necessita de um controle (gene cujo padrão de amplificação é conhecido)

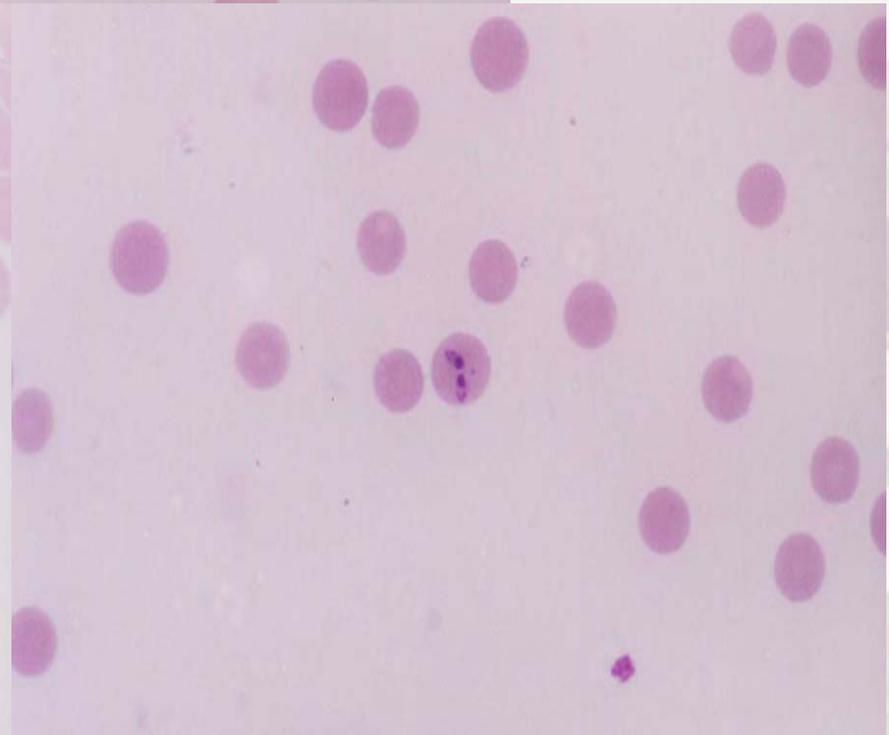
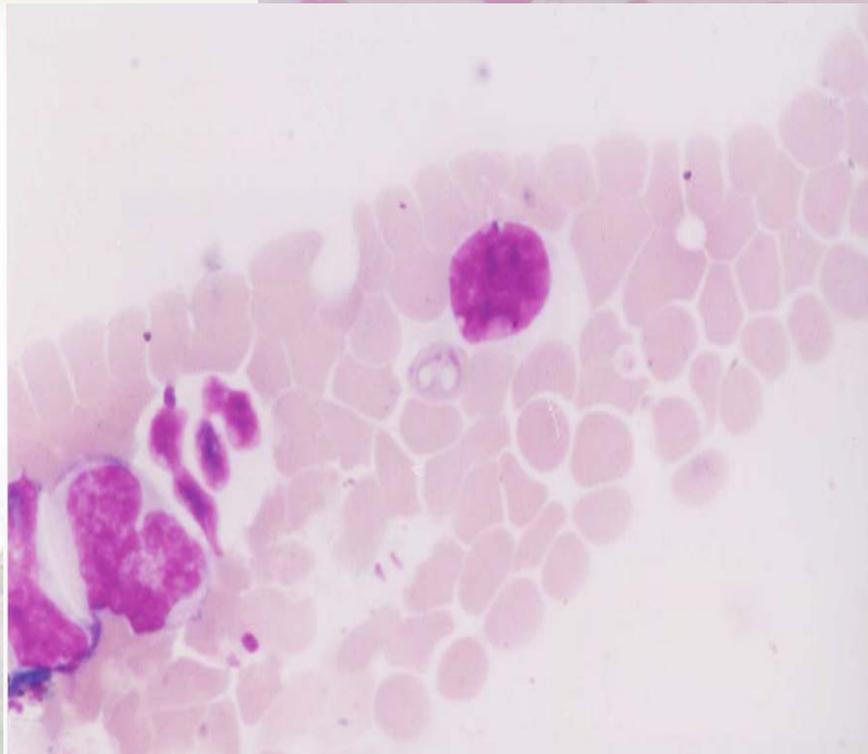
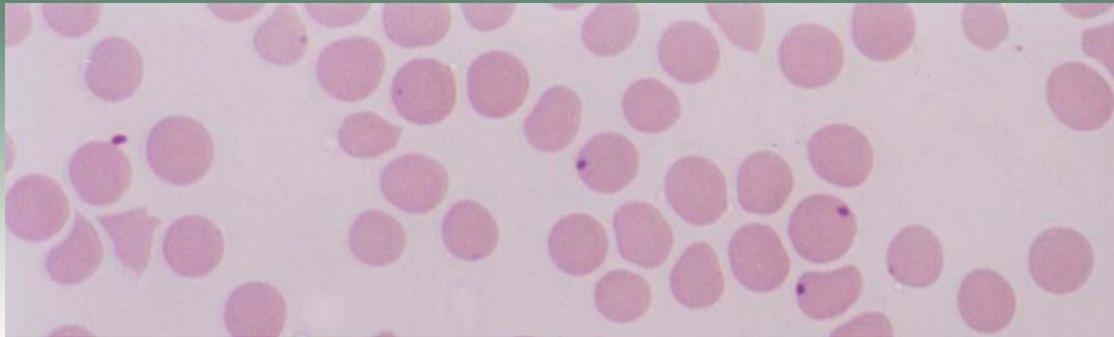
PCR QUANTITATIVO



PCR QUANTITATIVO



ESTUDOS DESENVOLVIDOS



Obrigada!

marcia@cnpse.embrapa.br

MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO ANIMAL

Luciana Correia de Almeida Regitano

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, C. P. 339. CEP

13560-970 – São Carlos, SP. luciana@cnpse.embrapa.br

Introdução

Marcadores genéticos têm sido elementos fundamentais nos estudos de segregação de caracteres hereditários, na análise do comportamento de genes em populações e na reconstrução da história evolutiva de populações, entre outras aplicações.

Desde a descoberta do DNA, a genética molecular experimentou extraordinário avanço, que passou pelo desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e da função do material genético, e de equipamentos com capacidade para análise automatizada de grande quantidade de amostras, até o desenvolvimento de métodos estatísticos e de ferramentas de informática, resultando na ciência conhecida como genômica.

Os projetos de seqüenciamento do genoma de grande número de espécies produziram volume razoável de informações, que, aliadas à evolução metodológica, permitiram o desenvolvimento de uma variedade de marcadores genéticos moleculares.

O seqüenciamento do genoma do bovino teve sua primeira versão em julho de 2005, ano em que um mapa genético com aproximadamente 4.000 marcadores foi também publicado, o que significa dizer que todos os intervalos de todos os cromossomos dos bovinos possuem pelo menos um ponto de referência. Assim como em outras espécies, tais como suínos, aves e ovinos, esse panorama vem se aprimorando com a geração maciça de dados sobre variações de seqüência resultantes da comparação de seqüências entre indivíduos.

As informações geradas pelos projetos de genoma permitiram, por exemplo, o mapeamento de mais de 1.600 mutações responsáveis por características de herança mendeliana em humanos. Em suínos e em bovinos, dezenas de doenças

hereditárias tiveram seu mecanismo molecular desvendado. Porém, o desafio de elucidar os mecanismos determinantes da variação genética de características mais complexas, entre as quais figura a maioria das características de interesse econômico dos animais domésticos, permanece (Georges & Andersson, 2003). Geralmente, essas características são controladas por muitos genes, que podem resultar em complexas interações alélicas e não alélicas, e são influenciadas pelo ambiente. Diversos estudos têm demonstrado a possibilidade de mapear genes ou blocos de genes adjacentes que influenciam uma característica quantitativa, denominados *quantitative trait loci* (QTL).

Mais recentemente, a análise de expressão em escala genômica, também denominada genética genômica ou mapeamento de transcriptoma, tem permitido a identificação de variação no padrão de expressão de conjuntos de genes expressos que, aliada à análise de marcadores, possibilita identificar regiões do genoma responsáveis pelas variações na expressão desses genes (Kadarmideen et al., 2006). Essa integração de informações estruturais e funcionais deverá permitir melhor conhecimento do controle genético das características de interesse econômico e auxiliar as decisões do melhoramento.

Marcadores moleculares

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco da atenção dos geneticistas passou a ser o gene como unidade fundamental da variação biológica. Com o desenvolvimento da genética de populações, surgiu o conceito de utilização de genes individuais como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, tais como o conteúdo de variabilidade, os padrões de migração, a seleção e a deriva genética.

Marcadores genéticos são caracteres de herança mendeliana simples, em que o padrão fenotípico individual pode ser experimentalmente determinado, de modo a permitir que a segregação do loco marcador responsável pelo caráter 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* ou a ausência de pêlos em camundongos. Entretanto, tais

mutações são pouco freqüentes nas populações naturais, em que a maior parte da variação genética é de caráter contínuo (Tanksley, 1993). Além disso, mutações que provocam alterações fenotípicas drásticas, como as citadas, geralmente 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).

Porém, com o desenvolvimento das técnicas de análise de DNA, a possibilidade de analisar variações individuais nas seqüências de DNA, independentemente de corresponderem a um peptídeo ou não, permitiu o desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares. Nesse caso, cada segmento do DNA constitui um loco e os padrões correspondentes às variações de seqüência nesse segmento constituem fenótipos moleculares. Muitos desses marcadores se utilizam da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitiu a automação e a simplificação das etapas de obtenção dos padrões moleculares. Nessa técnica, segmentos de DNA específicos são replicados *in vitro* e isso resulta na produção de milhares de cópias da seqüência desejada, em quantidade suficiente para permitir a pronta visualização do DNA, sem a necessidade de métodos indiretos. Além disso, os produtos da PCR podem ser utilizados na construção de sondas e de moléculas recombinantes.

Os diversos tipos de marcadores moleculares revelam variações de seqüência oriundas de diferentes mecanismos de mutação e a escolha do tipo de marcador a ser utilizado depende essencialmente da aplicação, mas deve levar em conta dificuldade técnica, custo para a obtenção do número necessário de genótipos, informatividade, distribuição pelo genoma e o tipo de interação alélica.

Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

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. (1975), em adenovírus. Essa variação é o resultado de mutações de

ponto, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinada enzima, podendo também originar-se de eventos de inserção ou de deleção entre dois sítios de restrição adjacentes. Essa variação foi denominada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, sigla derivada de *restriction fragment length polymorphism*).

O método desenvolvido para adenovírus não produziu resultados satisfatórios em eucariotos superiores pois, 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 em vez 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 de náilon, imobilizados e desnaturados. Uma vez que a molécula de DNA tem tendência a formar fitas duplas complementares, um segmento de DNA de fita simples é utilizado como sonda. A sonda é marcada com um isótopo radioativo, como o ^{32}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.

As sondas utilizadas para a obtenção de marcadores do tipo RFLP podem ser ou não originadas de regiões codificadoras. O emprego de sonda de DNA complementar ao RNA mensageiro (cDNA) é o mais comum e apresenta a vantagem de não conter seqüências repetitivas. Sondagens anônimas, constituídas por 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 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.

Os marcadores de RFLP são co-dominantes e muitos dos locos descritos são dialélicos, quer originados de mutações de ponto quer de mutações estruturais. Marcadores dialélicos são bastante limitados para o mapeamento genético, em conseqüência do número de cruzamentos informativos, que é função do número de

progenitores que segregam para o marcador (heterozigotos) e do número de progênies nas quais se pode 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

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

Nesta equação, o primeiro membro corresponde à proporção de indivíduos heterozigotos na população, pressupondo-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 de RFLP são a presença de alelos raros, os quais fazem com que muitas populações apresentem padrão monomórfico, e o grau de dificuldade técnica. Como foi mencionado, a técnica original depende do desenvolvimento e da seleção de sondas com base em bibliotecas genômicas ou de cDNA e da identificação das combinações de sonda e endonuclease de restrição que revelam polimorfismos.

Para a análise de RFLP com a 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 com base em seqüências publicadas ou catalogadas em bases de dados, tais 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 do produto de amplificação podem ser então analisados em géis de agarose. A grande vantagem dos marcadores de RFLP para estudos de população é a reprodutibilidade dos padrões fenotípicos; isso permite a designação de alelos correspondentes a cada padrão de fragmentos de restrição, que podem ser facilmente

comparados entre as populações. São muito utilizados como método diagnóstico, quando, por exemplo, um loco de RFLP é associado a uma característica monogênica, tal como uma doença hereditária.

Microssatélites

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 utilizada para a produção de perfis característicos de cada indivíduo pela técnica de *DNA fingerprinting*. Essa técnica é de grande utilidade na identificação de indivíduos ou de 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 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.

Avanço importante na obtenção de marcadores hipervariáveis unilocais veio da utilização de uma classe de DNA repetitivo, as seqüências de microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*). Os microssatélites são caracterizados por repetições em tandem de um mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeo, localizadas dentro 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 microssatélites poli(G) e poli(A) são os mais simples, enquanto poli(GT) são os mais freqüentes, aparecendo em aproximadamente 5 a 10×10^4 locos individuais no genoma dos mamíferos. Muitos outros microssatélites foram identificados até o momento e é possível que qualquer seqüência de poucos nucleotídeos represente um microssatélite no genoma de eucariotos.

Os microssatélites podem ser amplificados de maneira específica pela técnica de PCR, utilizando *primers* que contém parte da seqüência flanqueadora. A amplificação resulta em produtos de diferente tamanho, 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 de microssatélites 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. A identificação dos produtos pode se valer de três estratégias:

1) Utilização de um dos *primers* marcados com isótopo radioativo. Essa marcação pode ser feita pela adição de [$\gamma^{32}\text{P}$] catalisada pela enzima T4-polinucleotideoquinase.

2) Marcação de um dos *primers* com fluoróforos e leitura em equipamento seqüenciador automático.

3) Coloração do gel por impregnação com prata.

O desenvolvimento de marcadores de microssatélites pode ser feito pela análise de seqüências contidas em bancos de dados, localizando-se aquelas que contêm SSR e delineando-se *primers* para a região que flanqueia a repetição. Outra estratégia é a seleção de fragmentos contidos em uma biblioteca genômica. A seleção dos clones que contêm microssatélites pode ser realizada pela hibridização das colônias que constituem a biblioteca com um oligonucleotídeo sintético marcado, composto pela repetição que se procura, por exemplo (dG-dT)₁₅ ou (dA-dA-dT)₁₀ para localizar as repetições de dinucleotídeos CA ou de trinucleotídeo TTA, respectivamente. Algumas metodologias utilizam o prévio enriquecimento das bibliotecas por meio de métodos que promovam a clonagem preferencial de fragmentos que contenham seqüências repetitivas.

Os clones positivos, isto é, aqueles que ficaram marcados após a hibridização, são isolados e seqüenciados para o desenvolvimento de *primers* complementares às seqüências flanqueadoras dos SSR.

Uma vez que os *primers* utilizados são complementares às seqüências de cópia única, obtém-se marcadores unilocais, altamente polimórficos e de herança

co-dominante. Esses atributos são de grande valor para a construção de mapas genéticos.

Distorções da segregação podem surgir em decorrência da “expansão” ou da “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 100 a 1.000 vezes. A instabilidade resultante tem sido associada com o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Simpson, 1996) e com doenças hereditárias, como a síndrome do cromossomo X frágil.

Ao considerar a frequência dessas seqüências e a média do tamanho do genoma de mamífero de 3×10^9 pares de nucleotídeos, seria possível construir mapas genéticos das espécies domésticas com aproximadamente 10.000 locos de microssatélites. Em bovinos e em outras espécies domésticas, como suínos, galinhas, ovelhas, cabras e cavalos, mapas genéticos saturados foram obtidos com marcadores de microssatélites (Vignal et al., 2002).

Apesar da informatividade e da distribuição regular dos microssatélites, a padronização da designação dos alelos é complexa, uma vez que na maioria dos locos, a diferença entre alelos é de apenas dois pares de bases e as estimativas de tamanho dos fragmentos pode variar entre equipamentos e entre técnicas. Essa variação dificulta a comparação de frequências alélicas obtidas em experimentos independentes.

Polimorfismos de um nucleotídeo

Os recentes avanços dos sistemas de seqüenciamento automatizado de ácidos nucléicos têm permitido que as seqüências de 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 de polimorfismos de nucleotídeos (SNPs, sigla derivada de *single nucleotide polymorphisms*). Apesar de tanto substituições quanto inserções ou deleções serem consideradas SNPs, é importante ter em mente que os dois tipos se originam de mecanismos de mutação distintos (Vignal et al., 2002). Apesar de haver muito mais possibilidades de transversões (substituições de uma purina por uma pirimidina ou

vice-versa) do que transições (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina), a razão observada entre o número de transições sobre o de transversões varia de 1,4 em humanos a 2,36 em galinhas (Vignal et al., 2002).

Os SNPs são marcadores atraentes para a análise genética, por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma ou em qualquer seqüência de interesse, por exemplo, em éxons de genes; isso pode ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente. Outras características importantes são a maior estabilidade, quando comparados aos marcadores de microssatélites, além da possibilidade de automação. Essa última é uma vantagem considerável em situações que exigem a análise de grande número de indivíduos e de marcadores, como no caso da utilização de marcadores aleatórios para *scans* completos de genomas para localização de QTL.

Muitos métodos podem ser utilizados para genotipar SNPs. A maioria se baseia na obtenção e na separação de produtos de PCR que são –específicos para um alelo. Isso pode ser conseguido por meio de digestão com enzimas de restrição, de extensão de *primer*, de polimorfismo de conformação de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* - SSCP), de espectrometria de massa (*matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry*), de piroseqüenciamento e de transferência de energia ressonante (FRET); estes três últimos métodos requerem equipamentos específicos. Mais recentemente, métodos que utilizam a hibridização alelo-específica em arranjos de alta densidade surgiram como alternativa para a obtenção de SNPs em escala genômica. Apesar do elevado custo dessa metodologia, a utilização de *pools* de DNA tem sido proposta como alternativa para redução do custo em estudos de associação (Pearson et al., 2007).

A maioria dos marcadores do tipo SNPs são dialélicos, que resultam, como discutido anteriormente, em pouca informação por loco. Do ponto de vista de mapeamento, cinco marcadores desse tipo fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco de microssatélite, de tal forma que os mapas de SNPs devem ter densidade maior do que os de microssatélites para se obter o mesmo poder de detecção de QTL. Porém, a densidade necessária ao mapeamento fino de QTL só pode ser obtida com esse tipo de marcador (Vignal et al., 2002).

Mapeamento de QTL

O mapeamento de QTL, ou seja, a detecção, a localização e a estimativa do efeito de regiões do genoma associadas a uma característica quantitativa requer grande número de animais para os quais estejam disponíveis dados de avaliação do fenótipo de interesse. O número de indivíduos necessários depende da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade do caráter e da estrutura da população, entre outros fatores, porém, esse número é freqüentemente da ordem de milhares. Esse requisito é particularmente restritivo em animais de grande porte, nos quais o custo de produção e de manutenção de grandes populações experimentais é elevado.

As populações comerciais têm sido úteis para o mapeamento de QTL em bovinos de leite, dos quais grandes progênies de touro, resultantes do uso intensivo de inseminação artificial, podem ser encontradas. Georges & Andersson (2003) apontaram como vantagem para o mapeamento de QTL em gado leiteiro a intensa anotação de dados referentes a avaliações fenotípicas, tais como medidas de qualidade do leite, avaliações da saúde do animal, avaliações morfométricas e informações de *pedigree* e de manejo, principalmente nos países mais desenvolvidos.

Essa situação entretanto não se aplica a bovinos de corte, cujas famílias são menores e cuja quantidade de características fenotípicas avaliadas é restrita. Além disso, características de difícil avaliação, tais como taxa de ovulação, maciez da carne e resistência a doenças, raramente são consideradas em programas de melhoramento, requerendo a utilização de populações experimentais, as quais devem ser obtidas mediante a utilização de algum delineamento genético, tais como F2, retrocruzamento ou famílias de meios-irmãos. Os resultados mais promissores de identificação de marcadores associados a caracteres de interesse econômico são os relatados com suínos, de que 1.675 QTL foram descritos em mais de 100 publicações (Rothschild et al., 2007) e algumas mutações em genes, ou em desequilíbrio de ligação com a mutação causal, têm sido regularmente utilizadas pela indústria de melhoramento de suínos.

O mapeamento de QTL em espécies domésticas beneficia-se do reduzido tamanho efetivo das populações, pois a maioria das raças são formadas a partir de pequeno número de animais fundadores. Esse fato leva à redução da complexidade

das características dentro de raças, uma vez que poucos alelos estão representados na população.

A utilização de pequeno número de indivíduos selecionados para dar origem à próxima geração leva ao aumento de endogamia e ao conseqüente aumento da probabilidade de a progênie receber dos parentais regiões do genoma que são idênticas por descendência, que podem conter alelos recessivos deletérios, ou seja, que causam doenças, malformações ou anomalias hereditárias. A utilização de marcadores como método diagnóstico para eliminar animais portadores de alelos deletérios está entre as mais promissoras aplicações dessa tecnologia. Como exemplo, podemos citar a mutação responsável pela síndrome do estresse dos suínos (Rothschild et al., 2007), a mutação no gene que codifica a proteína CD18, responsável pela síndrome de deficiência de adesão dos leucócitos, que afeta bovinos da raça Holandesa (Shuster et al., 1992), e a recente descrição de mutações independentes no gene LRP4 (*lipoprotein receptor-related protein 4*) relacionadas à sindactilia dos bovinos (Drogemuller et al., 2007).

Seleção assistida por marcadores

A seleção assistida por marcadores (MAS) tem por objetivo aumentar a acurácia da seleção. Porém, quando se utiliza MAS, apenas alguns dos genes que contribuem para a variação do caráter selecionado são avaliados. Assim, a utilização de informação de genótipo para o marcador, sem considerar as avaliações de diferença esperada na progênie, que fornecem uma visão do componente quantitativo não explicado pelo marcador, pode conduzir à rápida fixação do alelo de QTL selecionado e à maior perda de variabilidade durante o processo de seleção. A MAS deve ser realizada concomitantemente à seleção tradicional, pois dar grande ênfase a somente um marcador poderá ocasionar perda da variabilidade em outros locos e restringir a seleção no longo prazo, resultar em efeito carona ou na fixação de alelos desfavoráveis por deriva na porção do genoma não associada ao marcador. Segundo Van Eenennaam (2007), os benefícios da MAS são maiores nas características que têm baixa herdabilidade, nas que são difíceis ou caras para mensurar e nas que não podem ser medidas antes que o animal contribua para dar origem à próxima geração. Outras características que podem ser beneficentemente selecionadas com MAS são produção de leite, habilidade materna, resistência a

doenças, rendimento de carcaça, desempenho de crescimento, fertilidade, eficiência reprodutiva e características limitadas pelo sexo.

Os maiores avanços na área de MAS deverão ser experimentados quando as novas tecnologias de análise de marcadores, tais como microarranjos de DNA, que permitem a investigação simultânea de grande número de marcadores, chegarem a um custo compatível com a aplicação. Nesse caso, a seleção será feita com base no genoma do animal e não mais em informações pontuais de poucos genes.

Aliadas às técnicas de análise do genoma funcional e da genômica comparada, as informações sobre QTL deverão rapidamente conduzir à descoberta de genes e de mutações causais, aquelas que determinam a variação fenotípica. A compreensão dos mecanismos biológicos e do controle genético das características de interesse será um campo aberto para a manipulação da expressão de genes, quer via transgênese, quer via técnicas de expressão transitória, tais como o RNA de interferência.

Caracterização de recursos genéticos

Uma das premissas fundamentais do melhoramento é a existência de variabilidade genética nas características a serem selecionadas. O processo de melhoramento leva à fixação de caracteres e à perda de variabilidade, quer intencionalmente, por meio de seleção, quer acidentalmente, por meio de deriva genética resultante do reduzido tamanho efetivo das populações. A conservação de recursos genéticos animais tem por objetivo manter os repositórios de alelos e de combinações alélicas que podem vir a suprir necessidades do melhoramento animal, inclusive para nichos pouco privilegiados pelos objetivos da indústria agropecuária, como genes relacionados à adaptação a condições tropicais e de baixo investimento tecnológico (INTERNATIONAL, 2007).

Entretanto, quando se trata de animais domésticos, a manutenção de recursos genéticos requer extensas áreas e representa custo razoável. A utilização de marcadores moleculares permite o monitoramento da variabilidade genética e a estimativa de parâmetros populacionais, tais como o coeficiente de endogamia. Nas populações em que não há registro genealógico, é possível identificar a paternidade, apesar de esse processo requerer a análise de grande número de marcadores ou de padrões de *DNA-fingerprints*.

A análise de diversidade intrapopulacional pode também ser utilizada como método para identificar os acessos que constituem a menor coleção em que está representada a máxima variabilidade genética de uma unidade de preservação (*core collection*). Esse conceito tem sido amplamente utilizado em recursos genéticos vegetais e foi recentemente proposto para o manejo de coleções de animais domésticos (Egito, 2007).

Considerações finais

Os avanços metodológicos dos últimos 50 anos permitiram o desenvolvimento de um número ilimitado de marcadores moleculares. A escolha do marcador adequado a cada situação depende principalmente do objetivo do trabalho. Para construção de mapas genéticos e para mapeamento de QTL, marcadores altamente informativos podem ser melhores, porém, quando se deseja a construção de mapas de alta densidade, mesmo que menos informativos, os SNPs são mais adequados, pois se apresentam em maior frequência nos genomas. Para fins de comparação de populações, além do conteúdo de informação polimórfica, a reprodutibilidade dos fenótipos moleculares é um dos fatores a ser considerado.

Referências bibliográficas

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, n. 3, p. 314-331, 1980.

DROGEMULLER, C.; LEEB, T.; HARLIZIUS, B.; TAMMEN, I.; DISTL, O.; HOLTERSHINKEN, M.; GENTILE, A.; DUCHESNE, A.; EGGEN, A. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (*LRP4*). **BMC Genetics**, v. 8, p. 5, 2007.

EGITO, A. A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 246f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

GEORGES, M.; ANDERSSON, L. Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. In: COLD SPRING

HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY, 68., 2003. **Anais...** Cold Spring: Harbor Laboratory Press, p. 179-188, 2003.

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, v. 1, p. 439-446, 1975.

HOLMES, N. G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. **British Veterinary Journal**, v. 150, n. 5, p. 411-421, 1994.

INTERNATIONAL LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE. **Improving utilization of farm animal genetic resources**. Disponível em: <<http://www.ilri.org/research/Content.asp?SID=15&CCID=41>>. Acesso em: 05 de junho 2007.

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 Evolution**, v. 41, n. 3, p. 277-283, 1995.

KADARMIDEEN, H. N.; ROHR, P. von; JANSS, L. L. G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 6, p. 548-564, 2006.

PEARSON, J. V.; HUENTELMAN, M. J.; HALPERIN, R. F.; TEMBE, W. D.; MELQUIST, S.; HOMER, N.; BRUN, M.; SZELINGER, S.; COON, K. D.; ZISMANN, V. L.; WEBSTER, J. A.; BEACH, T.; SANDO, S. B.; AASLY, J. O.; HEUN, R.; JESSEN, F.; KOLSCH, H.; TSOLAKI, M.; DANIILIDOU, M.; REIMAN, E. M.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; HUTTON, M. L.; STEPHAN, D. A.; CRAIG, D. W. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 1, p. 126-139, 2007.

ROTHSCHILD, M. F.; HU, Z. L.; JIANG, Z. Advances in QTL mapping in pigs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 192-197, 2007.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI Jr, M. E.; ACKERMANN, M. R.; GILBERT, O. R. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9225-9229, 1992.

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.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

STORMONT, C.; CUMLEY, R. W. Cellular antigens in cattle blood. **Journal Heredity**, v. 34, p. 35-41, 1943.

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, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

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: 05 de junho 2007.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

MAPAS DO GENOMA DE ANIMAIS DE INTERESSE ECONÔMICO: ESTRATÉGIAS ATUAIS PARA CONSTRUÇÃO E UTILIZAÇÃO

Melissa Nunes Miziara e Maria Elisabete Jorge Amaral

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Palavras-chave: mapeamento, genoma, animais de interesse econômico.

O melhoramento genético de espécies animais de interesse econômico vem ocorrendo a milhares de anos por meio da domesticação e da seleção de fenótipos desejáveis. Entretanto, o cruzamento de animais com características comercialmente interessantes fornece poucas informações a respeito de quais fatores são responsáveis por estes caracteres e de como manipulá-los para se obter o melhoramento genético desses animais mais eficientemente (Ruvinsky & Graves, 2005).

A genética, que tem como um dos primeiros objetivos estudar os padrões de herança dos genes, tornou-se limitada para que pudéssemos alcançar um nível superior de conhecimento sobre o genoma completo de diversas espécies. Em virtude do desenvolvimento de novas técnicas e de novas estratégias de estudo do DNA para o Projeto Genoma Humano, grandes avanços foram obtidos nas pesquisas genéticas que envolvem animais de interesse econômico, mediante aplicação dessas mesmas tecnologias para melhor conhecer e para manipular o genoma destas espécies.

Surge então o que chamamos de “a era da genômica”, em que estratégias avançadas são utilizadas com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a estrutura e sobre o funcionamento de genomas inteiros (Hocquette, 2005). A Genômica é dividida em duas subáreas: a genômica estrutural e a genômica funcional. A primeira tem por objetivo caracterizar a natureza física (DNA) dos genomas, por meio da identificação e da localização dos genes, e a segunda estuda a expressão dos genes, ou seja, o funcionamento do genoma (Hocquette, 2005).

Em espécies de animais de interesse econômico, a genômica estrutural vem permitindo avanços significativos quanto à localização e à organização dos genes

por meio do mapeamento genômico, que é definido como a indicação de um gene a um *locus* (região específica) no cromossomo e o posicionamento desse gene em relação a outros genes encontrados no mesmo cromossomo (Womack, 2005).

Atualmente, os mapas genômicos são divididos em três categorias: mapas genéticos ou de ligação; mapas físicos, que abrangem os mapas de sintonia, citogenético e de híbridos irradiados (RH); e mapas moleculares ou de seqüências de DNA (Ruvinsky & Graves, 2005). Para que a seqüência de DNA do genoma de um animal de interesse econômico seja elucidada e para que todos seus genes sejam conhecidos, diferentes tipos de mapas vêm sendo desenvolvidos com base na utilização das estratégias de mapeamento do genoma humano. Essas estratégias definem desde a simples indicação de um gene a um cromossomo até a obtenção da sua seqüência completa de bases (CURSO, 2003).

O mapeamento genômico em animais de interesse econômico é importante por quatro motivos principais: para localizar genes responsáveis por características comercialmente importantes, tais como produção de leite e maciez de carne; para localizar genes associados a doenças, sejam eles envolvidos na patogênese ou na resistência à doença; para procurar genes que sirvam como modelo no estudo dos efeitos de doenças genéticas humanas; e finalmente, para estudar os mecanismos de rearranjos cromossômicos que resultaram na evolução das diferentes espécies de mamíferos (CURSO, 2003; Womack, 2005).

Como iniciar os estudos de mapeamento do genoma de uma espécie de mamífero de interesse econômico?

O primeiro passo é saber quais genes pertencem a um mesmo cromossomo. Essa informação é obtida construindo-se o mapa denominado *sintênico* ou *de sintonia*. Esse tipo de mapa, que é construído sem a necessidade de cruzamento sexual, é feito por meio da utilização de um conjunto de linhagens de células híbridas resultantes da fusão do genoma das células de uma espécie “hospedeira” com o genoma das células da espécie de interesse (Ruvinsky & Graves, 2005). Cada linhagem celular apresenta o conjunto completo do genoma hospedeiro mais um ou dois cromossomos inteiros do genoma em estudo. O mapeamento de um grupo de genes se dá utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNA de todas as linhagens celulares do conjunto, seguida da análise

estatística do padrão de presença ou de ausência do gene nas diferentes linhagens celulares (Ruvinsky & Graves, 2005). Genes com padrões de presença e de ausência parecidos são categorizados em um mesmo grupo de sintenia. Entretanto, o mapa de sintenia não fornece informações quanto à ordem dos genes no cromossomo e quanto a qual cromossomo esse grupo de genes pertence (Ruvinsky & Graves, 2005).

Como saber em qual cromossomo um grupo de sintenia está localizado?

Para obter essa informação, é preciso gerar outro tipo de mapa, o *mapa citogenético*. Este mapa é construído por meio da técnica de hibridização *in situ*, que utiliza seqüências de DNA (sondas) complementares aos genes-alvo, para hibridizar em cromossomos metafásicos do genoma de interesse contidos em lâminas de microscópio (Ruvinsky & Graves, 2005). Diferente do mapa de sintenia, o mapa citogenético permite a visualização dos genes nos cromossomos, pois a ligação da sonda ao gene produz um sinal visível que permite identificar o gene no cromossomo. Assim, os grupos de sintenia passam a pertencer a um cromossomo do cariótipo da espécie, sendo possível diferenciar em qual braço ou em qual região do cromossomo os genes estão localizados (Ruvinsky & Graves, 2005). Entretanto, a ordem e a distância desses genes ainda não são conhecidas, pois o mapa citogenético, apesar de ser classificado como um tipo de mapa físico, é um mapa de baixa resolução, ou seja, pouco detalhado.

Como conhecer a ordem dos genes e a distância entre eles no cromossomo?

Existem duas estratégias que permitem identificar a ordem e a distância entre os genes: o *mapeamento genético* e o *mapeamento RH* – que utiliza células híbridas irradiadas (Ruvinsky & Graves, 2005). O *mapa genético* fornece a ordem dos genes em um cromossomo com base na frequência de recombinação entre eles (Griffiths et al., 2006). Sabemos que cada indivíduo diplóide possui duas cópias de cada gene em suas células – cada cópia localizada em um cromossomo homólogo. Quando essas cópias são iguais, ou seja, quando a forma do gene (alelo) representada é a mesma nos dois cromossomos homólogos, dizemos que o indivíduo é homozigoto para o gene (DICTIONARY, 2007). Quando os cromossomos homólogos possuem

alelos diferentes, dizemos que o indivíduo é heterozigoto para o gene (Griffiths et al., 2006).

Durante o processo de formação dos gametas (meiose), esses cromossomos podem trocar pedaços por meio do mecanismo chamado recombinação ou *crossing-over* (DICTIONARY, 2007). Nos gametas resultantes, os cromossomos podem conter os mesmos alelos do parental ou cromossomos recombinantes com combinações de alelos diferentes daquelas do parental (Griffiths et al., 2006).

Em 1911, um aluno de Thomas Hunt Morgan (descobridor do *crossing-over*), Alfred Sturtevant, utilizou a teoria da recombinação para gerar o primeiro mapa de ligação. A hipótese criada para a construção do mapa foi a seguinte: quanto menor for a distância entre dois genes em um mesmo cromossomo, tanto maior será a chance de eles serem herdados juntos – ligados (Ruvinsky & Graves, 2005).

Dessa forma, um mapa genético é construído pela análise da herança dos genes a partir dos progenitores para a prole, e para tanto é necessário o cruzamento sexual entre os animais para se observar a recombinação meiótica (Ruvinsky & Graves, 2005). Por meio da genotipagem (análise dos genótipos) dos pais e da progênie de uma família em relação a um par de genes, é possível determinar se eles estão sendo herdados ligados ou independentes (em cromossomos diferentes) (Ruvinsky & Graves, 2005). Um conjunto de genes ligados forma um grupo de ligação. A distância entre eles é dada em centiMorgan (cM); 1 cM representa 1% de probabilidade de um gene ser separado de seu vizinho pelo processo de recombinação meiótica (DICTIONARY, 2007).

Apesar de fornecer a ordem e a distância entre genes ligados, o mapa de ligação apresenta diversas limitações que o tornam pouco detalhado. Os grupos de ligação possuem informações quanto à ordem e à distância entre os genes, mas não fornece a posição do conjunto no cromossomo (Rexroad, 1999). Sua construção depende ainda da presença de indivíduos heterozigotos na família para que os alelos possam ser diferenciados na análise de recombinação (Ruvinsky & Graves, 2005). Além disso, a estratégia necessita que os genes apresentem diferentes alelos (polimorfismo), para que possam ser observados na população (Rexroad, 1999). Essa necessidade limita esta técnica, já que os genomas dos mamíferos são altamente conservados e os genes tendem a conter poucos alelos.

Assim, os mapas de ligação possuem poucos genes e a maioria de *microsatélites*, seqüências de DNA não codificantes que contêm pequenas repetições de um a seis pares de base (Ruvinsky & Graves, 2005). Os *microsatélites* são encontrados espalhados no genoma e apresentam alto grau de polimorfismo devido à presença de vários alelos diferenciáveis pelo número de repetições que possuem (Griffiths et al., 2006). Adicionalmente, existem regiões do genoma que possuem baixas taxas de recombinação meiótica e que não podem ser estudadas utilizando esta estratégia (Ruvinsky & Graves, 2005). Mesmo assim, os mapas genéticos são importantes, pois descrevem como os genes são transmitidos através das gerações.

No final do século XX, uma nova estratégia revolucionou os estudos de mapeamento do genoma de animais de interesse econômico. O *mapeamento RH*, inicialmente desenvolvido para o genoma humano em 1990, foi aplicado em 1997 ao primeiro genoma animal de importância econômica, o genoma bovino (Womack, 2005).

A estratégia que origina um *mapa RH* (classificado como um tipo de mapa físico) é uma adaptação da metodologia aplicada ao mapeamento sintênico. Neste caso, um conjunto de células híbridas é obtido fusionando-se as células hospedeiras às células da espécie de interesse, cujos cromossomos foram previamente fragmentados por radiação (Cox et al., 1990). As linhagens celulares híbridas denominadas *irradiadas* contêm diferentes combinações dos fragmentos cromossômicos do genoma de interesse e juntas representam o genoma completo da espécie-alvo (Cox et al., 1990). Essas linhagens são analisadas estatisticamente quanto à presença ou à ausência dos genes e a hipótese elaborada para a construção do mapa é parecida com aquela da análise de ligação: quanto mais próximos dois genes estiverem localizados em um cromossomo, tanto maior será a probabilidade de se encontrarem juntos no mesmo fragmento cromossômico (Ruvinsky & Graves, 2005). A unidade de distância do mapa RH é o centiRay (cR); 1 cR equivale a 1% de probabilidade de quebra entre dois genes após a exposição de determinada dosagem de radiação, a qual define a resolução do mapa (Cox et al., 1990).

A principal vantagem do mapeamento RH em relação ao mapeamento por ligação é, sobretudo, localizar e ordenar fisicamente um gene ou qualquer outra

seqüência de DNA sem a necessidade de polimorfismo ou de acompanhamento de indivíduos heterozigotos em famílias (Rexroad, 1999). Essa vantagem trouxe uma conseqüência importante para o estudo do genoma de espécies de interesse econômico: a possibilidade de construir outro tipo de mapa denominado *mapa comparativo* (Womack, 2005).

O mapeamento comparativo utiliza informações de genomas altamente caracterizados para localizar seqüências de DNA em genomas pouco documentados, baseando-se na conservação existente entre os genomas de mamíferos (Ruvinsky & Graves, 2005). Assim, a partir das informações dos diferentes tipos de mapas do genoma humano e de camundongo (que possuem a maior quantidade de informações dentre os genomas de mamíferos), começaram a ser construídos mapas comparativos com maior detalhamento para o genoma de animais de interesse econômico, tais como o boi, o cavalo, o porco e a ovelha (Goldammer et al., 2002).

Apesar das vantagens do mapeamento RH, a distância entre os genes ainda não é fornecida com a exatidão necessária para sua manipulação individual.

Mas, então, como conhecer a distância real entre os genes em determinado cromossomo, ou seja, em uma molécula de DNA?

O mapa mais detalhado possível de se obter é o *mapa molecular* ou o *mapa de seqüências de DNA*, que é construído por meio da identificação e da ordenação de um conjunto de fragmentos clonados de DNA, que, quando superpostos, representam todo um cromossomo ou todo um genoma (Griffiths et al., 2006). Organizado em pares de base, o mapa molecular fornece a distância exata entre os genes. Assim, é possível estudar detalhadamente o funcionamento gênico, já que a localização de um gene não é casual no genoma e envolve seqüências de DNA adjacentes ou até mesmo distantes do próprio gene, mas que são responsáveis pelo controle de sua expressão (Ruvinsky & Graves, 2005).

Entretanto, a obtenção da seqüência completa de bases de um genoma por si só não é suficiente para conhecermos todos os genes e seu funcionamento. Sabemos que todos os genomas são compostos pelas mesmas bases nitrogenadas (A, T, C e G) e simplesmente conhecer a seqüência de todas as bases que compõem um genoma não basta para sabermos onde um gene e suas seqüências

reguladoras estão localizados. Por isso, a construção de diferentes tipos de mapas e a integração entre eles é que vai permitir um conhecimento mais aprofundado sobre todos os genes do genoma, desde a sua localização precisa até o seu funcionamento (Ruvinsky & Graves, 2005). A localização e o funcionamento dos genes representam pontos-chave para estudos de características economicamente importantes e para a manipulação de genes que tenha por objetivo a obtenção de fenótipos desejáveis e possíveis curas de doenças.

Referências bibliográficas

COX, D. R.; BURMEISTER, M.; PRICE, E. R.; KIM, S.; MYERS, R. M. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. **Science**, v. 250, n. 4978, p. 245-250, 1990.

CURSO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PRODUÇÃO ANIMAL, 4., 2003, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2003. 64 p.

DICTIONARY of genetic terms. Disponível em: <http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/primer2001/glossary.shtml>. Acesso em 28 maio 2007.

GOLDAMMER, T.; KATA, S. R.; BRUNNERDAGGER, R. M.; DORROCHDAGGER, U.; SANFTLEBENDAGGER, H.; SCHWERINDAGGER, M.; WOMACK, J. E. A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2106-2111, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à genética.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 764 p.

HOCQUETTE, J. F. Where are we in genomics? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, supl. 3, p. 37-70, 2005.

REXROAD, C. E. **Radiation hybrid mapping of bovine chromosome one.** 1999. 125 f. Tese (Doutorado em Veterinary Pathobiology) – Texas A&M University, College Station, Texas, USA, 1999.

RUVINSKY, R.; GRAVES, J. M. **Mammalian genomics.** Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, 2005. 600 p.

WOMACK, J. E. Advances in livestock genomics: opening the barn door. **Genome Research**, v. 15, p. 1699-1705, 2005.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA ANÁLISE DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS

Henrique Nunes de Oliveira

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Locos de características quantitativas (QTL, de *quantitative trait loci*) são definidos como regiões do genoma responsáveis pela expressão de uma ou mais características quantitativas. Em princípio, portanto, um QTL é um poligene. Contudo, existe uma diferença básica. Um poligene é um dos infinitos genes com efeito infinitesimal sobre a característica, enquanto um QTL é um gene com efeito importante sobre a característica. Assim, para trabalhar com QTL, em princípio, há de se modificar a idéia sobre a arquitetura genética (controle genético) das características quantitativas. O mapeamento de QTLs fornece respostas sobre esta arquitetura genética. Perguntas sobre a quantidade de genes responsáveis pela expressão das características, sobre a segregação destes genes, sobre a importância relativa de um deles, sobre a distribuição destes genes pelo genoma, entre outras, estão sendo respondidas por vários estudos.

Saber onde se encontram os genes pode ajudar a distinguir entre efeitos de pleiotropia e de ligação gênica. Também torna possível separar os efeitos aditivos e de dominância em locos isolados e indicar a direção da razão de dominância nos vários locos. Além disto, é possível verificar os efeitos da interação entre locos (epistasia).

Se for possível a identificação de QTLs fisiologicamente associados a características economicamente importantes, pode-se utilizar estas informações nos modelos de avaliação genética em um processo conhecido como seleção assistida por marcadores (MAS – de *marker-assisted selection*; Mullen et al., 2006). A aplicação deste tipo de seleção é especialmente importante nos casos de características com herdabilidade baixa, de características difíceis de medir ou de medidas realizadas muito tardiamente na vida dos animais.

Segundo Mullen et al. (2006), há dois caminhos para a identificação de marcadores a serem utilizados em MAS. Entretanto, em qualquer dos casos, uma

das dificuldades é que, nas situações em que a MAS é mais útil, as medidas fenotípicas para a detecção dos QTLs são, também, de difícil obtenção.

A primeira abordagem é a do gene-candidato. O seqüenciamento de locos que supostamente participam de vias metabólicas importantes para a expressão da característica em indivíduos fenotipicamente divergentes permite a identificação de polimorfismos. Polimorfismos de nucleotídeos em regiões codificadoras podem causar mudanças na seqüência de aminoácidos e, assim, dar origem a variantes fenotípicas. Inserções ou deleções podem resultar no aparecimento de, por exemplo, seqüências regulatórias fora de posição, como no caso da hipertrofia muscular dos bovinos (Switonski, 2002). Assim, métodos estatísticos passam a ser empregados para buscar associar esta variação à expressão das características. A grande desvantagem deste método é a necessidade de conhecimento da fisiologia da característica, o que nem sempre está disponível. Além disto, muitos outros genes que não são parte de vias metabólicas conhecidas podem alterar o efeito do gene-candidato (epistasia).

A segunda abordagem é o mapeamento de QTLs em regiões mais amplas dos cromossomos, seguida de refinamentos para regiões mais estreitas até encontramos localizações confiáveis do QTL. A limitação neste caso é o tempo necessário para chegar a resultados, que pode levar vários anos em alguns casos. Na prática, as duas abordagens acabam se misturando. Informações obtidas com base em estudos de mapeamento do genoma bovino, além de informações do genoma de outras espécies, podem ser úteis para acelerar o processo de identificação dos genes envolvidos com as diversas características de interesse econômico e o mapeamento dos QTLs.

Mapeamento de QTLs

A partir do trabalho de Sax em 1923 (citado por Kearsey & Pooni, 1996), vários trabalhos foram realizados para tentar encontrar marcadores com características quantitativas. O uso de marcadores enzimáticos ampliou as possibilidades de uso dos QTLs. Mas foi o desenvolvimento de técnicas para detecção de polimorfismos de DNA que permitiu pensar na possibilidade de encontrar QTLs em quantidade que viabilizasse seu uso em programas de melhoramento.

O mapeamento de QTLs, diferentemente da determinação da posição de um gene com característica qualitativa, é difícil, porque o mesmo fenótipo pode ser gerado por diferentes genótipos e porque diferentes fenótipos podem ser gerados pelo mesmo genótipo. Por isto, os marcadores moleculares, por permitirem identificação do genótipo, são fundamentais para o mapeamento dos QTLs. Estes marcadores segregam genes simples, obedecendo ao princípio da genética mendeliana, e não são influenciados pelo ambiente. Os marcadores moleculares permitiram a construção de mapas de ligação do genoma das diversas espécies de bovinos domésticos com grande qualidade. Estes mapas podem ser encontrados em diversos *sites*.

Os mapas de ligação são construídos com base na proporção de recombinação entre os locos e são utilizados no planejamento de experimentos delineados para a localização dos QTLs. Busca-se a partir destes mapas a associação entre os marcadores que possuem posição conhecida no genoma e o fenótipo dos animais.

Do ponto de vista estatístico, os métodos para mapeamento de QTLs são baseados em três classes: regressão, máxima verossimilhança e modelos bayesianos. O método mais simples, de análises com um único marcador, identifica QTLs com base nas médias fenotípicas dos diferentes marcadores, mas não consegue separar as estimativas da fração recombinante do efeito do QTL. O mapeamento por intervalo clássico (IM; Lander & Botstein, 1989) é baseado em máxima verossimilhança e utiliza um teste de razão de verossimilhança para apontar a posição do QTL. O uso da regressão no IM foi proposto para aproximar os resultados da máxima verossimilhança e economizar tempo de computação para uma ou múltiplas posições no genoma. A maior desvantagem do IM é que as estimativas das posições dos QTLs podem ser viciadas quando existirem outros QTLs ligados. No mapeamento por intervalo composto (CIM), o IM é combinado com análise de regressão para marcadores múltiplos, o que permite controle sobre os efeitos de QTLs de outros intervalos ou de cromossomos no QTL que está sendo testado. Os modelos bayesianos, apesar da grande flexibilidade, tanto na implementação dos modelos quanto nas inferências com base nos resultados, não têm sido utilizados amplamente nas análises de mapeamento de QTL.

Populações

Diz-se que uma população encontra-se em equilíbrio de ligação quando, para dois locos **M** e **Q**, as frequências com que os quatro tipos de gametas são formados (com relação aos dois locos) obedecerem à seguinte regra: $f(MQ) \times f(mq) = f(Mq) \times f(mQ)$. Assim, a proporção de cromossomos com loco **M** que portam também o loco **Q** é igual à proporção daqueles com loco **m** que portam também o loco **Q** e, da mesma forma, loco **M** para **q** e loco **m** para **q**. Quando se tomarem animais desta população ao acaso, não haverá como saber a qual alelo do QTL os alelos do marcador estarão associados e a simples comparação de indivíduos que portam um ou outro alelo do marcador (**M**) não permitirá detectar a presença do QTL. Assim, são geradas populações experimentais em desequilíbrio de ligação, para facilitar o mapeamento de QTLs. Na verdade existem alguns delineamentos específicos para o mapeamento de QTLs em populações em equilíbrio de ligação, mas, a fim de ilustrar os métodos estatísticos para a detecção de QTLs, será utilizada uma população formada pelo cruzamento de indivíduos provenientes de populações endogâmicas retrocruzados com uma das populações parentais.

Portanto, o objetivo de se criar populações experimentais para a detecção de QTLs é produzir desequilíbrio de ligação, de modo que seja mais simples associar fenótipo e genótipo. As populações experimentais são formadas com base em cruzamentos de linhagens endogâmicas. Na verdade, como a base para formação das raças é a endogamia, pode-se utilizar as raças puras em lugar de linhagens endogâmicas. As conseqüências do relaxamento desta suposição serão discutidas posteriormente. Supõe-se que tanto o marcador quanto o QTL que foram fixados sejam diferentes nas duas linhagens ou raças. Em relação ao marcador, isto é verificado na genotipagem, mas, quanto ao QTL, podemos apenas supor que sejam diferentes.

Métodos estatísticos aplicados às populações em retrocruzamentos

Existem diversos métodos estatísticos aplicáveis nas análises de dados para mapeamento de QTL e cada um deles pode ser aplicado de maneira semelhante, independentemente da estrutura populacional, embora alguns sejam mais vantajosos do que outros em determinadas estruturas. Optou-se por apresentar a

análise na população formada por retrocruzamentos e depois comentar a extensão do método para as demais estruturas populacionais.

Análise de variância

Com base nos dados fenotípicos e na genotipagem dos animais de acordo com o marcador, é possível tentar estabelecer a relação entre o genótipo e o fenótipo dos animais. Neste caso, a análise de variância, quando se colocar o marcador como efeito classificatório de quantificação das diferenças entre os portadores de diferentes alelos para o marcador, será bastante eficiente.

Para aplicar o método da análise de variância aos dados coletados em uma população do tipo escolhido, deve-se, primeiramente, determinar os fatores que podem influenciar a expressão fenotípica dos indivíduos, além do genótipo. Fatores como sexo e idade da mãe devem fazer parte do modelo de análise de variância. O genótipo do marcador entra no modelo como variável classificatória. Os testes estatísticos visam comparar as duas classes genotípicas com relação ao fenótipo. Um efeito significativo do marcador implica que o marcador está ligado ao QTL. O efeito estimado do QTL é, então, aproximadamente, igual à diferença entre as médias, e a localização do QTL é, aproximadamente, igual à localização do marcador.

A simplicidade deste método é seu principal atrativo. Pode se estender facilmente para vários locos e para delineamentos com mais de dois marcadores e não é necessário um mapa para determinar o efeito do QTL. Além disto, este método permite que se incluam efeitos de outros fatores no modelo de análise. Entretanto, o principal defeito deste método é que ele não permite separar o efeito do QTL da sua distância do marcador. Além disto, no caso de marcadores múltiplos, observam-se apenas aqueles que têm o maior efeito sobre o fenótipo e a informação sobre os indivíduos não genotipados é perdida.

A diferença de mérito entre a progênie que recebe o alelo **M** e aquela que recebe o alelo **m** do pai F1 é igual a $\Delta(1 - 2r)$, como se pode ver na Figura 1.

$$\begin{aligned}
\mu_{QQ} &= \text{m\u00e9dia dos animais QQ} \\
\mu_{Qq} &= \text{m\u00e9dia dos animais Qq} \\
\Delta &= \mu_{Qq} - \mu_{QQ} \\
\mu_{MM} &= (1-r)\mu_{QQ} + r\mu_{Qq} = \mu_{QQ} + r\Delta \\
\mu_{Mm} &= (1-r)\mu_{Qq} + r\mu_{QQ} = \mu_{Qq} - r\Delta \\
\mu_{Mm} - \mu_{MM} &= (\mu_{Qq} - r\Delta) - (\mu_{QQ} + r\Delta) \\
\mu_{Mm} - \mu_{MM} &= \Delta(1-2r)
\end{aligned}$$

Figura 1. Comparação entre as m\u00e9dias dos gen\u00f3tipos **MM** e **Mm** de uma popula\u00e7\u00e3o experimental em retrocruzamentos.

Observa-se, portanto, que, para o mesmo efeito (Δ) do QTL, a diferen\u00e7a entre as m\u00e9dias dos dois gen\u00f3tipos para o marcador vai depender da taxa de recombina\u00e7\u00e3o (r) entre o marcador e o QTL. Por um lado, se a dist\u00e2ncia entre o QTL e o marcador for nula ($r = 0,0$), ent\u00e3o a diferen\u00e7a entre os alelos ser\u00e1 igual ao efeito do QTL. Por outro lado, se a dist\u00e2ncia para o marcador for grande ($r = 0,5$) ent\u00e3o n\u00e3o haver\u00e1 diferen\u00e7a entre as m\u00e9dias dos alelos do marcador, mesmo que o efeito do QTL seja muito grande.

Idealmente, deve-se reduzir ao m\u00e1ximo a vari\u00e2ncia dentro de cada classe gen\u00f3tica, o que significa que, al\u00e9m de controlar todos os efeitos conhecidos (tais como sexo, manejo e idade), deve-se, tamb\u00e9m, controlar os efeitos de outros marcadores (QTLs) conhecidos.

An\u00e1lise de regress\u00e3o

A an\u00e1lise de regress\u00e3o apresenta resultados id\u00eênticos aos da an\u00e1lise de vari\u00e2ncia nas situa\u00e7\u00f5es mais simples. Por\u00e9m, em situa\u00e7\u00f5es mais complexas, a an\u00e1lise de regress\u00e3o pode ser bem mais \u00fatil.

Para aplicar o m\u00e9todo da an\u00e1lise de regress\u00e3o deve-se, primeiramente, criar c\u00f3digos num\u00e9ricos (por exemplo, **Mm** = 0, **MM** = 1) e, ent\u00e3o, fazer a regress\u00e3o do fen\u00f3tipo nos c\u00f3digos. Novamente, neste caso, a signific\u00e2ncia da regress\u00e3o indica que o marcador est\u00e1 ligado ao QTL. Considera-se, tamb\u00e9m, que o efeito do QTL \u00e9, aproximadamente, igual ao coeficiente de regress\u00e3o e a sua localiza\u00e7\u00e3o \u00e9, aproximadamente, igual \u00e0 localiza\u00e7\u00e3o do marcador.

Os resultados obtidos deste modo são idênticos àqueles conseguidos por meio da análise de variância. Também as limitações quanto aos resultados dependerem tanto do efeito quanto da distância são verdadeiras. Contudo, o método de regressão é mais fácil de ser estendido para outras situações; por exemplo, se houver um genótipo perdido, é possível utilizar a probabilidade de ele ser **MM** (o uso das probabilidades é a base para o mapeamento por intervalo). Quando existirem três genótipos, como no caso do delineamento de F₂, é possível utilizar dois códigos, um para os efeitos aditivos e outro para os desvios de dominância.

Mapeamento por intervalo

O mapeamento por intervalo (composto ou simples) é a maneira mais utilizada atualmente para mapear QTLs. Neste caso, podem ser utilizados vários marcadores, com distância aproximada de 10 a 20 cM entre os marcadores. Busca-se, então, a posição em que estão os QTL entre os marcadores e a posição mais provável desse QTL entre os marcadores.

O princípio do mapeamento por intervalo simples baseia-se em testar o ajustamento de um modelo que considera a presença do QTL em várias posições entre os marcadores, em comparação com um modelo que não considera a presença do QTL. Para esta comparação, é utilizada a função de verossimilhança.

A função de verossimilhança é calculada para cada posição entre dois marcadores. Quanto maior for o valor da função, tanto maior será a probabilidade de que o QTL esteja naquela posição.

Função de verossimilhança

Para trabalhar com a função de verossimilhança, em primeiro lugar é necessário supor um modelo que considere a distribuição de probabilidade da amostra estudada. Se todos os parâmetros da distribuição fossem conhecidos, então seria possível calcular a probabilidade de se obter uma amostra como a estudada de uma população com aquela distribuição. A função que calcula esta probabilidade é chamada de função de verossimilhança. Se não for conhecido algum dos parâmetros da distribuição, pode-se supor valores para ele e calcular a probabilidade de a amostra ser proveniente daquela distribuição com o valor suposto para o parâmetro. O valor para o qual esta probabilidade resulta máxima é a

estimativa de verossimilhança do parâmetro da distribuição. Por exemplo, este parâmetro pode ser a média ou a variância de uma distribuição normal. Mais de um parâmetro pode ser estimados simultaneamente por este método.

Assim, no caso da estimação do QTL, considera-se que os dados fenotípicos possam ser descritos por determinado modelo. Calcula-se a probabilidade de que a amostra em avaliação seja proveniente de uma população na qual não existe QTL que influencie a característica. Em seguida, calcula-se a probabilidade de que a amostra seja originada de uma população com a presença do QTL na mesma localização do marcador L, então, a probabilidade de o QTL estar a um cM do marcador L, depois a dois cM, e assim por diante. Estes valores são comparados com os valores do modelo sem o QTL. A razão entre a probabilidade (verossimilhança) com o QTL e a verossimilhança do modelo sem o QTL serve de base para a realização de um teste que verifica se o efeito do QTL é significativo e que indica sua posição mais provável.

Ao considerar como exemplo uma população obtida por retrocruzamento, na qual os animais foram genotipados para dois marcadores (**L** e **R**) a cerca de 10 cM de distância, objetiva-se calcular o valor da verossimilhança para o QTL localizado entre eles a cada 1 cM.

Por ser uma população em retrocruzamento, existem quatro possíveis genótipos observáveis quando os dois marcadores forem considerados em conjunto (dois genótipos parentais **LL-RR** e **LI-Rr**, e dois recombinantes **LI-RR** e **LL-Rr**). Quando forem considerados também os QTLs (**Q** e **q**) e a possibilidade de recombinação entre os QTLs e os marcadores, existem oito possíveis genótipos. A Tabela 1 apresenta, para o genótipo dos dois marcadores, a freqüência com que ocorre um dos alelos do QTL. Desta forma, dados os registros fenotípicos, os genótipos dos animais e ainda a função de densidade de distribuição da característica fenotípica, é possível estimar o valor da função de verossimilhança para cada ponto do intervalo, considerando a presença do QTL. Em cada ponto, estima-se o valor dos parâmetros (por exemplo, a média, a variância e o efeito do QTL) da distribuição, obtendo-se um valor máximo para a função de verossimilhança naquele ponto. No caso do modelo que não considera a presença do QTL, o valor máximo da função é sempre o mesmo em qualquer ponto do intervalo. No caso em que se considera a presença do QTL, o valor máximo da função de verossimilhança,

entre todos os pontos dentro do intervalo deve coincidir com a presença do QTL. Se o valor máximo coincidir com um dos marcadores, então é provável que o QTL esteja fora do intervalo.

Tabela 1. Frequência de ocorrência do alelo **Q** condicionalmente ao genótipo dos dois marcadores do intervalo.

| Genótipo do marcador | P(Q M) |
|----------------------|-------------------------------------|
| LL RR | $\left(1 - \frac{rRrL}{1-r}\right)$ |
| LL Rr | $\left(\frac{rL - rRrL}{r}\right)$ |
| LI RR | $\left(\frac{rR - rRrL}{r}\right)$ |
| LI Rr | $\left(\frac{rRrL}{1-r}\right)$ |

Teste estatístico

Lander & Botstein (1989) introduziram o conceito de mapas de verossimilhança, propondo o uso do *LOD score* (de *logarithm of the odds*, ou logaritmo das chances) como teste estatístico (Werf & Kinghorn, 2000). O *LOD score*, é dado por:

$$LOD = \log_{10} \frac{ML(\text{Modelo com QTL})}{ML(\text{Modelo sem QTL})}$$

Valores aproximados com intervalos de confiança de 95% para a posição do QTL podem ser construídos utilizando-se a regra de um *LOD score*. Este valor seria correspondente a um nível de significância de 4% num teste de qui-quadrado para razão de verossimilhança. Contudo, no caso dos QTL, que envolvem mistura de distribuições, estas estatísticas fornecem um teste apenas aproximado.

Churchill & Doerge (1994) propuseram um teste estatístico empírico para verificar a significância do efeito do QTL. Ao redistribuir aleatoriamente os valores fenotípicos pelos marcadores testados e obter o valor máximo de *LOD score* para as posições testadas, obtém-se um valor de *LOD score* ao acaso. Ao repetir o processo um número grande de vezes, pode-se saber o valor correspondente ao percentil

95% e usá-lo como valor limite a partir do qual o efeito do QTL seria significativo. A grande vantagem deste método, chamado de teste de permutação, é que não é necessário fazer pressuposições a respeito da distribuição dos dados.

Aproximação por regressão

Haley & Knot (1992) verificaram que os resultados obtidos por meio da máxima verossimilhança podem ser aproximados satisfatoriamente mediante análise de regressão. Este tipo de análise é bem mais simples de ser implementada do que a análise de máxima verossimilhança e pode ser estendida mais facilmente para situações mais complexas. Neste caso, após a genotipagem dos animais para os marcadores, é feita a regressão dos valores fenotípicos sobre a probabilidade de os animais serem portadores do alelo **Q**. Esta probabilidade (Tabela 1) é calculada para cada animal e para cada ponto do intervalo, em função do seu genótipo para o marcador. No caso da situação mais simples, em que não há outros efeitos a serem considerados, o modelo de análise seria dado por $y = a + bx + e$, em que **y** é o valor fenotípico, **x** é a probabilidade de o animal ser portador do alelo **Q**, **e** representa o erro aleatório, e **a** e **b** são os parâmetros a serem estimados. Da forma maneira que na análise com máxima verossimilhança, deve-se considerar um modelo sem o efeito do QTL, que seria simplesmente $y = a + e$. No caso do primeiro modelo, a soma de quadrados total (SST) é dada por $\Sigma(y-\hat{a})^2$ e é igual à soma de quadrados do resíduo (SSR) do modelo sem o QTL. No caso do modelo com o QTL: $SSR = SST - \Sigma(y - \hat{a}-bx)^2$.

Na maioria das situações reais, é necessário incluir outros efeitos no modelo. Efeitos de ambiente que podem interferir na característica fenotípica analisada são os principais fatores a serem considerados. Nestes casos, calcula-se a soma de quadrados do modelo sem o QTL (mas com todos os outros efeitos) e o modelo completo. Segundo Haley & Knot (1992), os valores de *LOD score* podem ser aproximados por:

$$LOD \cong \log_{10} \left(\frac{SSR(Com\ QTL)}{SSR(Sem\ QTL)} \right)$$

Este teste pode ser viciado, por superestimar os valores da SSR, especialmente quando o efeito do QTL for grande. Esta superestimação também

será observada quando a incerteza a respeito de qual alelo está ligado ao marcador for maior, o que ocorre na região central do intervalo entre os marcadores. Em razão disto, Xu (1995) propôs que se aplicasse uma correção para este vício.

Mapeamento por intervalo composto (CIM)

Um dos problemas do mapeamento por intervalo simples é que, se existirem outros QTLs (mesmo fora do intervalo), ligados aos marcadores, então o QTL estimado será viciado, tanto em posição quanto em seu efeito. Para resolver este problema, Jansen (1993) propôs o uso do mapeamento por intervalo composto. Neste caso, utiliza-se análise de regressão e, se outros marcadores ligados ao QTL fora do intervalo existirem, então este efeito pode ser incluído no modelo de análise. Este é, segundo Li et al. (2007), o método mais utilizado para mapeamento de QTLs, devido à sua simplicidade e também por estar disponível em *software* de uso livre.

Abordagem bayesiana

Mais recentemente, o uso de abordagens bayesianas tem sido pesquisado (Xu, 2003; Gonçalves et al., 2005; Wang et al., 2005) e, apesar da flexibilidade nos modelos que podem ser aplicados, seu uso ainda não é disseminado. Segundo Li et al. (2007), isto provavelmente se deve às dificuldades de obtenção de *prioris* adequadas e também à ausência de *software* de fácil uso para realização das análises.

Outros tipos de populações

A extensão destes métodos para outras populações é direta. Sempre serão comparados os animais com diferentes marcadores de acordo com os possíveis haplótipos produzidos pelos pais. No caso de populações F2, provenientes de populações endogâmicas, a principal diferença é que em vez de dois existirão três genótipos possíveis para o QTL, permitindo a estimação dos efeitos de dominância.

Quando as populações utilizadas nos cruzamentos não forem endogâmicas, como é o caso de cruzamentos entre raças em produção animal, a maior diferença é que podem existir vários alelos para os marcadores e também para os QTLs. Apesar disto, acredita-se que as frequências dos alelos dos QTLs possam variar bastante entre as populações. É preciso também levar em consideração que um alelo de

marcador presente em uma raça pode também estar presente na outra. Portanto, em muitas situações não será possível saber se determinado alelo é proveniente do pai ou da mãe do animal, razão pela qual o dado não pode ser utilizado.

Também é possível procurar QTLs utilizando-se famílias provenientes de populações em equilíbrio de ligação. Nestes casos, utilizam-se famílias de meios-irmãos ou de irmãos completos. Em geral, o uso de famílias de meios-irmãos é mais adequado, por ser mais fácil de serem obtidas famílias mais numerosas. A situação para aplicação dos diversos métodos estatísticos é análoga àquela observada nas populações oriundas de retrocruzamentos. A partir de reprodutores heterozigotos para os marcadores, a genotipagem dos filhos permite, na maioria dos casos, saber quais foram os alelos herdados do pai (em algumas situações não é possível determinar com certeza se o alelo foi herdado do pai ou da mãe e este dado é perdido). Outra particularidade desta situação é que as análises devem ser feitas inicialmente dentro de família e depois para o conjunto de famílias, uma vez que o alelo do QTL ligado aos marcadores pode ser diferente para cada família.

O delineamento de netas é utilizado em rebanhos de produção visando economizar na quantidade de animais genotipados. Apenas os avós e os pais dos animais cuja produção é registrada são genotipados. A comparação é feita em termos da produção dos filhos dos pais que receberam do avô alelos diferentes. Este delineamento é indicado para gado de leite, em que as famílias de meias-irmãs são muito numerosas e a estrutura de *pedigree* permite sua aplicação.

Referências bibliográficas

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 138, n. 3, p. 963-971, 1994.

GONÇALVES, T. M.; OLIVEIRA, H. N.; BOVENHUIS, H.; BINK, M.; ARENDONK, J. V. Comparação de diferentes estratégias para a análise de características de crescimento e de carcaça de suínos cruzados: modelos finito e infinitesimal poligênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1531-1539, 2005.

HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, v. 69, n. 4, p. 315-324, 1992.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v. 135, n. 1, p. 205-211, 1993.

KEARSY, M. J.; POONI, H. S. **The genetical analysis of quantitative trait**. London: Chapman and Hall, 1996.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.

LI, H.; YE, G.; WANG, J. A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. **Genetics**, v. 175, n. 1, p. 361-374, 2007.

MULLEN, A. M.; STAPLETON, P. C.; CORCORAN, D.; HAMIL, R. M.; WHITE, A. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 3-16, 2006.

SWITONSKI, M. Molecular genetics in beef cattle breeding – a review. **Animal Science Paper and Reports**, v. 20, supl. 1, p. 7-18, 2002.

WANG, H.; ZHANG, Y. M.; LI, X.; MASINDE, G. L.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J.; XU, S. Bayesian shrinkage estimation of quantitative trait loci parameters. **Genetics**, v. 170, n. 1, p. 465-480, 2005.

WERF, J. V. D.; KINGHORN, B. **QTL course notes**, 2000. 157 p.

XU, S. A comment on the simple regression method for interval mapping. **Genetics**, v. 141, n. 4, p. 1657-1659, 1995.

XU, S. Estimating polygenic effects using markers of the entire genome. **Genetics**, v. 163, n. 2, p. 789-801, 2003.

Literatura complementar

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1996. 527 p.

GEORGES, M.; COPPIETERS, W. **Introductory course to QTL mapping in outbred half-sib pedigrees**, 2000. Disponível em: <<http://cgil.uoguelph.ca/QTL/titlePage.htm>>. Acesso em: 30 de maio 2007.

GUPTA, P. K. Molecular markers and QTL analysis in crop plants. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 113-114, 2002.

KADARMIDEEN, H. N.; ROHR, P. V.; JANSSE, L. L. G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 6, p. 548-564, 2006.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 879 p.

MONTALDO, H. H.; MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 83-89, 1998.

WELLER, J. I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 9, p. 2525-2537, 1990.

MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE CARNE BOVINA

Liliana A. Soria

Genética. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.
Chorroarin 280 (C1427CWO) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.
lsoria@fvvet.uba.ar

Introducción

En la actualidad, a nivel mundial existe un creciente interés por definir la calidad de la carne lograda en diferentes sistemas de producción debido a que el consumidor cada vez es más exigente en calidad e inocuidad de los alimentos.

La calidad de la carne está definida principalmente por su composición química y por sus características organolépticas tales como terneza, jugosidad, color, olor y sabor. La terneza es uno de los atributos más exigido y valorado (Miller, 1992; Boleman et al., 1997). Sin embargo, también la cantidad y el tipo de ácidos grasos es importante, porque existe la percepción general de que la grasa bovina es perjudicial para la salud (Scollan, 2003). El sistema de producción, el tipo de animal, la dieta, el manejo pre y post faena pueden modificar considerablemente la calidad de la carne.

La determinación de la terneza y el contenido de grasa se realiza después del sacrificio del animal mediante métodos objetivos o subjetivos. Por ello es difícil incluirlos como criterios de selección en planes de mejora genética.

Aunque muchas de las características relacionadas con calidad de carne son cuantitativas, es decir están bajo el control de muchos genes, existe evidencia que ciertos genes en particular, explican una proporción importante de la variabilidad fenotípica de composición y calidad carnicera (Burrow et al., 2001). A medida que se fue acumulando información sobre los genomas de diferentes especies domésticas, se fueron definiendo estrategias para identificar a los genes de importancia económica en producción animal, actualmente se están utilizando dos estrategias. Para algunos genes existe un buen nivel de conocimiento sobre su rol fisiológico y bioquímico, incluso se conoce la estructura del gen y su secuencia. En este caso esos genes son considerados “*candidatos*” para explicar diferencias detectadas en

variables productivas y el objetivo es identificar en ellos polimorfismos asociados con las variables en estudio (Rothschild & Soller, 1997). Para el caso en el que no se tiene conocimiento previo sobre posibles genes involucrados en el control de una variable de interés económico, se ha desarrollado una estrategia experimental específica conocida como mapeo de loci relacionados a atributos cuantitativos (*Quantitative Trait Loci - QTL*). Esta metodología se basa en detectar la posición en el genoma de aquellos genes involucrados en la variación de caracteres cuantitativos independientemente de su función. Por definición los QTL son regiones cromosómicas que contienen el o los genes involucrados en el control de un fenotipo de interés.

Las diferentes razas y cruas bovinas presentan variación en calidad de carne e incluso existe variabilidad entre animales de una misma raza. Por otro lado, no existe una raza que tenga todos los atributos necesarios para la producción eficiente de carne en todos los ambientes y que pueda cumplir con los requerimientos de los consumidores de diferentes mercados. El desarrollo de marcadores moleculares, podría mejorar la precisión en la estimación del Mérito Genético y de ese modo se podría identificar a los animales productores de carne de mejor calidad, metodología denominado Selección Asistida por Marcadores (S.A.M.)

A continuación se resumen los resultados de la evaluación de dos genes candidatos para terneza (CAPN1 y CAST), otro para contenido de grasa (LEP) y el cuarto (PPARGC1 α) para ambas características.

Gen CAPN1

Este gen codifica la subunidad mayor de la μ -calpaína, principal enzima responsable de la proteólisis *post-mortem* del músculo (Koochmaraie, 1996). Existen amplias evidencias que sugieren que después de la muerte, las calpaínas son responsables de la proteólisis de las proteínas miofibrilares cuya degradación provoca el debilitamiento de la estructura del tejido muscular y por lo tanto la tiernización de la carne (Killefer & Koochmaraie, 1994). Este gen mapea dentro de los límites de un QTL descrito para terneza de la carne en el cromosoma 29 (BTA29) del bovino (Smith et al., 2000). Dicho QTL fue identificado en una familia de medios hermanos, todos hijos de un toro Piamontés-Angus, y se lo halló asociado con Resistencia al Corte (RC, una medida objetiva de la terneza de la carne determinada

mediante la cizalla de Warner Bratzler) determinada en la carne a los 3 y 14 días *post-mortem* (Casas et al., 2000). Por función y posición en el genoma, se lo considera un gen candidato para terneza.

La terneza esta relacionada con la estructura de la fibra muscular, la cantidad y el “*crosslinking*” del tejido conectivo y la cantidad de grasa intramuscular. Está influenciada por factores genéticos y ambientales. Información más detallada sobre los factores que la determinan ha sido revisada por Soria & Corva (2004)

Este gen contiene 22 exones y sus respectivos intrones. Se ha determinado parcialmente su secuencia, excepto la del intrón 10 (Nº de acceso al GenBank AF252504 y AF248054). Se han identificado 38 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) en dos toros (Piamontés x Angus y Jersey X Limousin). Dos de ellos (SNP 316 y SNP530) alteran la secuencia de aminoácidos. El SNP 316 es una sustitución de citosina por guanina (alelos C o G) en el exón 9 (nucleótido 5709 de AF252504). Provoca el cambio de alanina por glicina en el aminoácido 316 (dominio II) de la enzima. El otro SNP (SNP 530) se localiza en el exón 14 (nucleótido 4558 de AF248054) y es un cambio de adenina por guanina (alelos A o G) que provoca el cambio de isoleucina por valina en el dominio III de la proteína (Page et al., 2002).

Page et al. (2004) analizaron las diferencias en terneza de los distintos genotipos de los SNP316 y SNP 530 en un rodeo comercial *Bos taurus*. Los homocigotas CC para 316 presentaron menor RC que los CG y GG. Con una diferencia de 0,6 kg entre los dos genotipos homocigotas (CC y GG). Por otro lado, los homocigotas GG para 530 mostraron menor RC que los animales con genotipos GA y AA, siendo 0,4 kg la diferencia en RC entre los genotipos GG y AA.

El estudio del efecto de los polimorfismos de este gen sobre la terneza de la carne en novillos *Bos indicus*, permitió identificar tres nuevos SNP ubicados en los intrones 1, 17 y 21 (Casas et al., 2005; White et al., 2005). El análisis de asociación con RC permitió confirmar el efecto del SNP316 en estos trabaos y encontraron que el SNP del intrón 17 (SNP4751) está significativamente asociado con RC a los 7, 14 y 21 días de maduración en ambas subespecies. Este último, es una sustitución de citosina/timina en la posición 6545 de la secuencia AF248054 (White et al., 2005).

Los SNP316 y SNP4751 han sido incluidos en dos tests comerciales: Igenity *TenderGene* (Merial Ltd., Atlanta, GA) y GeneSTAR *Tenderness* (Genetic Solution Pty. Ltd., Albion, Australia). Recientemente el US National Beef Cattle Evaluation

Consortium ha validado el efecto de dichos tests, confirmando el efecto de ambos polimorfismos del gen CAPN1 (Van Eenennaam et al., 2007).

Se han obtenido los primeros resultados del estudio de los SNP316, SNP530 y SNP4751 en novillos Angus y Brangus invernados en condiciones pastoriles en Argentina por métodos de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) con las enzimas *BtgI*, *Avall* y *Bsa* *JI* respectivamente, hallándose al alelo C del SNP 316 asociado con mayor terneza de la carne. Sin embargo no se encontró efecto de los SNP 530 y SNP4751 (Soria et al., 2006). En el Cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos

Cuadro 1. Frecuencia genotípica de los SNP316, SNP 530 y SNP 4751 y contraste entre genotipos y RC a los 7 días post-mortem ($P<0.01$)

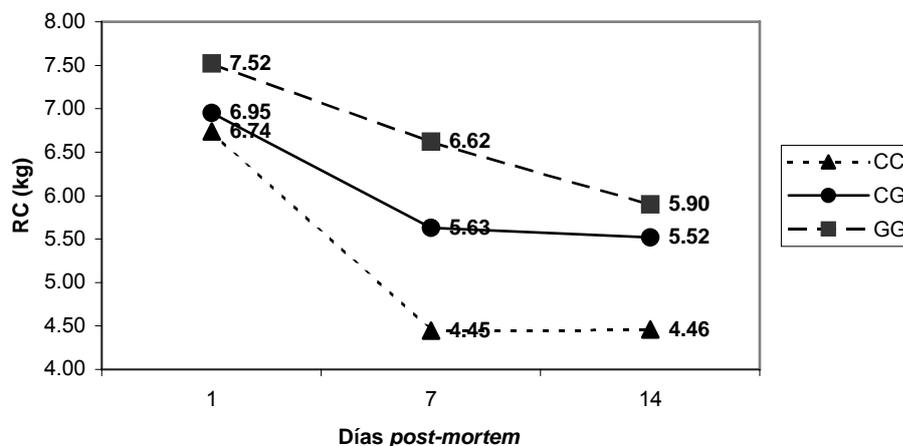
| SNP | Genotipo | Grupo/Raza ¹ | | | | | Total | Porcentaje | RC (kg) ² |
|---------|----------|-------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-------|------------|------------------------|
| | | A6 (n=10) | A7 (n=11) | BR1 (n=20) | BR2 (n=20) | BR3 (n=20) | | | |
| SNP316 | CC | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 4 | 4.9 | 4.44±0.75 ^a |
| | CG | 3 | 7 | 9 | 6 | 6 | 31 | 38.3 | 5.62±0.27 ^a |
| | GG | 6 | 3 | 11 | 12 | 14 | 46 | 56.8 | 6.61±0.23 ^b |
| SNP530 | AA | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1.2 | 5.11±1.57 ^a |
| | AG | 4 | 0 | 1 | 0 | 6 | 11 | 13.6 | 6.67±0.50 ^a |
| | GG | 6 | 11 | 19 | 19 | 14 | 69 | 85.2 | 6.00±0.19 ^a |
| SNP4751 | TT | 1 | 0 | 6 | 2 | 1 | 10 | 12.3 | 6.37±0.52 ^a |
| | TC | 5 | 1 | 10 | 10 | 14 | 40 | 49.4 | 6.36±0.27 ^a |
| | CC | 4 | 10 | 4 | 8 | 5 | 31 | 38.3 | 5.74±0.29 ^a |

¹ A6: Vacas Angus INTA EEA Balcarce con toros Angus comerciales. A7: Angus INTA EEA Balcarce. BR1, BR2 y BR3 Brangus de tres cabañas diferentes.

² Medias de cada genotipo con letras diferentes difieren estadísticamente ($P<0.05$)

Las medias de RC a los 7 días fueron significativamente diferentes ($P<0.01$), con $2,17 \pm 0.79$ kg de diferencia entre los genotipos homocigotas (Grafico 1). Los heterocigotas mostraron una terneza intermedia. Las diferencias entre CC vs CG y CG vs GG no fueron estadísticamente significativas ($P<0.05$), sugiriendo un efecto genético aditivo.

Gráfico 1. Promedio de Mínimos Cuadrados de RC a 1, 7 y 14 días *post-mortem* para cada genotipo del SNP 316



Al estudiar una muestra de toros Brangus, Angus y Brahman se hallaron patrones de RFLPs no esperados en seis toros. La clonación y secuenciación, permitió confirmar polimorfismos nuevos de este gen en los intrones 8, 9 y 15 y una sustitución neutra en el codón del aminoácido 528 en el exón 14 (número de acceso al GenBank DQ111667, DQ111668, DQ111669, DQ111770) (Soria et al., 2005). La determinación de genotipos en este grupo de toros permitió establecer que en forma similar a lo que ocurre en Brahman y contrariamente a la situación en Angus, según datos de la bibliografía, la frecuencia del alelo más favorable en cuanto a terniza en el SNP 316 (C) resultó baja en la muestra de Brangus. En el SNP 530, de menor efecto sobre la terniza, el alelo favorable (G) está prácticamente fijado, similar a lo que ocurre en Brahman (Corva et al., 2005).

Corva et al. (2007a) analizaron el efecto de los SNP316 y SNP530 en 313 novillos Angus, Hereford, cruza recíprocas, retrocruzas y cruza con Limousin engordados en condiciones pastoriles en Argentina, hallando a ambos SNP asociados con RC (Cuadro 2). El rango de frecuencias de cada alelo favorable de cada marcador fue 0.22 a 0.57 en el SNP316 y 0.82 a 0.97 en el SNP530.

Cuadro 2. Medias de RC y errores estándar de cada genotipo de dos SNP del gen CAPN1.

| SNP316 | | | SNP530 ² | | |
|----------|-----|---------------------------|---------------------|-----|---------------------------|
| Genotipo | n | RC ± EE (Kg) ¹ | Genotipo | n | RC ± EE (Kg) ¹ |
| CC | 41 | 7.86 ± 0.65 ^a | - | - | - |
| CG | 165 | 8.73 ± 0.51 ^{ab} | AG | 66 | 7.98 ± 0.62 ^a |
| GG | 107 | 9.21 ± 0.54 ^b | GG | 243 | 8.90 ± 0.47 ^b |

¹ Medias de cada genotipo con letras diferentes difieren estadísticamente (P<0.05).

² Genotipo AA del SNP530 no fue incluido en el análisis por el bajo número de animales de esta clase.

Se están analizando esos tres SNP del gen CAPN1 en 190 novillos Brangus engordados en condiciones pastoriles en Argentina. La frecuencia del alelo C del SNP316 y SNP 4751 es 0,29 y 0,49 respectivamente. Falta completar la determinación de genotipos del SNP530 y los determinaciones analíticas de calidad de carne.

Gen CAST

El gen CAST mapea en el BTA7 (Bishop et al., 1994) y codifica la enzima *calpastatina*, enzima inhibidora de las *calpaínas*. Por lo tanto es un modulador del efecto proteolítico de las calpaínas. Se ha secuenciado el ARNm de músculo esquelético bovino (Nº de acceso a GenBank L14450) (Koochmaraie, 1994).

En el bovino tiene 35 exones y los ARNm aislados son heterogéneos en longitud, esto es debido a que el gen posee cuatro promotores (Raynaud et al., 2005) pero sólo tres son activos en músculo (Parr et al., 2004)

Se han identificado SNP en dicho gen, algunos con efecto (Barendse, 2002; Schenkel et al., 2006) y otros sin efecto sobre la terneza de la carne (Corva et al., 2007). Los primeros están incluidos en dos tests comerciales: Igenity *TenderGene* y GeneSTAR *Tenderness* Recientemente el US National Beef Cattle Evaluation Consortium ha validado el efecto de dichos tests, confirmando el efecto de ambos polimorfismos del gen CAST (Van Eenennaam et al., 2007).

La disponibilidad creciente de secuencias de ADN en bases de datos de libre acceso estimula la utilización de metodologías bioinformáticas para la investigación

Cuadro 3. Medias de RC y errores estándar de cada genotipo del SNP2870 del gen CAST.

| SNP2870 | | |
|----------|-----|-------------------------------|
| Genotipo | N | RC \pm EE (Kg) ¹ |
| AA | 53 | 9.11 \pm 0.75 ^a |
| AG | 162 | 8.91 \pm 0.53 ^a |
| GG | 98 | 8.68 \pm 0.56 ^a |

¹ Medias de cada genotipo con letras iguales no difieren estadísticamente (P<0.05).

Gen PPARGC1 α (o PGC1 α)

Este gen codifica el coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos, una proteína que activa la expresión génica mediante la interacción con factores de transcripción. Los más importantes son PPAR γ (receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos) y MEF2s (*Muscle Enhancers Factors*) (Puigserver et al., 1998). El primer factor de transcripción está relacionado con la formación de depósitos grasos en forma de grasa parda y el segundo promueve la transición de fibra muscular de tipo IIb (glicolíticas) a tipo I y IIa (oxidativas) (Lin et al., 2002a,b; Zhao et al., 2004). La proporción de cada tipo de fibra varía en cada músculo. Las propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares de cada tipo de fibra son diferentes (Xiong, 1994). La proporción de fibras oxidativas contribuiría en la determinación de la terneza y la jugosidad de la carne (Henckel et al., 1997).

El ADNc del PPARGC1 α bovino ha sido secuenciado completamente (Nº de acceso al GenBank AY321517). El gen bovino está organizado en 13 exones y su locus se ubica en el BTA6. En el mismo se identificaron 11 SNP. Uno de ellos, ubicado en el intrón 9 (alelos C y T) se halló significativamente asociado con contenido de grasa en la leche en rodeo Holstein (Weikard et al., 2005). En cerdos se han identificado varios SNP en dicho gen, uno de ellos ubicado en el exón 8 ha sido hallado asociado con conversión, grasa abdominal y subcutánea (Stachowiak et al., 2007).

En novillos Angus (21) y Brangus (60) engordados en condiciones pastoriles en Argentina el SNP del intrón 9 no se halló asociado con extracto etéreo (una medida objetiva del contenido de grasa de la carne) ni con terneza (P>0.05) (datos no

publicados). Este resultado coincide con lo informado recientemente por White et al. (2007).

Mediante la comparación de secuencias de regiones codificantes y 3'-URT de dicho gen de toros Angus (7), Brangus (9), Brahman (6) y Braford (2) se identificaron 2 SNP en la región codificante. Uno de ellos es conservativo (no cambia el aminoácido) pero el otro (alelos A y G) produce una sustitución de aminoácidos. Del análisis de las secuencias surge que el alelo A está en Brahman y Brangus y ausente en Angus. En esta última raza todos los toros presentaron el alelo G. La ausencia de homocigotas AA y la baja frecuencia de heterocigotas impidió realizar el análisis estadístico con el propósito de establecer la influencia de dicho SNP sobre contenido de grasa y terneza en novillos Angus (21) y Brangus (60) engordados en condiciones pastoriles en Argentina (datos no publicados). Actualmente este SNP se está analizando en 190 novillos Brangus con datos analíticos de calidad de carne.

Gen LEP

El gen LEP codifica la *leptina*, una proteína producida principalmente en las células de tejido adiposo (Botella Carretero et al., 2001). Por su función biológica y fisiológica, el gen LEP es candidato para ser responsable de la variabilidad en la deposición de tejido graso. La *leptina* tiene un rol central en la regulación de la homeostasis energética corporal (consumo, gasto energético y composición corporal) (Botella Carretero et al., 2001). La leptina se produce fundamentalmente en la grasa blanca y existe una relación entre niveles de leptina y depósitos de grasa (Villaseñor, 2002).

El gen LEP mapea en el BTA4 (Schenkel et al., 2005) y en él se han descrito varios SNP, uno en el exón 2, dos en el exón 3 y tres en el promotor (Buchanan et al., 2002; Nkrumah et al., 2004). El SNP del exón 2 es una transición de citosina a timina en el codón 25 y corresponde a una sustitución de arginina por cisteína. Se encontró que los animales homocigotas TT presentan mayor deposición grasa que los CC. Se ha confirmado la asociación entre el genotipo del SNP del exón 2 y ciertas características de la res (Buchanan et al., 2002; Nkrumah et al., 2004; Kononoff et al., 2005). Del mismo modo dos polimorfismos del promotor se han encontrado asociados con concentraciones séricas de *leptina*, peso corporal,

consumo, comportamiento alimenticio y características de la res (Nkrumah et al., 2004).

En 157 novillos de biotipo europeo (Angus, Hereford, cruzas, retrocruzas y cruzas con Limousin) y 247 novillos Brangus, todos engordados en condiciones pastoriles en Argentina, se evaluaron dos SNP del gen LEP. Mediante la técnica de ARMS-PCR (*A*mplification *R*efractory *M*utation *S*ystem-*P*olymerase *C*hain *R*eaction) se determinaron los genotipos del SNP del exón 2 (alelos C y T) y de uno de los polimorfismos del promotor (alelos C y T). Los resultados de la evaluación del efecto de ambos SNP se resumen en los Cuadros 4 y 5. Aunque ambos polimorfismos tendrían relación con variables productivas (Peso de la Res, Área de Ojo de Bife, Espesor de Grasa Dorsal y % de Grasa de Riñonada), los efectos no son consistentes a través de biotipos. Las diferencias entre genotipos son pequeñas, estos resultados podrían estar influenciados por el bajo nivel de ganancia de peso y los pesos de faena de los novillos de la comparación (Motter et al., 2006; Corva et al., 2007b)

Cuadro 4. Medias y errores estándar del polimorfismo en el promotor de Leptina, para cada biotipo.

| | Europeos ¹ | | | Brangus | | |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | CC | CT | TT | CC | CT | TT |
| N | 54 | 70 | 31 | 134 | 75 | 37 |
| PV (Kg) | 331 ± 6 | 323 ± 5 | 329 ± 8 | 436 ± 4 | 445 ± 5 | 430 ± 7 |
| PR (Kg) | 171 ± 3 ^a | 166 ± 3 ^a | 171 ± 5 ^a | 239 ± 2 ^a | 246 ± 3 ^b | 235 ± 4 ^a |
| REN (%) | 50,7 ± 0,4 | 50,6 ± 0,2 | 51,0 ± 0,3 | 54,6 ± 0,2 | 55,1 ± 0,2 | 54,6 ± 0,3 |
| AOB (cm²) | 46,2 ± 1,1 ^a | 43,6 ± 1,1 ^b | 44,2 ± 1,5 ^{ab} | 65,9 ± 0,8 ^a | 68,6 ± 0,8 ^b | 65,8 ± 1,4 ^a |
| EGD (mm) | 4,7 ± 0,2 | 4,7 ± 0,2 | 4,6 ± 0,3 | 6,3 ± 0,1 | 6,3 ± 0,2 | 6,5 ± 0,3 |
| PGR (g) | 1.780 ± 124 | 1.626 ± 108 | 1.796 ± 164 | 2.826 ± 88 | 2.795 ± 107 | 2.597 ± 154 |
| %GR | 1,05 ± 0,05 | 0,98 ± 0,05 | 1,06 ± 0,06 | 1,15 ± 0,03 | 1,10 ± 0,04 | 1,09 ± 0,06 |
| EE (%) | 2,4 ± 0,2 | 2,3 ± 0,1 | 2,3 ± 0,2 | 2,7 ± 0,2 | 2,9 ± 0,2 | 3,0 ± 0,4 |

¹ Europeos: novillos ≥ 75% Angus, ≥ 75% Hereford, F₁, retrocruzas, Limousin x F₁. Medias de cada genotipo con letras distintas dentro de biotipo difieren significativamente (P<0,05).

Cuadro 5. Medias y errores estándar del polimorfismo en el exón 2 de leptina, para cada biotipo

| | Europeos ¹ | | | Brangus | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CC | CT | TT | CC | CT | TT |
| N | 23 | 84 | 50 | 54 | 142 | 51 |
| PV (Kg) | 322 ± 9 | 329 ± 5 | 326 ± 6 | 441 ± 6 | 436 ± 4 | 444 ± 6 |
| PR (Kg) | 167 ± 5 | 170 ± 3 | 168 ± 3 | 241 ± 3 | 240 ± 2 | 242 ± 3 |
| REN (%) | 50,7 ± 0,4 | 50,9 ± 0,2 | 50,6 ± 0,3 | 54,7 ± 0,2 | 55,0 ± 0,2 | 54,4 ± 0,3 |
| AOB (cm²) | 45,2 ± 1,7 | 45,1 ± 0,9 | 44,0 ± 1,2 | 66,8 ± 1,1 | 66,9 ± 0,8 | 66,5 ± 1,2 |
| EGD (mm) | 5,1 ± 0,3 ^a | 4,4 ± 0,1 ^b | 5,0 ± 0,2 ^a | 6,1 ± 0,2 ^a | 6,5 ± 0,1 ^a | 6,2 ± 0,2 ^a |
| PGR (g) | 1.813 ± 189 | 1.612 ± 99 | 1.844 ± 129 | 2.755 ± 126 | 2.742 ± 85 | 3.000 ± 132 |
| %GR | 1,10 ± 0,07 ^a | 0,95 ± 0,04 ^b | 1,10 ± 0,05 ^a | 1,12 ± 0,05 ^{ab} | 1,11 ± 0,03 ^b | 1,19 ± 0,05 ^a |
| EE (%) | 2,6 ± 0,2 | 2,2 ± 0,1 | 2,5 ± 0,2 | 2,8 ± 0,3 | 2,9 ± 0,2 | 2,5 ± 0,3 |

¹ Europeos: novillos ≥ 75% Angus, ≥ 75% Hereford, F₁, retrocruzas, Limousin x F₁. Medias de cada genotipo con letras distintas dentro de biotipo difieren significativamente (P<0,05).

Referencias bibliográficas

BARENDSE, W. J. **DNA markers for meat tenderness**. International patent application PCT/AU98/00882 (International patent publication WO 99/23248), 2002.

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 bovine genome. **Genetics**, v. 136, n. 2, p. 619-639, 1994.

BOLEMAN, S. J.; BOLEMAN, S. L.; MILLER, R. K.; TAYLOR, J. F.; CROSS, H. R.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; MILLER, M. F.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; SAVELL, J. W. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1521-1524, 1997.

BOTELLA CARRETERO, J. I.; LLEDIN BARBANCHO, M.; VALERO GONZÁLEZ, M.; VARELA DACOSTA, C. Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. **Anales de Medicina Interna**, v. 18, n. 3, p. 152-160, 2001.

BUCHANAN, F.; FITZSIMMONS, C.; VAN KESSEL, A.; THUE, T.; WINKELMAN-SIM, D.; SCHMUTZ, S. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 105-116, 2002.

BURROW, H. M.; MOORE, S. S.; JOHNSTON, D. J.; BARENDSE, W.; BINDON, B. M. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. **Australian Journal Experimental Agriculture**, v. 41, n. 7, p. 893-919, 2001.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 560-569. 2000.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNET, G. L.; CHASE Jr, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13-19, 2005.

CORVA, P. M.; SORIA, L. A.; HUGUET, M. J.; MIQUEL, M. C. Polimorfismos en el gen CAPN1 en toros brangus, angus y cebú. In: CONGRESO DE GENÉTICA, 34., 2005, Trelew. **Anais...** Trelew, 2005.

CORVA, P. M.; SORIA, L.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; PEREZ CENCI, M.; MOTTER, M.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L. M.; PAVÁN, E.; DEPETRIS, G.; MIQUEL, M. C.; SANTINI, F. J.; GRIGERA NAÓN, J. J. Association of polymorphisms on the CAPN1 and CAST genes with meat tenderness in beef cattle of Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, 2007a (no prelo).

CORVA, P. M.; FERNÁNDEZ MACEDO, G.; MOTTER, M.; SORIA, L.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L. M.; MIQUEL, M. C. Efecto de polimorfismos en el gen de la leptina sobre aptitudes carniceras de novillos correspondientes a biotipos europeos y cebuinos. In: CONGRESO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL DE LA AAPA, 30., 2007. **Anais...**, 2007b (no prelo).

HENCKEL, P. N.; OKSBERG, E.; ERLANDSEN, P.; BARTON-GADE, P.; BEJERHOLM, C. Histo- and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. **Meat Science**, v. 47, n. 3, p. 311-321, 1997.

KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 3, p. 606-614, 1994.

KONONOFF, P.; DEOBALD, H.; STEWART, E.; LAYCOCK, A.; MARQUESS, F. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 4, p. 927-932, 2005.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 1-2, p. 93-104, 1994.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, v. 43, supl. 1, p. 193-201, 1996.

LIN, J.; PUIGSERVER, P.; DONOVAN, J.; TARR, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 3, p. 1645-1648, 2002a.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P. T.; ZHANG, C. Y.; WU, Z.; BOSS, O.; MICHAEL, L. F.; PUIGSERVER, P.; ISOTANI, E.; OLSON, E. N.; LOWELL, B. B.; BASSEL-DUBY, R.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797-801. 2002b.

MILLER, B. Understanding consumers. **Beef Today**, v. 8, p. 40, 1992.

MOTTER, M.; CORVA, P. M.; SORIA, L.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; CERVINI, M. L.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L. M.; PAVÁN, E.; DEPETRIS, G.; SANTINI, F. J.; GRIGERA NAÓN, J. J. Efecto de un SNP del gen de la leptina sobre aptitudes carniceras de novillos. In: CONGRESO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL DE LA AAPA, 29., 2006, Mar del Plata. **Anais...**Mar del Plata: AAPA, 2006.

NKRUMAH, J.; BASARAB, J.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 211-219, 2004.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; WHITE, S. N.; BENNET, G. L.; KEELE, J. W.; DIKEMAN, M. E.; SMITH, T. P. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3474-3481, 2004.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.

PARR, T.; JEWELL, K. K.; SENSKY, P. L.; BRAMELD, J. M.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 427, n. 1, p. 8-15, 2004.

PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C. W.; GRAVES, R.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B. M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptative thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829-839, 1998.

RAYNAUD, P.; JAYAT-VIGNOLES, C.; LAFORET, M. P.; LEVEZIEL, H.; AMARGER, V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 437, n. 1, p. 69-77, 2005.

ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v. 8, p. 13-22, 1997.

SCHENKEL, F. S.; MILLER, S.; YE, X.; MOORE, S. S.; NKRUMAH, J. D.; LI, C.; YU, J.; MANDELL, I. B.; WILTON, J. W.; WILLIAMS, J. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 9, p. 2009-2020, 2005.

SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; JIANG, Z.; MANDELL, I. B.; YE, X.; LI, H.; WILTON, J. W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 291-299, 2006.

SCOLLAN, N. Strategies for optimizing the fatty acid composition of beef. **IGER Innovations**, v. 7, p. 41-45, 2003.

SMITH, T. P.; CASAS, E.; REXROAD III, C. E.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.

SORIA, L.A.; CORVA, P. M. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 12, n. 2, p. 73-88, 2004.

SORIA, L.; CORVA, P. M.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; PEREZ CENCI, M.; MOTTER, M.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L. M.; PAVÁN, E.; DEPETRIS, G.; SANTINI, F. J.; GRIGERA NAÓN, J. J. Efecto de polimorfismos en μ -calpaina sobre la terneza de la carne vacuna. In: CONGRESO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL DE LA AAPA, 28., 2005, Mar del Plata. **Anais...** Mar del Plata: AAPA, 2005.

SORIA, L.; CORVA, P. M.; BRANDA SICA, A.; SCHOR, A.; MELLUCI, L.; VILLARREAL, E.; MEZZADRA, C.; MIQUEL, M. Efecto de tres SNP del gen CAPN1 sobre la terneza de la carne en novillos. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA, 35., 2006, San Luis. **Anais...** San Luis: Sociedad Argentina de Genética, 2006.

STACHOWIAK, M.; SZYDLOWSKI, M.; CIESLAK, J.; SWITONSKI, M. SNPs in the porcine PPARGC1a gene: interbreed differences and their phenotypic effects. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 2, p. 231-239, 2007.

VAN EENENNAAM, A. L.; LI, J.; THALLMAN, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, M. E.; GILL, C. A.; FRANKE, D. E.; THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 891-900, 2007.

VILLASEÑOR, A. El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. **Review of Endocrinology and Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 135-139. 2002.

WEIKARD, R.; KÜHN, C.; GOLDAMMER, T.; FREYER, G.; SCWERIN, M. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2005.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE Jr, C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 9, p. 2001-2008, 2005.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; ALLAN, M. F.; KEELE, J. W.; SNELLING, W. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 1, p. 1-10, 2007.

XIONG, Y. L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 293-320, 1994.

ZHAO, R. Q.; YANG, X. J.; XU, Q. F.; WEI, X. H.; XIA, D.; CHEN, J. Expression of GHR and PGC-1 α in association with changes of MyHC isoform types in *longissimus* muscle of Erhualian and Large White pigs (*Sus scrofa*) during postnatal growth. **Animal Science**, v. 79, p. 203-211, 2004.

GENOMIC IMPRINTING E SUAS IMPLICAÇÕES EM PRODUÇÃO ANIMAL

Simone Cristina Méo

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970,
São Carlos, SP, Brasil. simone@cppse.embrapa.br

Introdução

O embrião mamífero diplóide ($2n$) é formado pela fusão do gameta ($1n$) masculino (espermatozóide) e do gameta feminino (oócito). Uma vez que cada um dos genitores fornece para seu descendente um gameta, ou seja, um conjunto haplóide de cromossomos, parecia óbvio supor que a contribuição genética transmitida por ambos os pais deveria ser idêntica (Watson et al., 1992). Entretanto, para alguns genes, isso não é observado.

Estudos em camundongos transgênicos demonstraram a ocorrência de distúrbio de desenvolvimento quando o alelo paterno do gene do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (*Igf2*) foi inativado por mutação, enquanto animais portadores da inativação do alelo materno se desenvolveram normalmente. Disso concluiu-se que, enquanto o gene *Igf2* de origem paterna é transcrito, o de origem materna permanece silencioso (Alberts et al., 1994). De maneira semelhante, foi observado que embriões de camundongos formados exclusivamente por genoma de origem materna (ginogenéticos ou partenogenéticos) ou paterna (androgenéticos), produzidos por transferência de pronúcleo ou por ativação partenogenética (McGrath & Solter, 1984; Solter, 1988), morrem logo após a implantação. Assim, para a embriogênese ser completa, o zigoto deve conter ambos os genomas parentais.

Essas evidências despertaram a curiosidade de diversos pesquisadores que buscaram entender a maneira pela qual a expressão de alguns genes é controlada por sua origem (materna ou paterna) e os mecanismos e as implicações desse evento, o que levou à descoberta de vários genes com expressão dependente da origem parental. O “silêncio” de um gene dependente de sua origem foi denominado de *genomic imprinting* – impressão genômica (Kendrew, 1994). O estudo do *imprinting* permite a compreensão de certas doenças humanas, de mecanismos de

formação de tumores e de eventos do desenvolvimento e do crescimento em mamíferos, além de ser uma possível ferramenta para a seleção animal e de fornecer subsídios para o controle de falhas que ocorrem nas biotecnologias com embriões.

Definição

O evento no qual a expressão de um gene depende de sua origem (materna ou paterna) é denominado de *genomic imprinting* (Watson et al., 1992; Alberts et al., 1994; Jaenisch, 1997). Assim, a atividade de um gene *imprinted* em cada indivíduo depende do sexo do progenitor do qual o alelo foi herdado (Watson et al., 1992), de maneira que alguns genes são expressos somente com base nos alelos maternos e outros somente pelos paternos (Kendrew, 1994).

O *imprinting* é uma modificação epigenética (informação diferente daquela codificada pela seqüência de nucleotídeos, isto é, a informação citoplasmática), que altera o fenótipo sem modificar o genótipo, é introduzida nos cromossomos, é replicada estavelmente durante as divisões celulares e é reversível (Kendrew, 1994).

O *genomic imprinting* ocorre em genes autossômicos de mamíferos eutérios (que possuem placenta verdadeira) e leva a desvios da herança mendeliana (Ruvinsky, 1999). Em plantas angiospérmicas, em marsupiais e em insetos já foi descrito fenômeno epigenético semelhante ao *genomic imprinting* (Toder et al., 1996; Spielman et al., 2001; Lize et al., 2007). Os genes *imprinted* possuem algumas características em comum: estão dispostos em grupos (o que indica que podem sofrer interação) e apresentam assincronia na replicação do DNA, seqüências repetitivas e poucos e pequenos íntrons. A maioria dos genes *imprinted* codifica proteínas, mas alguns genes codificam RNA, que não é transcrito, como o *H19* (Sasaki et al., 1995; RUVINSKY, 1999; YOUNG & FAIRBURN, 2000). O *imprinting* dos genes é específico para tecidos e para estádios do desenvolvimento e nem todos os genes que são *imprinted* em uma espécie o são em outra, o que indica aquisição evolutiva (Ruvinsky, 1999).

Hipóteses que explicam a ocorrência de *imprinting*

Há várias hipóteses que tentam explicar a ocorrência de *imprinting* e as suas conseqüências. Uma teoria baseia-se na idéia do “conflito genético” entre os genes

maternos e os genes paternos durante a gestação, também conhecida como “batalha dos sexos”. Uma vez que os fetos de mamíferos são nutridos diretamente pelos tecidos maternos, para os alelos de origem paterna seria vantajoso promover maior crescimento do feto, de modo a aumentar suas chances de espalhar descendentes pela população, enquanto os alelos maternos deveriam evitar a sobrecarga da mãe e favorecer a manutenção de fetos pequenos para assegurar o sucesso do parto e das futuras gestações. Assim, o *imprinting* seria um compromisso entre mãe e feto e entre genes maternos e paternos (Kendrew, 1994; Ruvinsky, 1999). Essa teoria prediz o comportamento dos genes *Igf2* e do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (*Igf2r*) com muita acurácia: a maior expressão do gene que codifica a proteína IGF-II (gene *Igf2*) pode aumentar o tamanho do feto e, por isso, está sob controle paterno, enquanto o gene que codifica o receptor (*Igf2r*), que se liga ao IGF-II e diminui sua disponibilidade, está sob controle materno (Kendrew, 1994). Entretanto, essa teoria não explica a ocorrência de *imprinting* em diversos outros genes.

A teoria do “modelo de desenvolvimento” sugere que o *imprinting* seria uma aquisição evolutiva e ocorreria em resposta à pressão ambiental, induzindo a rápidas mudanças de expressão ou à inativação dos alelos parentais de acordo com a necessidade (Beaudet & Jiang, 2002). Entretanto, essa maior capacidade de adaptação é controversa, uma vez que a diploidia, ao contrário do *imprinting* (que se assemelha à haploidia), protege contra mutações recessivas deletérias (Wolf & Hager, 2006).

Há também a hipótese do “ovário bomba-relógio”, na qual o *imprinting* evitaria a partenogênese e dessa forma asseguraria a variabilidade genética e protegeria a mãe contra doenças malignas do trofoblasto (Varmuza & Mann, 1994; Hagemann et al., 1998). Apesar de não ocorrer naturalmente em mamíferos, a partenogênese (ou reprodução assexuada) já foi descrita em cerca de 70 espécies de vertebrados, tais como cobras e lagartos, dentre esses o dragão-de-comodo, o que traz preocupações a respeito da diminuição da variabilidade genética e do aumento dos riscos de extinção da espécie (Watts et al., 2006). Um fato interessante é que nas espécies de lagarto, em que a fêmea é o sexo heterogamético (possui os cromossomos Z e W), o desenvolvimento partenogenético do gameta feminino (sem a contribuição do gameta masculino) produzirá somente machos ZZ e WW (Watts et al., 2006).

Além disso, o *imprinting* permitiria a vigilância contra a perda de cromossomos, de modo a prevenir o câncer e defender o organismo contra a invasão de DNA estranho (Jaenisch, 1997).

Principais genes *imprinted* descritos e suas funções

No genoma, estima-se a existência de 100 a 1000 genes *imprinted* (Young & Fairburn, 2000). Segundo o catálogo *on-line* de genes *imprinted* (IMPRINTED, 2007), já foram descritos 51 genes *imprinted* em humanos e 82 em camundongos. Entretanto, para os animais de produção, esse número é bem menor: sete em bovinos (*GTL2*, *IGF2*, *IGF2R*, *NESP55*, *NNAT*, *PEG3* e *XIST*), dez em ovinos (*DAT*, *DLK1*, *GTL2*, *H19*, *IGF2*, *IGF2R*, *MEG8*, *MEST*, *PEG11* e *PEG11-AS*) e cinco em suínos (*IGF2*, *IGF2-AS*, *IGF2R*, *PEG10* e *PLAGL1*)¹.

Os genes *imprinted* representam menos de 0,1% dos genes em todo o genoma, mas possuem funções determinantes em vários processos. Dentre essas funções, destacam-se a regulação do crescimento fetal, por *IGF2*, *IGF2R* e *H19* (Watson et al., 1992; Kendrew, 1994; Sasaki et al., 1995; Dean et al., 1998); o suprimento sanguíneo e a formação da placenta, por *IGF2R*, *INS2* e *MASH2* (Loi et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Young & Fairburn, 2000); a inativação do cromossomo X, pelo *XIST* (Young & Fairburn, 2000); o comportamento materno, pelo *Mest* (Lefebvre et al., 1998); e a aprendizagem, pelo *Xrl3b* (Davies et al., 2005).

Em camundongos, os genes de origem materna contribuem para o desenvolvimento do embrião propriamente dito, principalmente das estruturas axiais (cérebro, tubo neural e somitos), dos órgãos (rim e baço) e do endoderma do saco vitelino, enquanto os genes de origem paterna participam no desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários, especialmente do trofoblasto (Cruz & Pedersen, 1991; Kendrew, 1994; Kono, 1998). Dessa maneira, os embriões monoparentais (androgenéticos ou partenogéticos) são incapazes de levar a gestação a termo e

¹ *GTL2*: "Gene trap locus 2" (expressão materna); *IGF2*: "insulin-like growth factor 2" (expressão paterna); *IGF2R*: "insulin-like growth factor 2 receptor" (expressão materna); *NESP55*: "neuroendocrine secretory protein" (expressão materna); *NNAT*: "neuronatin" (expressão paterna); *PEG3*: "paternally expressed gene 3" (expressão paterna); *XIST*: "X (inactive)-specific transcript" (expressão paterna); *DAT*: "DLK1-associated transcripts" (expressão paterna); *DLK1*: "Delta-like 1" (expressão paterna); *H19*: "H19 gene" (expressão materna); *MEG8*: "maternally expressed gene 8" (expressão materna); *MEST*: "Mesoderm-specific transcript" (expressão paterna); *PEG11*: "paternally expressed gene 11" (expressão paterna); *PEG11-AS*: "antisense transcript from PEG11" (expressão materna); *IGF2-AS*: "IGF2-antisense" (expressão paterna); *PEG10*: "paternally expressed gene 10" (expressão paterna); *PLAGL1*: "pleiomorphic adenoma gene-like 1" (expressão paterna).

morrem durante a fase inicial do desenvolvimento intra-uterino. Entretanto, estudos demonstraram que a manipulação do genoma de embriões partenogênicos, a qual levou ao aumento da expressão do *Igf2* e à expressão monoalélica do *H19*, normalizou a expressão de 32 outros genes *imprinted* e possibilitou o nascimento de um camundongo partenogênico (Kono et al., 2004). Isso demonstra a intensa interação existente entre genes *imprinted*.

Esse estudo não foi repetido em outras espécies animais. Assim, em bovinos e ovinos, apesar de os genes de origem materna serem capazes de estabelecer o tamanho adequado das membranas extra-embrionárias (Hagemann et al., 1998; Méo-Niciura, 2005), os embriões partenogênicos morrem na fase em que o desenvolvimento da placenta é crítico para a implantação (Hagemann et al., 1998).

Mecanismos de estabelecimento de *imprints*

Assim como a metilação do DNA participa na inativação do cromossomo X e na expressão de genes tecido-específicos (Young & Fairburn, 2000), acredita-se que a metilação da citosina em sítios de CpG (resíduos de citosina adjacentes a guanina, com mais de 50% de CG – ilhas de CpG) participe no *imprinting* (Alberts et al., 1994; Ruvinsky, 1999). A metilação, que ocorre na posição 5 do anel pirimídico da citosina, transformando-a em 5-metil-citosina, é estabelecida pelas DNA-metiltransferases (Dnmts). As Dnmts são compostas por várias famílias, com diferentes funções: as Dnmt1 são metiltransferases de manutenção (ex.: a Dnmt1 mantém a metilação dos *imprints* durante o desenvolvimento) e as Dnmt3 são “de novo” metiltransferases (ex.: a Dnmt3a promove a metilação na linhagem germinativa e a Dnmt3L regula o estabelecimento do *imprinting*). Camundongos sem o gene *Dnmt* não mantêm a metilase ativa e morrem enquanto ainda estão na fase embrionária, devido ao *imprinting* incorreto (como o observado no gene *Igf2*) ou devido à falha na metilação de diversos genes que dão suporte ao desenvolvimento, com conseqüentes erros na transcrição (Alberts et al., 1994; Lei et al., 1996).

As ilhas de CpG reguladas por metilação de DNA alelo-específica constituem as regiões diferencialmente metiladas (DMRs) que controlam o *imprinting* e, por isso, são chamadas de *imprinting control regions* (Feil & Berger, 2007). A metilação do DNA na região promotora de genes está associada, na maioria dos casos, à inibição da transcrição e ao silenciamento gênico.

Nos genes *imprinted*, para que o padrão de metilação seja transmitido aos descendentes, é necessário que ele já seja estabelecido nos gametas, durante a gametogênese, que é a única fase em que os genomas de origem materna e paterna estão fisicamente separados (Sasaki et al., 1995). Da mesma forma, é essencial que todos os *imprints* herdados do espermatozóide e do oócito sejam “apagados” nas células germinativas do embrião recém-formado, para que o indivíduo produza gametas somente com os padrões de *imprints* relativos ao seu sexo. Portanto, os *imprints* desaparecem nas células germinativas primordiais (Young & Fairburn, 2000) e voltam a aparecer durante a gametogênese, nos gametas maduros (Ruvinsky, 1999).

Durante o desenvolvimento do conceito, há desmetilação global do genoma, logo após a fecundação, e o restabelecimento do padrão de metilação acontece no estágio de blastocisto, em camundongos, ou no estágio de 8 a 16 células, em bovinos (Reik et al., 2001; Mann & Bartolomei, 2002). Entretanto, os genes *imprinted* resistem a essa onda de desmetilação global (Jaenisch, 1997; Ruvinsky, 1999).

Além da metilação do DNA, a estrutura da cromatina, a acetilação, a fosforilação e a metilação das histonas associadas à cromatina e a expressão de transcrito *antisense* e de RNA não-codificante (incluindo microRNA) também constituem mecanismos de controle de *imprinting* (Kendrew, 1994; Ruvinsky, 1999; Young & Fairburn, 2000; Spahn & Barlow, 2003). Por um lado, a cromatina muito condensada (devido à metilação ou à fosforilação) promove restrição à atividade gênica. Por outro lado, a cromatina menos condensada (ou mais aberta; devido à acetilação) cria ambiente mais permissivo para a ativação gênica (Jirtle & Weidman, 2007). Sugere-se que a metilação de DNA esteja associada mecanicamente à modificação da histona: a metilação em CpG recruta outras proteínas que se ligam ao DNA e atraem enzimas que removem o grupo acetil das histonas, condensando a cromatina e limitando a transcrição (Jirtle & Weidman, 2007). Assim, o controle do *imprinting* pode ocorrer por mais de um mecanismo.

Implicações do *genomic imprinting*

a) Para o crescimento e o desenvolvimento:

Em humanos, a alteração em genes *imprinted* desencadeia diversas patologias. A dissomia uniparental do cromossomo 15q11-13, quando de origem

materna, provoca a síndrome de Prader Willi e, quando de origem paterna, a síndrome de Angelman. A dissomia ou a trissomia parcial do cromossomo 11p15.5 de origem paterna desencadeia a síndrome de Beckwith-Wiedemann, que provoca supercrescimento fetal, provavelmente devido à expressão excessiva do *Igf2*. O aumento ou a diminuição da expressão de genes *imprinted* pode contribuir em alguns casos de câncer, como o tumor de Wilms e o rabdomiossarcoma provocados por dissomia paterna do cromossomo 11p. É ignorado se a carcinogênese é afetada pela superexpressão de fatores de crescimento *imprinted* ou pela inativação epigenética de genes supressores de tumor (Kendrew, 1994).

Outro caso de patologia provocada por *imprinting* é a doença de Huntington, que é letal no adulto e cuja idade de aparecimento dos sintomas varia, mas é mais precoce em filhos de pai afetado pela doença. A diabetes melito dependente de insulina (diabetes juvenil) é menos transmitida aos descendentes de mulheres afetadas do que aos de homens afetados pela doença (Solter, 1988). Nas fêmeas com síndrome de Turner (X0), o fenótipo cognitivo e o fenótipo social dependem de qual X está presente (de origem paterna ou materna). Efeitos de origem parental também ocorrem em outras condições neuro comportamentais, como autismo, doença de Alzheimer, desordem bipolar e esquizofrenia (Jirtle & Weidman, 2007).

b) Nas biotecnologias com embriões:

O cultivo *in vitro* e outras manipulações de embriões, no momento em que os *imprints* são estabelecidos ou mantidos, são candidatos em potencial à indução de erros que podem levar a anomalias e a contribuir para a baixa eficiência observada em muitos desses procedimentos.

Os componentes do meio de cultivo podem interagir com os genes *imprinted* e provocar modificações epigenéticas, como a remoção de metilações. Oócitos coletados para a produção de embriões podem ser oriundos de folículos imaturos ou atresícos e que, normalmente, não ovulariam e poderiam apresentar defeitos de *imprinting* (Young & Fairburn, 2000).

Em humanos, as tecnologias de reprodução assistida, tais como a injeção espermática intracitoplasmática e a fecundação *in vitro*, aumentam a incidência de patologias relacionadas às falhas de *imprinting* (Cox et al., 2002; DeBaun et al., 2003). Em camundongos, foi observada expressão anômala do gene *H19* após

intensa manipulação dos embriões (Sasaki et al., 1995). Em bovinos e ovinos produzidos *in vitro*, a síndrome do bezerro gigante pode ser causada por diversos genes *imprinted* com expressão alterada (Young & Fairburn, 2000).

O padrão de metilação dos genes é essencial para o sucesso dos programas de clonagem a partir de células somáticas. Os núcleos derivados de células somáticas possuem padrão específico de metilação, diferente daquele do embrião precoce. Dessa maneira, para que a clonagem tenha sucesso, o padrão somático de metilação deve ser apagado e transformado em embrionário (reprogramação nuclear), sem que os genes *imprinted* sejam alterados. Uma vez que isso nem sempre ocorre, defeitos no crescimento da placenta e falhas no suprimento sanguíneo são observados em clones de bovinos, tanto devido às alterações da metilação do DNA (Bourc'his et al., 2001; Dean et al., 2001; Kang et al., 2001; Cezar et al., 2003) como devido à expressão anormal de genes *imprinted* (Rideout III et al., 2001; Niemann et al., 2002; Zhang et al., 2004). Foi observada redução de expressão de *IGF2* e de *IGF2R* em fetos e em placentas de clones bovinos (Perecin, 2007) e de *H19* e de *IGF2* em placenta de clones bovinos a termo (Yamazaki, 2006). A redução da expressão do *H19* foi ainda mais marcante na placenta de clones fêmeas, o que sugere que o processo de reprogramação de alguns genes pode ser influenciado pelo sexo do concepto (Yamazaki, 2006).

c) Na produção animal:

É possível que o conhecimento do mecanismo (paterno ou materno) usado por um gene para entrar na próxima geração possa ser adotado em alguns programas de seleção animal (Ruvinsky, 1999).

Em suínos, a investigação do papel do *imprinting* na composição corporal identificou quatro *quantitative trait loci* (QTL) *imprinted* (iQTL): um de expressão paterna para espessura de toucinho no cromossomo 2; um de expressão materna para deposição de gordura no cromossomo 7; e um de expressão paterna e outro de expressão materna para gordura intramuscular no cromossomo 6 (Koning et al., 2000). Para características reprodutivas, foram encontrados iQTLs de expressão materna relacionados ao número de leitões natimortos no cromossomo 14 e ao número de fetos mumificados no cromossomo 2; e de expressão paterna relacionados à idade à puberdade no cromossomo 15, ao número de tetos nos cromossomos 1, 6 e 15, e ao número de fetos mumificados no cromossomo 6 (Holl et al., 2004). Por mapeamento fino, um iQTL, com efeito sobre massa muscular no cromossomo 2 suíno, foi mapeado em um segmento cromossômico de ~250 kb, o qual continha os genes de expressão paterna *INS* e *IGF2* (Nezer et al., 2003).

Diferenças na gestação de bardotos (jumenta x cavalo) e de mulas (égua x jumento) podem ser atribuídas ao *imprinting*, que influencia a produção do hormônio eCG (Ruvinsky, 1999).

Identificação de genes *imprinted*

Genes *imprinted* podem ser identificados pela utilização de animais portadores de dissomia uniparental ou de translocações cromossômicas; pela avaliação da expressão diferencial entre conceitos androgenéticos e partenogenéticos (por hibridização subtrativa ou *differential display*); e, também, pela avaliação de genes candidatos conhecida *imprinted* em outras espécies. Além disso, genes *imprinted* podem ser inferidos pela identificação de ilhas de CpG, com o auxílio de programas (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>), e de DMRs em genes candidatos. O estado de metilação das DMRs pode ser determinado por meio de digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação² ou por tratamento

² A digestão do DNA com enzima de restrição sensível à metilação (tais como *CfoI*, *HpaII*, *Maell*, *MluI*, *NotI* e *XhoI*) promove clivagem somente do alelo não-metilado.

com bissulfito seguido de seqüenciamento ou de reação em cadeia da polimerase (PCR) de metilação-específica³ (Trinh et al., 2001). Entretanto, a confirmação do *imprinting* se dá por meio da avaliação da expressão gênica alelo-específica parental⁴.

Uma vez que essas técnicas são laboriosas e só permitem a avaliação de poucos genes, tem-se utilizado o mapeamento genético para identificação de genes *imprinted* baseado em mapas de ligação. Para tanto, métodos estatísticos que incorporam o *genomic imprinting* no mapeamento genético de QTLs estão sendo desenvolvidos (Cui, 2007). Nessas análises, o efeito de *imprinting* deve ser diferenciado do efeito materno⁵.

Considerações finais

Além do código genético, fatores citoplasmáticos ou epigenéticos interferem na expressão gênica. A expressão de alguns genes controlada pela sua origem, materna ou paterna, denominada de *genomic imprinting*, derrubou algumas bases genéticas estabelecidas e contribuiu para a compreensão de diversos fenômenos anteriormente inexplicados.

³ O tratamento do DNA com bissulfito de sódio converte as citosinas não-metiladas em uracilas (transformação do DNA com bissulfito). Posteriormente, faz-se a amplificação do DNA transformado por PCR. Para isso, duas estratégias podem ser utilizadas: 1) utilização de *primers* desenhados para cobrir os sítios potenciais de metilação: PCR de metilação-específica (duas reações separadas, uma com *primers* para segmento metilado e outra para não-metilado); 2) amplificação com *primers* que evitam sítios de CpG, seguida de análise do produto por seqüenciamento (seqüenciamento com bissulfito) ou por digestão com enzima de restrição (*combined bisulfite restriction analysis*).

⁴ Comparação entre as seqüências de produtos de RT-PCR e de PCR de DNA genômico, em indivíduos heterozigotos (com polimorfismos conhecidos), visando à determinação da origem parental do alelo expresso.

⁵ A expressão de um gene *imprinted* depende do sexo do parente do qual ele foi herdado e, como resultado, os heterozigotos recíprocos podem apresentar diferentes fenótipos (o indivíduo que herdou o alelo A₁ da mãe e o alelo A₂ do pai possui fenótipo diferente do indivíduo que herdou o A₁ paterno e o A₂ materno). Em contraste, o efeito materno surge quando, além da herança direta dos alelos, as características genéticas e as ambientais (fenótipicas) da mãe influenciam o fenótipo da progênie. Esses efeitos contribuem para a semelhança entre filhos da mesma mãe e entre mãe e filhos para características como crescimento da progênie, produção e suscetibilidade a doenças (Santure & Spencer, 2006).

O *imprinting* participa na regulação do crescimento do feto, no suprimento sanguíneo e na formação da placenta, na supressão de tumores, na proteção do organismo contra DNA estranho, na memória celular, na expressão de hormônios e na produtividade de animais, entre outros. Portanto, tal mecanismo é de extrema importância para a vitalidade do organismo e para a realização plena de suas funções. Dessa maneira, o *imprinting* anômalo pode acarretar falhas no desenvolvimento e no crescimento, no surgimento de doenças humanas e animais, na formação de tumores e no envelhecimento celular.

Portanto, o estudo dos mecanismos de *imprinting*, das suas implicações e das suas possibilidades de correção faz-se necessário, pois pode facilitar a compreensão de diversos mecanismos fisiológicos, trazer benefícios à saúde humana e animal e servir como ferramenta na seleção de animais superiores.

Referências bibliográficas

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York : Garland Publishing, 1994. p. 451.

BEAUDET, A. L.; JIANG, Y. H. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprinting-dependent evolution. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 6, p. 1389-1397, 2002.

BOURC'HIS, D.; Le BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, v. 11, n. 19, p. 1542-1546, 2001.

CEZAR, G. G.; BARTOLOMEI, M. S.; FORSBERG, E. J.; FIRST, N. L.; BISHOP, M. D.; EILERTSEN, K. J. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 1009-1014, 2003.

COX, G. F.; BÜRGER, J.; LIP, V.; MAU, U. A.; SPERLING, K.; WU, B-L.; HORSTHEMKE, B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 1, p. 162-164, 2002.

CRUZ, Y. P.; PEDERSON, R. A. Origin of embryonic and extraembryonic cell lineages in mammalian embryos. In: PEDERSON, R. A.; MCLAREN, A.; FIRST, N. (Ed.). **Animal application of research in mammalian development**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 147-204.

CUI, Y. A statistical framework for genome-wide scanning and testing of imprinted quantitative trait loci. **Journal of Theoretical Biology**, v. 244, n. 1, p. 115-126, 2007.

DAVIES, W.; ISLES, A.; SMITH, R.; KARUNADASA, D.; BURRMANN, D.; HUMBY, T.; OJARIKRE, O.; BIGGIN, C.; SKUSE, D.; BURGOYNE, P.; WILKINSON, L. Xlr3b is a new imprinted candidate for X-linked parent-of-origin effects on cognitive function in mice. **Nature Genetics**, v. 37, n. 6, p. 625-629, 2005.

DEAN, W.; BOWDEN, L.; AITCHISON, A.; KLOSE, J.; MOORE, T.; MENESES, J. J.; REIK, W.; FEIL, R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. **Development**, v. 125, n. 12, p. 2273-2282, 1998.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.

DeBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, n.1, p. 156-160, 2003.

FEIL, R.; BERGER, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 192-199, 2007.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, A. J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S.; TERVIT, H. R. In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, n. 2, p. 154-162, 1998.

HOLL, J. W.; CASSADY, J. P.; POMP, D.; JOHSON, R. K. A genome scan for quantitative trait loci and imprinted regions affecting reproduction in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3421-3429, 2004.

IMPRINTED gene catalogue. Disponível em: <<http://igc.otago.ac.nz/home.html>>. Acesso em: 9 maio 2007.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends in Genetics**, v. 13, n. 8, p. 323-329, 1997.

JIRTLE, R. L.; WEIDMAN, J. R. Imprinted and more equal: why silence perfectly good copies of important genes? The answer may lie in a battle between mother and father staged in the genome of their offspring. **American Scientist**, v. 95, n. 2, p. 143-149, 2007. Disponível em: <<http://www.americanscientist.org/IssueTOC/issue/941>>. Acesso em: 9 maio 2007.

KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, A. S.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature Genetics**, v. 28, n. 2, p. 173-177, 2001.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

KONING, D. J. de; RATTINK, A. P.; HARLIZIUS, B.; van ARENDONK, J. A. M.; BRASCAMP, E. W.; GROENEN, M. A. M. Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 7947-7950, 2000.

KONO, T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. **Reproduction Fertility and Development**, v. 10, n. 7-8, p. 593-598, 1998.

KONO, T.; OBATA, Y.; WU, Q.; NIWA, K.; ONO, Y.; YAMAMOTO, Y.; PARK, E. S.; SEO, J.-S.; OGAWA, H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. **Nature**, v. 428, n. 6985, p. 860-864, 2004.

LEFEBVRE, L.; VIVILLE, S.; BARTON, S. C.; ISHINO, F.; KEVERNE, E. B.; SURANI, M. A. Abnormal maternal behavior and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 163-169, 1998.

LEI, H.; OH, S. P.; OKANO, M.; JUTTERMANN, R.; GROSS, K. A.; JAENISCH, R.; LI, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **Development**, v. 122, n. 10, p. 3195-3205, 1996.

LIZE, A.; CORTESERO, A. M.; ATLAN, A.; POINSOT, D. Kin recognition in *Aleochara bilineata* could support the kinship theory of genomic imprinting. **Genetics**, v. 175, n. 4, p. 1735-1740, 2007.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA Jr., J.; CAPPAL, P.; MOOR, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 5, p. 1177-1187, 1998.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, reviews1003, 2002.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 179-183, 1984.

MÉO-NICIURA, S. C. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos**. 2005. 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

NEZER, C.; COLLETTE, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B.; KIM, J.-J.; GIUFFRA, E.; BUYS, N.; ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Haplotype sharing refines the location of an imprinted quantitative trait locus with major effects on muscle mass to a 250-kb chromosome segment containing the porcine *IGF2* gene. **Genetics**, v. 165, n.1, p. 277-285, 2003.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer derived embryos and their implications for early development. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, n. 1, p. 29-38, 2002.

PERECIN, F. **Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas**. 2007. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p.1089-1093, 2001.

RIDEOUT III, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1093-1098, 2001.

RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **Journal of Animal Science**, v. 77, supl. 2, p. 228-237, 1999.

SANTURE, A. W.; SPENCER, H. G. Influence of mom and dad: quantitative genetic models for maternal effects and genomic imprinting. **Genetics**, v. 173, n. 4, p. 2297-2316, 2006.

SASAKI, H.; FERGUSON-SMITH, A. C.; SHUM, A. S.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Temporal and spatial regulation of *H19* imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development**, v. 121, n. 12, p. 4195-4202, 1995.

SOLTER, D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 127-146, 1988.

SPAHN, L.; BARLOW, D. P. An ICE pattern crystallizes. **Nature Genetics**, v. 35, n. 1, p. 11-12, 2003.

SPIELMAN, M.; VINKENOOG, R.; DICKINSON, H. G.; SCOTT, R. J. The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 12, p. 705-711, 2001.

TANAKA, M.; PUCHYR, M.; GERTSENSTEIN, M.; HARPAL, K.; JAENISCH, R.; ROSSANT, J.; NAGY, A. Parental origin-specific expression of *Mash2* is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation. **Mechanisms of Development**, v. 87, n. 1-2, p. 129-142, 1999.

TODER, R.; WILCOX, S. A.; SMITHWICK, N.; GRAVES, J. A. The human/mouse imprinted genes IGF2, H19, SNRPN and ZNF127 map to two conserved autosomal clusters in marsupial. **Chromosome Research**, v. 4, n. 4, p. 295-300, 1996.

TRINH, B. N.; LONG, T. I.; LAIRD, P. W. DNA methylation analysis by MethyLight technology. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 456-462, 2001.

VARMUZA, S.; MANN, M. Genomic imprinting defusing the ovarian time bomb. **Trends in Genetics**, v. 10, n. 4, p. 118-123, 1994.

WATSON, J. D.; ZOLLER, M.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. **Recombinant DNA**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1992. p. 267-272.

WATTS, P. C.; BULEY, K. R.; SANDERSON, S.; BOARDMAN, W.; CIOFI, C.; GIBSON, R. Parthenogenesis in Komodo dragons. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1021-1022, 2006.

WOLF, J. B.; HAGER, R. A maternal-offspring coadaptation theory for the evaluation of genomic imprinting. **PLoS Biology**, v. 4, n. 12, p. e380, 2006.

YAMAZAKI, W. **Estudo do “genomic imprinting” na placenta de clones bovinos**. 2006. 93f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 627-648, 2000.

ZHANG, S.; KUBOTA, C.; YANG, L.; ZHANG, Y.; PAGE, R.; O'NEILL, M.; YANG, X.; TIAN, X. C. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1540-1544, 2004.

MicroRNA: UMA NOVA CLASSE DE MODULADORES DA EXPRESSÃO GÊNICA

Luiz Lehmann Coutinho, Ana Paula Dini Andreote e Érika Cristina Jorge
Departamento de Zootecnia – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP,
Piracicaba – SP, Brasil

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe abundante de moléculas pequenas de RNA não-codificante, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, com capacidade de regular a expressão gênica por meio de controle da tradução ou da degradação do RNA mensageiro (RNAm) (Ambros et al., 2003). Estes microRNAs foram originalmente descobertos em *Caenorhabditis elegans*, como reguladores pós-transcricionais de genes envolvidos com o processo de desenvolvimento (Lee et al., 1993; Ambros et al., 2003), e agora são identificados em todos os organismos multicelulares, com a capacidade de modular a expressão de centenas de genes (Lim et al., 2005; Shingara et al., 2005). Eles atuam em vários processos biológicos, entre eles a morfogênese do cérebro (Giraldez et al., 2005), a degradação de RNAm materno durante o início do desenvolvimento (Giraldez et al., 2006), a secreção de insulina (Poy et al., 2004), a proliferação e a diferenciação de cardiomiócito (Zhao et al., 2005), a tumorigênese, a defesa viral (Lecellier et al., 2005), a diferenciação hematopoiética (Chen & Lodish, 2005), o desenvolvimento embrionário (Tang et al., 2007) e o desenvolvimento muscular (McCarthy & Esser, 2007).

Os microRNAs são transcritos na forma de miRNA primário pela enzima RNA-polimerase II e contêm um *cap* 5' e uma cauda poli-A característicos (Lee et al., 2002; Smalheiser, 2003; Cai et al., 2004). MicroRNAs também podem ser transcritos como parte do íntron de um RNAm primário. Enquanto ainda no núcleo, o miRNA primário apresenta a estrutura secundária do tipo grampo, que é reconhecida e clivada pela enzima *Drosha*, uma RNase que reconhece RNA de fita dupla (Lee et al., 2003). A molécula resultante é um RNA de fita dupla de aproximadamente 70 nucleotídeos, na forma de grampo, e com terminais protuberantes na extremidade 5' ou 3'. Esta estrutura é denominada pré-miRNA (Figura 1). Este pré-microRNA é então transportado do núcleo para o citoplasma por uma proteína conhecida com *Exportin-5* (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004) (Figura 1). No citoplasma, a enzima

Dicer, membro da superfamília de RNase III, cliva este pré-miRNA (Lee et al., 2003; Yi et al., 2003) em uma molécula de RNA de fita dupla, com extremidades 5' e 3' protuberantes (Lund et al., 2004). Uma das fitas de RNA (de aproximadamente 22 nucleotídeos) associa-se com o complexo de silenciamento de RNA induzido (RISC) e transforma-se na forma ativa e madura do miRNA. Esta forma madura modula a expressão gênica por meio de interação com regiões específicas da porção 3' dos RNAm (Schwarz et al., 2003) (Figura 1).

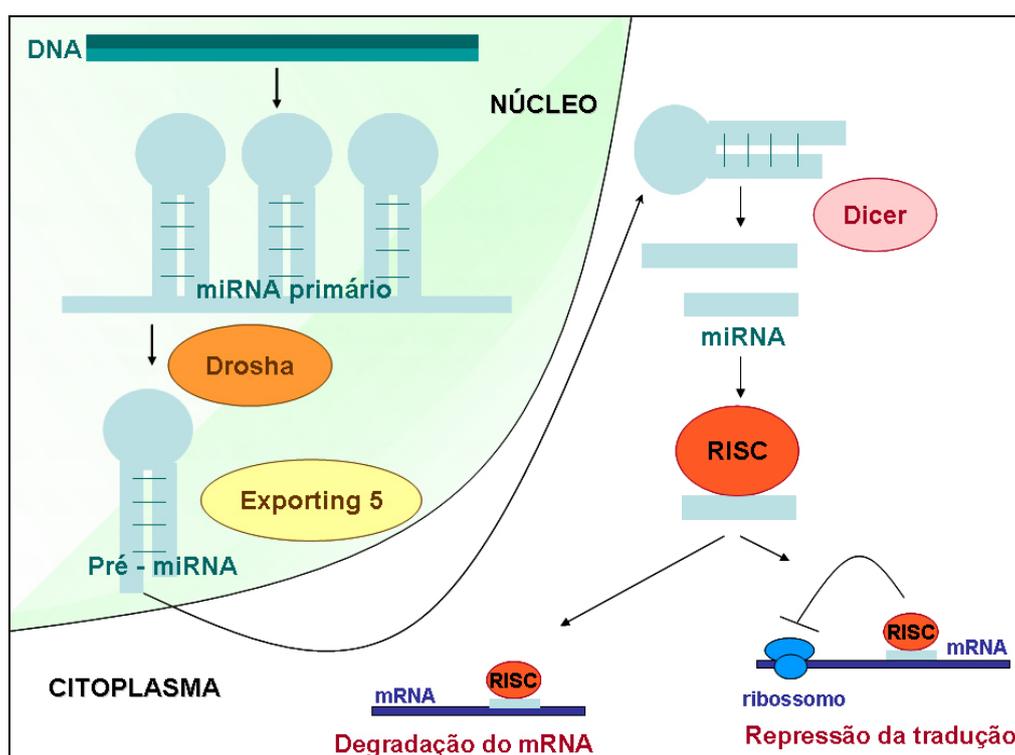


Figura 1. Biogênese e modo de ação dos microRNAs.

A maneira exata pela qual os miRNAs modulam a expressão gênica ainda não está totalmente elucidada. Estudos recentes apontam que os mecanismos são pós-transcricionais, envolvendo a inibição da tradução nas fases de iniciação e de alongação, ou levando diretamente à degradação do RNAm-alvo. Estudos sugerem que os microRNAs reconhecem o RNAm-alvo por interações de pareamento de bases entre a extremidade 5' do microRNA e de seqüências complementares na região 3'UTR do RNAm-alvo (Nilsen, 2007).

O padrão de expressão dos miRNAs é diferente nos diversos tecidos (Barad et al., 2004; Liu et al., 2004; Farh et al., 2005; Lim et al., 2005; Shingara et al., 2005)

e a abundância de um miRNA específico varia de algumas cópias a mais de 30.000 moléculas por célula (Chen et al., 2005).

Até o momento, 4.321 miRNA já foram descritos: 474 em humanos, 98 em bovinos, 149 em aves e 54 em suínos (miRBASE, 2007). Programas de bioinformática e experimentos de clonagem desenvolvidos para identificar miRNAs no genoma sugerem a existência de aproximadamente 800 miRNAs no genoma humano. Estes programas buscam em bancos de dados genômicos por seqüências de aproximadamente 70 bases, que apresentem potencial de formar um RNA de fita dupla estável e que seja conservado entre espécies (uma lista dos programas pode ser encontrado em Kim & Nam, 2006).

A comprovação da existência de um novo miRNA deve ser feita utilizando-se estratégias independentes e complementares, ou seja, é preciso que o miRNA seja detectado (por *Northern blot* ou por clonagem, por exemplo) e que a seqüência do miRNA primário, obtido da seqüência genômica da espécie em estudo, tenha capacidade de formar a estrutura de RNA de fita dupla característica dos miRNAs (Ambros et al., 2003).

A clonagem de miRNAs pode ser feita com a construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) com base na fração de RNA de baixo peso molecular, de tamanho entre 15 e 25 bases. Estas bibliotecas permitem a clonagem dos microRNAs expressos em um tecido de interesse. Neste caso, um cuidado especial deve ser observado no processo de extração de RNA total, pois alguns métodos de purificação do RNA podem eliminar a fração de baixo peso molecular. Uma vez obtido o RNA total, diferentes procedimentos podem ser utilizados para enriquecer a amostra com RNA de baixo peso molecular. As estratégias para esta etapa variam desde a precipitação do RNA de alto peso molecular com polietilenoglicol, até a utilização de colunas ou de sistema de eletroforese para o isolamento das moléculas menores. A fração enriquecida de RNA com fragmentos de 15 a 25 bases é isolada em gel de acrilamida. Após a eluição do gel, adaptadores são ligados aos RNAs pela ação de uma RNA-ligase. Estes adaptadores utilizados são compostos de oligonucleotídeos modificados com o objetivo de facilitar a ligação dos adaptadores com o RNA e de impedir a ligação dos adaptadores entre si. Após a ligação, uma transcrição reversa é realizada a partir de um *primer* complementar ao adaptador 3'. Finalmente, é feita uma reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de *primers*

complementares aos adaptadores, com posterior clonagem e seqüenciamento. A Figura 2 ilustra as etapas empregadas para a clonagem de miRNAs.

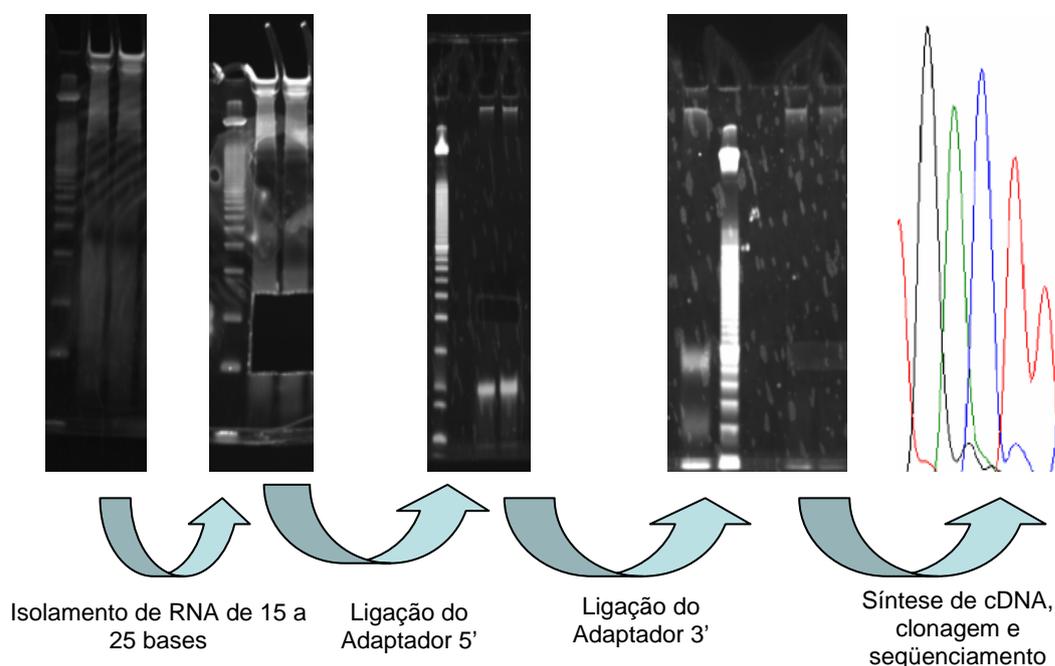


Figura 2. Metodologia utilizada para clonar e identificar microRNAs.

Uma vez identificado um novo microRNA, este precisa ser validado pelos critérios de formação de fita dupla e de conservação entre espécies. Como o miRNA clonado representa o miRNA maduro, de aproximadamente 22 bases, é necessário identificar as regiões genômicas que flanqueiam o miRNA. Isto pode ser feito com o auxílio dos bancos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou da *University of California, Santa Cruz* (UCSC; <http://genome.ucsc.edu/>). Para exemplificar, apresentamos a seguir as etapas necessárias para validar a identidade de um miRNA. Como exemplo, utilizamos o hsa-mir-26a, um miRNA identificado em seres humanos (Figura 3).

1- Sequencia do miRNA obtida de uma biblioteca de cDNA

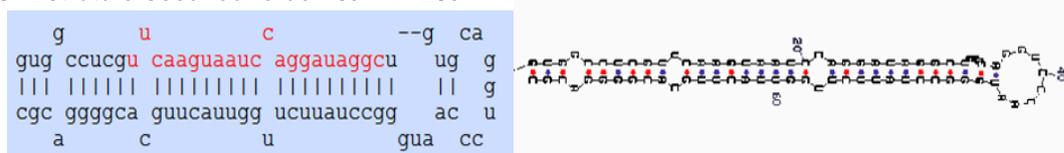
hsa-miR-26a UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC

2- Sequencia genômica flanqueando o hsa-mir-26a

GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGUGCAGGUCCAAUGGGCCUAUUCUUGGUUACUUGCACGGGGACGC

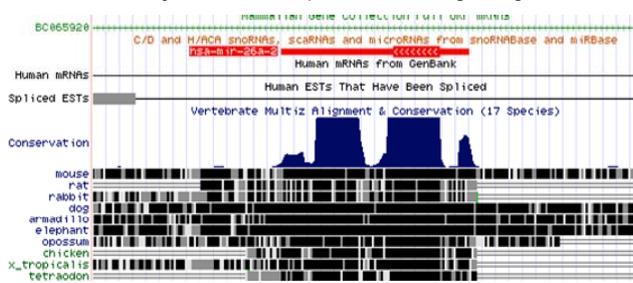
(obtida por alinhamento da sequencia clonada com sequencia genômica. Pode ser realizado por Blat no site da UCSC).

3- Estrutura secundário do hsa-mir-26a



(pode ser obtida com o programa mfold (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>))

4- Conservação entre espécies da região genômica que contem a sequencia do hsa-mir-26a



(obtido no site da UCSC)

Figura 3. Etapas que envolvem bioinformática para a validação de um novo microRNA.

A importância desta nova classe de pequenos RNAs não-codificantes para a produção animal foi elegantemente comprovada em trabalho realizado pela equipe do Dr. Michel George, da Bélgica (Clop et al., 2006). Nesse estudo, o *quantitative trait locus* (QTL) que controla o fenótipo de musculidade observado em ovinos da raça Texel foi mapeado no cromossomo 2, em um intervalo que continha o gene GDF-8. No entanto, o seqüenciamento da região codificante do gene GDF-8 não revelou polimorfismos nesta região. A mutação foi identificada na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene GDF-8 e associada à característica de musculidade observada em animais Texel. Os autores observaram que a mutação nesta região criava um sítio de interação com os microRNAs mir1 e mir206, normalmente expressos no tecido muscular. Estudos de imunodeteção revelaram que animais portadores da mutação possuem um terço do nível de miostatina (GDF-8) observado no soro de animais normais. Estudos de expressão do gene GDF-8 em animais

heterozigotos para a mutação revelaram que a abundância do RNAm do alelo normal da miostatina era 1,5 vezes superior à do alelo mutante. Estes dois resultados estão de acordo com o mecanismo de ação proposto para os miRNA, ou seja, na regulação da tradução e na alteração da estabilidade do RNAm de um gene-alvo.

Esta nova classe de RNA adiciona mais um nível de complexidade no já intrincado mecanismo de controle da expressão gênica e ao mesmo tempo abre novas perspectivas para que possamos avançar o nosso conhecimento sobre as bases moleculares que controlam a variabilidade fenotípica observada nos seres vivos.

Referências bibliográficas

AMBROS, V.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B.; CARRINGTON, J. C.; CHEN, X.; DREYFUSS, G.; EDDY, S. R.; GRIFFITHS-JONES, S.; MARSHALL, M.; MATZKE, M.; RUVKUN, G.; TUSCHL, T. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, v. 9, n. 3, p. 277-279, 2003.

BARAD, O.; MEIRI, E.; AVNIEL, A.; AHARONOV, R.; BARZILAI, A.; BENTWICH, I.; EINAV, U.; GILAD, S.; HURBAN, P.; KAROV, Y.; LOBENHOFER, E. K.; SHARON, E.; SHIBOLETH, Y. M.; SHTUTMAN, M.; BENTWICH, Z.; EINAT, P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. **Genome Research**, v. 14, n. 12, p. 2486-2494, 2004.

CAI, X.; HAGEDORN, C. H.; CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA**, v. 10, n. 12, p. 1957-1966, 2004.

CHEN, C.; RIDZON, D. A.; BROOMER, A. J.; ZHOU, Z.; LEE, D. H.; NGUYEN, J. T.; BARBISIN, M.; XU, N. L.; MAHUVAKAR, V. R.; ANDERSEN, M. R.; LAO, K. Q.; LIVAK, K. J.; GUEGLER, K. J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005.

CHEN, C. Z.; LODISH, H. F. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. **Seminars in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 155-165, 2005.

CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBE, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSEIN, J. M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 813-818, 2006.

FARH, K. K.; GRIMSON, A.; JAN, C.; LEWIS, B. P.; JOHNSTON, W. K.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1817-1821, 2005.

GIRALDEZ, A. J.; CINALLI, R. M.; GLASNER, M. E.; ENRIGHT, A. J.; THOMSON, J. M.; BASKERVILLE, S.; HAMMOND, S. M.; BARTEL, D. P.; SCHIER, A. F. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. **Science**, v. 308, n. 5723, p. 833-838, 2005.

GIRALDEZ, A. J.; MISHIMA, Y.; RIHEL, J.; GROCOCK, R. J.; VAN DONGEN, S.; INOUE, K.; ENRIGHT, A. J.; SCHIER, A. F. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 75-79, 2006.

KIM, V. N.; NAM, J. W. Genomics of microRNA. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006.

LECELLIER, C. H.; DUNOYER, P.; ARAR, K.; LEHMANN-CHE, J.; EYQUEM, S.; HIMBER, C.; SAIB, A.; VOINNET, O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 557-560, 2005.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-419, 2003.

LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J. T.; KIM, S.; KIM, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO Journal**, v. 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002.

LIM, L. P.; LAU, N. C.; GARRETT-ENGELE, P.; GRIMSON, A.; SCHELTER, J. M.; CASTLE, J.; BARTEL, D. P.; LINSLEY, P. S.; JOHNSON, J. M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769-773, 2005.

LIU, C. G.; CALIN, G. A.; MELOON, B.; GAMLIEL, N.; SEVIGNANI, C.; FERRACIN, M.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; ZUPO, S.; DONO, M.; ALDER, H.; BULLRICH, F.; NEGRINI, M.; CROCE, C. M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9740-9744, 2004.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-98, 2004.

McCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and MicroRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 1, p. 306-313, 2007.

miRBASE. Disponível em: <<http://microrna.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 28 fevereiro 2007.

NILSEN, T. W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 5, p. 243-249, 2007.

POY, M. N.; ELIASSON, L.; KRUTZFELDT, J.; KUWAJIMA, S.; MA, X.; MACDONALD, P. E.; PFEFFER, S.; TUSCHL, T.; RAJEWSKY, N.; RORSMAN, P.; STOFFEL, M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 226-230, 2004.

SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.

SHINGARA, J.; KEIGER, K.; SHELTON, J.; LAOSINCHAI-WOLF, W.; POWERS, P.; CONRAD, R.; BROWN, D.; LABOURIER, E. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. **RNA**, v. 11, n. 9, p. 1461-1470, 2005.

SMALHEISER, N. R. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. **Genome Biology**, v. 4, n. 7, p. 403, 2003.

TANG, F.; KANEDA, M.; O'CARROLL, D.; HAJKOVA, P.; BARTON, S. C.; SUN, Y. A.; LEE, C.; TARAKHOVSKY, A.; LAO, K.; SURANI, M. A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes & Development**, v. 21, n. 6, p. 644-648, 2007.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, n. 24, p. 3011-3016, 2003.

ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 214-220, 2005.

ANÁLISE PROTEÔMICA

Marcelo Delmar Cantú

Dow Química, São Paulo, SP, Brasil.

Proteoma é o conjunto de proteínas que, sob determinadas condições, são codificadas e expressas por um genoma. A análise proteômica, cuja definição é o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar (qualitativamente e quantitativamente) um proteoma, trata-se da área interdisciplinar da ciência que agrega principalmente química, biologia e informática. A sinergia oriunda de tamanha interdisciplinaridade faz-se necessário num cenário em que se pretende estudar a função e o comportamento dos genes com base na identificação das proteínas por eles codificadas e por eles expressas. Neste contexto, muitas vezes é necessário não somente determinar o conjunto e a quantidade de proteínas presentes em uma amostra, o que por si só apresenta alto grau de dificuldade, mas também caracterizar as inúmeras e as comumente presentes isoformas das proteínas, produto de modificações pós-traducionais que elas sofreram, e por fim as interações dessas proteínas (Aebersold & Mann, 2003; Tyers & Mann, 2003; Ong & Mann, 2005). Tais estudos são tipicamente desafiadores, devido ao alto grau de complexidade das amostras e à baixíssima concentração de determinadas proteínas, o que requer o uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis. Assim, a espectrometria de massa (MS) trata-se da ferramenta ideal para aplicações proteômicas, fato esse atribuído à sua capacidade de analisar proteínas e peptídeos com alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade.

Estratégias para abordar um estudo proteômico: *bottom-up* vs. *top-down*

Existem basicamente duas maneiras de se abordar um estudo proteômico no que diz respeito à estratégia empregada para analisar a amostra por espectrometria de massa (MS); elas são classificadas em *bottom-up* e *top-down* (McLafferty, 2001; Bogdanov & Smith, 2004). No caso da abordagem *bottom-up* é necessário isolar a(s) proteína(s) de interesse, realizar procedimento de clivagem enzimática e então submeter os peptídeos formados à análise por MS. Em posse desses resultados,

ferramentas de busca procuram correlacionar os dados obtidos com as informações contidas em bancos de dados de proteínas, permitindo assim sua identificação (Figura 1). Essa abordagem é a mais comumente empregada, uma vez que mesmo espectrômetros de massa relativamente simples e de baixo custo são capazes de fornecer resultados satisfatórios para a análise de peptídeos. No entanto, um arranjo do tipo *bottom-up* que empregue uma única enzima apresentará a desvantagem de tipicamente proporcionar baixa cobertura da seqüência de aminoácidos constituinte da proteína; todavia, algo em torno de 50% já é considerado positivo (Wilm et al., 1996; Kelleher et al., 1999). Ou seja, apenas uma parte dos peptídeos originados pela clivagem enzimática é analisada ou fornece dados confiáveis para interpretação. Em decorrência da baixa taxa de cobertura inerente ao arranjo experimental do tipo *bottom-up*, surge outra limitação desta estratégia, que é a restrita capacidade de prover informações inerentes às modificações pós-traducionais. É intuitivo concluir que, se uma baixa cobertura de aminoácidos é obtida, a chance de não analisar aminoácidos que porventura estejam modificados seja maior (Figura 1; Kelleher et al., 1999). Porém, no arranjo *top-down* a amostra de proteína(s) é submetida diretamente à análise por MS, ou seja, intacta. Primeiramente, deve-se determinar, com grande exatidão, a massa molecular da proteína em questão e posteriormente realizar estágios de fragmentação da proteína que proporcionam a identificação de pequenos trechos de seqüência e que permitem a identificação da proteína (Figura 1). Nessa abordagem, a cobertura da seqüência é total. No entanto, essa estratégia requer o uso de espectrômetros de massa de altíssima resolução e de altíssima exatidão (e, por conseqüência, de altíssimo custo), que até pouco tempo atrás não eram sequer comercialmente disponíveis (Bogdanov & Smith, 2004).

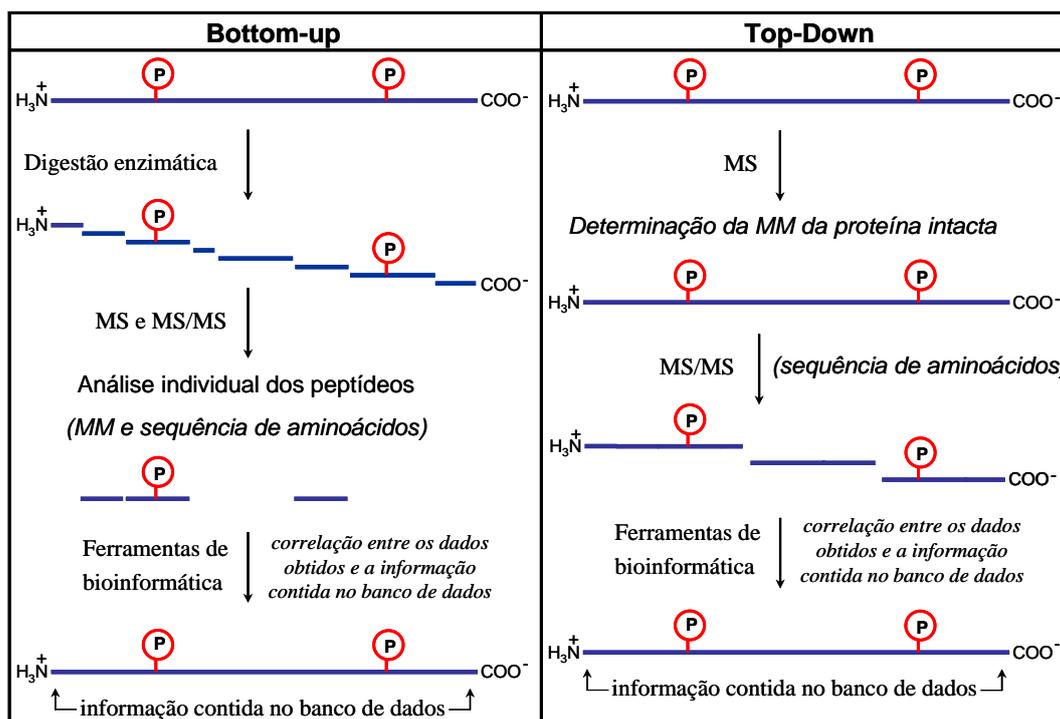


Figura 1. Esquema de comparação das estratégias *bottom-up* e *top-down*, empregadas em análise proteômica. MS: espectrometria de massa; MM: massa molecular.

Assim, o altíssimo custo dos equipamentos requeridos para a abordagem *top-down* faz com que a estratégia mais tradicional ganhe espaço e, mesmo que com limitações, seja a mais largamente empregada.

Detalhamento de um estudo proteômico com emprego da abordagem *bottom-up*

Em linhas gerais, é possível descrever um estudo proteômico que use a estratégia *bottom-up* em seis etapas (Figura 2), que são descritas a seguir:

i) As proteínas a serem analisadas devem ser primeiramente extraídas de lisados celulares ou de tecidos e submetidas a etapas de separação (eletroforese unidimensional ou bidimensional, cromatografia líquida).

ii) Após a etapa de obtenção e de purificação, o próximo passo é converter a(s) proteína(s) isolada(s) em um conjunto de peptídeos. Isso é feito com o uso de enzimas que promovem a clivagem das proteínas em pontos específicos.

iii) Os peptídeos obtidos podem ser separados por meio da técnica de cromatografia líquida (unidimensional ou multidimensional), ionizados e transferidos

(usando as técnicas de *electrospray* ou de *matrix-assisted laser desorption and ionization*) para o analisador de massa.

iv) Nesta etapa, o espectro de massa dos peptídeos oriundos da digestão enzimática é adquirido. Este resultado indica a relação entre a massa e a carga (m/z) e conseqüentemente a massa molecular dos peptídeos. Para esse tipo de dado experimental, dá-se o nome de *peptide mass fingerprint* (PMF).

v) Os peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamados de íons precursores) são isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. Os fragmentos formados são então analisados e o espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS.

vi) Ao final do processo, os resultados inerentes à massa molecular dos peptídeos, obtida com base no PMF, bem como a informação relativa à seqüência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), são usados pelo *software* de busca para “localizar” as proteínas nos bancos de dados. Os programas mais conhecidos e comumente mais empregados são o *Sequest* (Eng et al., 1994) e o *Mascot* (Perkins et al., 1999).

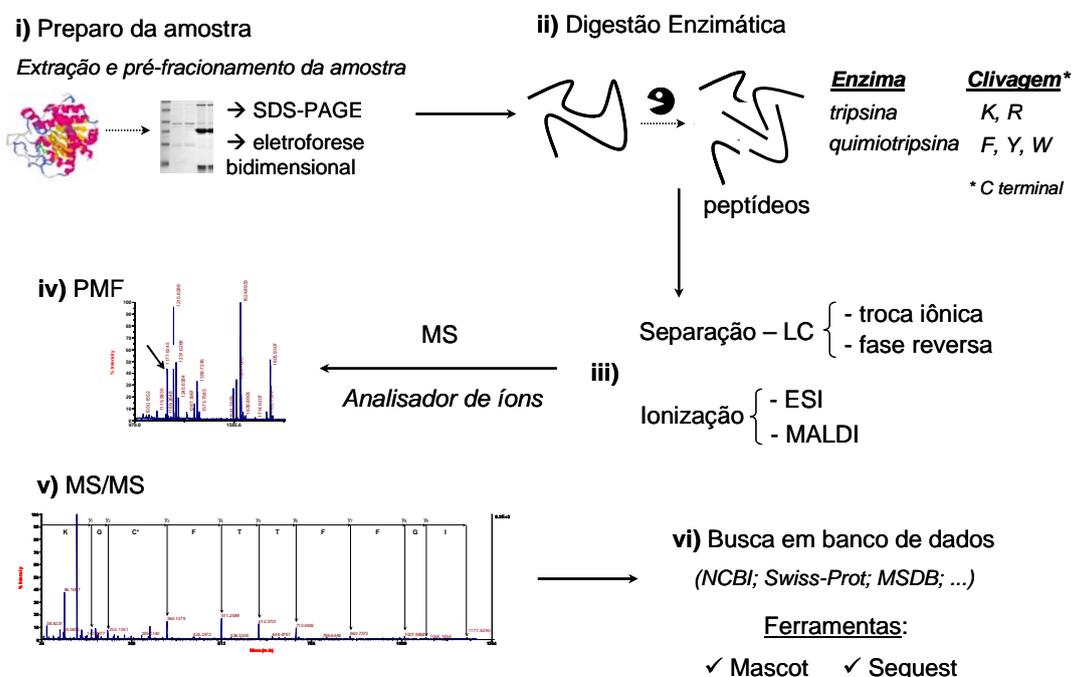


Figura 2. Esquema ilustrativo das seis etapas que comumente integram um estudo proteômico com o emprego de espectrometria de massa (MS). SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio; LC:

cromatografia líquida; ESI: *electrospray*; MALDI: *matrix-assisted laser desorption and ionization*; PMF: *peptide mass fingerprint*.

A separação das proteínas por meio da técnica de eletroforese bidimensional e a subsequente identificação por MS trata-se da estratégia mais empregada em análise proteômica (Suckau et al., 2003). A união dessas tecnologias mostra-se ainda mais interessante quando se pretende realizar análises comparativas entre amostras em diferentes condições. Isso inclui, por exemplo, a comparação entre amostras de pessoas saudáveis e amostras de pessoas doentes, quando se objetiva encontrar proteínas diferentemente expressas, as quais podem servir de biomarcadores. Além da informação qualitativa, a eletroforese bidimensional é capaz de prover resultados quantitativos, o que possibilita o monitoramento dos níveis de expressão das espécies de interesse. Nesse quesito, a tecnologia denominada *differential gel electrophoresis* (DIGE) constitui o estado da arte.

Apesar dos recentes e dos promissores avanços em tecnologias alternativas e complementares (principalmente a cromatografia capilar multidimensional), a eletroforese bidimensional é atualmente a única técnica que pode ser rotineiramente aplicada para a separação de misturas verdadeiramente complexas de proteínas, tais como lisados celulares.

Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-E) é uma técnica de separação largamente usada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, de tecidos ou de outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos. A segunda dimensão, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE), separa as proteínas de acordo com sua massa molecular relativa (Figura 3; Görg et al., 2004). Uma vez realizada a separação eletroforética bidimensional, é necessário fazer a coloração do gel, a fim de visualizar o resultado obtido. A seleção do procedimento de visualização apropriado é tão importante quanto a técnica de análise de proteínas empregada. Sensibilidade, simplicidade, velocidade e integração do procedimento com etapas futuras (por exemplo, análise

subseqüente de um *spot* por MS) são critérios importantes para a escolha do método de coloração. Os métodos mais comumente empregados são a coloração com prata e com corantes orgânicos, tais como o azul-de-comassie (*Comassie blue*; Candiano et al., 2004).

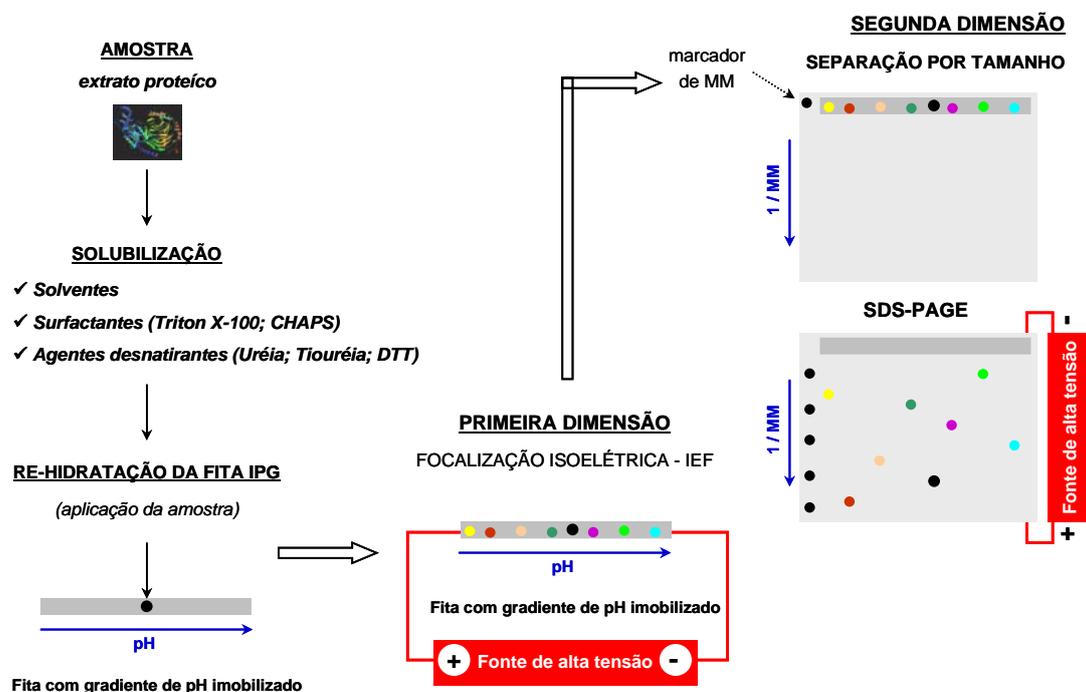


Figura 3. Esquema que mostra as etapas envolvidas no processo de separação de uma mistura de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, a separação ocorre de acordo com o ponto isoelétrico, enquanto a massa molecular (MM) relativa das proteínas é a propriedade usada para a separação na segunda dimensão. DTT: ditioneitol; SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio.

Espectrometria de massa (MS)

A MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa. De maneira geral, um espectrômetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massa, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização, as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massa, os íons formados são separados de acordo com sua relação m/z e posteriormente detectados (usualmente por elétron-multiplicadoras).

Até a década de 1980, a necessidade de ionizar as moléculas para obter um espectro de massa era um grande obstáculo enfrentado no caso de moléculas

biológicas de alta massa molecular. Nos métodos de ionização disponíveis na época, as moléculas a serem ionizadas deveriam estar em fase gasosa, sob alto vácuo e a alta temperatura, condições incompatíveis com biomoléculas. Esse problema foi resolvido com o surgimento de técnicas brandas de ionização, *electrospray* (ESI) (Fenn et al., 1989) e *matrix-assisted laser desorption and ionization* (MALDI) (Karas & Hillenkamp, 1988), estabelecidas no final daquela década. Outro avanço tecnológico relevante que contribuiu para o desenvolvimento da MS foi a conjugação de analisadores de massa em seqüência (MS/MS). Tal arranjo aumentou muito o poder de resolução e a sensibilidade da técnica, tornando-a praticamente obrigatória nas análises de moléculas biológicas. Com esta técnica é possível fragmentar uma molécula ionizada por meio da colisão com um gás inerte (argônio, hélio, nitrogênio). A análise da massa dos fragmentos obtidos fornece informações sobre a estrutura da molécula original e isso permite determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou a alteração de algum resíduo de aminoácido (Steen & Mann, 2004).

Software de busca de proteínas em bancos de dados: sistemática de busca

Os programas de busca mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados com base em dados de MS são o *Sequest* (Eng et al., 1994) e o *Mascot* (www.matrixscience.com; Perkins et al., 1999). Ambos os programas correlacionam espectros de massa de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com seqüências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (Chamrad et al., 2004). Além disso, esse *software* também tem a capacidade de usar seqüências de nucleotídeos para fazer tal correlação. Para isso, esses programas primeiramente simulam as seqüências primárias das proteínas correspondentes àquelas seqüências de nucleotídeos encontradas nos bancos de genes, utilizando-se do código genético universal; posteriormente, eles simulam a fragmentação destas seqüências primárias. De forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar, em determinado banco de dados, a seqüência de aminoácidos que melhor descreve os íons – fragmentos encontrados em um espectro. As seqüências-candidatas são procuradas nos bancos de dados de acordo com a massa molecular do peptídeo (informação adquirida na etapa do PMF) e com o espectro de fragmentação (MS/MS) obtido para cada peptídeo.

No *Sequest*, uma técnica de processamento do sinal chamada autocorrelação é usada a fim de determinar matematicamente a sobreposição entre o espectro teórico, derivado de cada seqüência obtida no banco de dados em questão, e o espectro obtido experimentalmente. O resultado de tal sobreposição é expressa quantitativamente em termos de um escore para cada peptídeo (X_{corr}). O X_{corr} é um parâmetro que depende de diversos fatores, tais como estado de carga do peptídeo e tamanho do banco de dados que está sendo usado para a busca. Assim, a avaliação de um segundo escore, classificado como ΔC_n , faz-se necessária para que a confiabilidade do resultado obtido seja aumentada. Esse parâmetro é definido pela diferença entre os valores de X_{corr} obtidos da seqüência de aminoácidos que alcançou o maior X_{corr} e a seqüência subsequente. Na literatura, diferentes critérios são usados para classificar uma determinação como satisfatória ou não. De forma geral, estes valores são: $X_{\text{corr}} > 3,75$ para peptídeos com carga +3, $X_{\text{corr}} > 2,2$ para peptídeos com carga +2 e $X_{\text{corr}} > 1,9$ para peptídeos com carga +1. Em todos os casos descritos, $\Delta C_n > 0,10$ é exigido para que a determinação seja considerada suficientemente confiável (Washburn et al., 2001; Sadygov et al., 2004).

O *Mascot* também envolve o cálculo de fragmentos teoricamente preditos para todos os peptídeos de um banco de dados de acordo com a massa do íon precursor, previamente determinada. Os valores de m/z dos fragmentos preditos são comparados com os valores obtidos experimentalmente. A probabilidade de que o valor de m/z de um fragmento teoricamente obtido coincida, de maneira randômica, com o valor de m/z de um fragmento obtido experimentalmente é calculado e expresso pelo negativo do logaritmo desse número (escore). Assim, quanto maior for o valor obtido, menor será a probabilidade de que este resultado seja fruto de uma “coincidência”. Esse programa fornece para cada busca submetida um valor-limite (dependendo das condições usadas para a busca) a partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico (Perkins et al., 1999).

A Figura 4 mostra um esquema detalhado da sistemática de busca empregada pelos principais programas de busca de identificação de proteínas em bancos de dados (*Mascot* e *Sequest*).

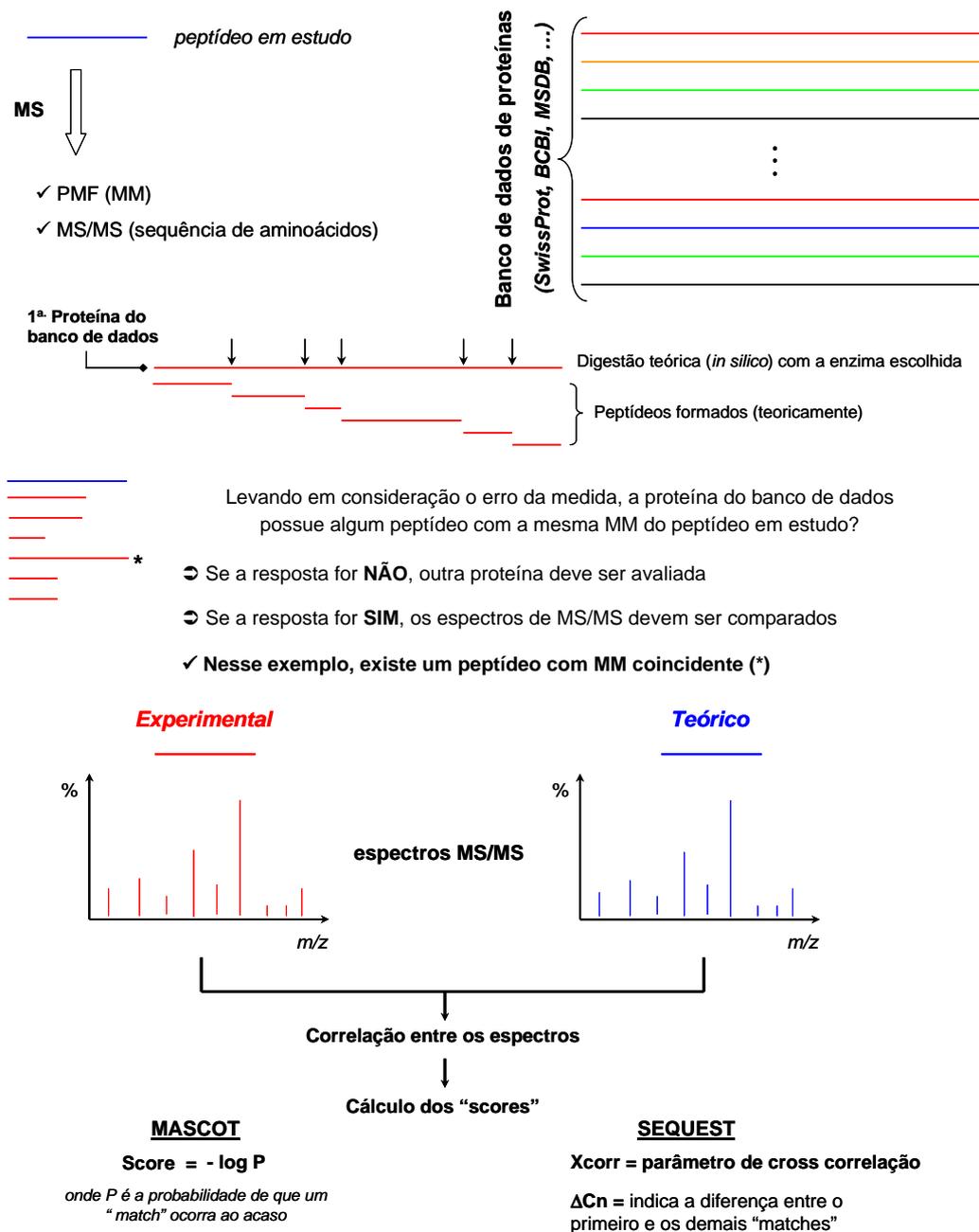


Figura 4. Esquema ilustrativo da sistemática de busca de identificação de proteínas em bancos de dados empregada pelos programas de busca *Mascot* e *Sequest*. MS: espectrometria de massa; PMF: *peptide mass fingerprint*, MM: massa molecular; m/z: relação entre a massa e a carga.

Uma vez compreendida a sistemática aplicada pelo *software* para a identificação de proteínas em bancos de dados com resultados de espectrometria de massa, faz-se necessário e é de suma importância o completo entendimento de como ocorre a fragmentação dos peptídeos. Além disso, a interpretação manual de espectros de MS/MS é recomendada em todos os casos e indispensável em

algumas situações. Por exemplo, quando o genoma de determinada espécie ainda não está completamente seqüenciado ou disponível, é necessário derivar a seqüência primária de aminoácidos de determinado peptídeo baseado somente nos dados obtidos por espectrometria de massa, isto é, sem recorrer a banco de dados (seqüenciamento *de novo*; Steen & Mann, 2004).

Referências bibliográficas

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

BOGDANOV, B.; SMITH, R. D. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 2, p. 168- 200, 2004.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p.1327-1333, 2004.

CHAMRAD, D. C.; KORTING, G.; STUHLER, K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 619-628, 2004.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KELLEHER, N. L.; LIN, H. Y.; VALASKOVIC, G. A.; AASERUD, D. J. FRIDRIKSSON, E. K.; MCLAFFERTY, F. W. Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 4, p. 806-812, 1999.

McLAFFERTY, F. W. Tandem mass spectrometric analysis of complex biological mixtures. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 212, n. 1, p. 81-87, 2001.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 252-262, 2005.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 2004.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 952-965, 2003.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-197, 2003.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES III, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2001.

WILM, M.; NEUBAUER, G., MANN, M. Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 527-533, 1996.

TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PARASITAS UTILIZADAS NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PARASITA–HOSPEDEIRO

Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Departamento de Parasitologia, UNESP–Botucatu, SP, Brasil.

Introdução

Os organismos que parasitam os homens e os animais, sejam eles procariotas ou eucariotas, endoparasitas ou ectoparasitas, induzem em seus hospedeiros o desenvolvimento de mecanismos que atuarão de modo a promover a eliminação do parasita e/ou de seus produtos tóxicos. Em resposta aos mecanismos criados pelo hospedeiro, os parasitas se valem de estratégias que possibilitarão a invasão, o crescimento, a reprodução e a sobrevivência em um ambiente adverso. Há muitos séculos, essa relação de extrema complexidade entre os parasitas e os seus hospedeiros tem atraído a atenção de parasitologistas, de bioquímicos, de imunologistas e de biólogos moleculares e, com isso, determinado a diversificação das linhas de pesquisa em diferentes áreas da Biologia. Apesar do número crescente de pesquisas importantes sobre as doenças parasitárias, os mecanismos envolvidos nas interações parasita–hospedeiro ainda necessitam ser melhor elucidados.

Recentemente, estudos de bioquímica e de biologia molecular têm possibilitado a identificação de moléculas específicas, tais como as proteínas que participam do ciclo evolutivo dos parasitas ou da patogênese de doenças causadas por esses organismos. O conhecimento da composição e da natureza dessas proteínas tem propiciado avanços significativos no estudo de aspectos associados à biologia, à bioquímica e às características antigênicas e moleculares, que podem estar, diretamente, envolvidos na relação parasita–hospedeiro. Tudo isso tem assegurado aos pesquisadores maior percepção sobre as novas alternativas para o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos e para o descobrimento de novos alvos para as substâncias antiparasitárias.

Dentre as proteínas que têm despertado grande interesse, incluem-se aquelas que apresentam atividade catalítica, mais especificamente, as proteases,

que são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações entre os peptídeos de uma proteína (Bond & Butler, 1987). As proteases, também denominadas enzimas proteolíticas, encontram-se amplamente distribuídas na natureza e podem ser identificadas em diferentes sistemas biológicos, desde vírus até vertebrados.

As enzimas proteolíticas constituem uma grande família e geralmente são classificadas com base em dois critérios principais: (1) o tipo de reação catalisada e (2) a natureza química do sítio catalítico. Grosso modo, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia, as proteases podem ser subdivididas em endopeptidases e em exopeptidases. Dessa forma, as endopeptidases ou proteinases são proteases que clivam preferencialmente as ligações peptídicas localizadas internamente na cadeia de aminoácidos, enquanto as exopeptidases atuam somente nas ligações próximas às extremidades das cadeias polipeptídicas nas regiões terminais N ou C. Além disso, com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as endopeptidases podem ainda ser classificadas em quatro grupos principais: serinoproteases, cisteinoproteases ou tiolproteases, metaloproteases e aspartilproteases (McKerrow et al., 1993).

A identificação e a caracterização das proteases dos parasitas abrangem grande volume de investigações, especialmente, no que diz respeito às proteases ligadas à membrana de superfície e àquelas que são excretadas e/ou secretadas. Nesses organismos, as proteases podem desempenhar papel importante em diversos processos, tais como (1) invasão dos tecidos do hospedeiro, (2) digestão de proteínas específicas do hospedeiro importantes para o metabolismo do parasita, (3) imunoevasão e modulação da resposta imunológica do hospedeiro, (4) virulência e patogenicidade, e (5) multiplicação e diferenciação dos parasitas, seja, por exemplo, no encistamento e no desencistamento dos protozoários ou nos processos de eclosão e de muda dos helmintos e dos artrópodes (McKerrow et al., 1993). Somados a esses aspectos, vale destacar que muitas proteases presentes nos parasitas são imunogênicas e por isso explora-se a possibilidade de seu emprego como marcadores para o diagnóstico imunológico de algumas doenças parasitárias. Além disso, o envolvimento dessas moléculas no ciclo de vida de organismos causadores de doença as tornam-as alvo potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e de vacinas contra algumas infecções (Rao et al., 1998).

Durante os últimos 20 anos, alcançaram-se avanços significativos na elucidação de processos celulares que envolvem a proteólise, principalmente, em relação às infecções parasitárias causadas por protozoários importantes, tais como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Acanthamoeba* spp. e *Giardia* spp. Dentre muitas informações relevantes, destaca-se a identificação de cisteinoproteases como importantes reguladores da morfogênese de *T. cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *E. histolytica*, uma vez que inibidores específicos para essas proteases são capazes de bloquear diferentes etapas do ciclo evolutivo desses organismos. Diante disso, a eficiência desses inibidores sobre a multiplicação parasitária levantam a possibilidade de que essas proteases constituam um alvo em potencial para a produção de drogas e de imunógenos para o controle das infecções causadas por esses parasitas.

No que diz respeito aos helmintos, observações reunidas em diferentes investigações demonstraram, por exemplo, nos nematódeos *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis* e *Haemonchus contortus*, que as proteases participam do processo de invasão dos tecidos dos hospedeiros pelas larvas infectantes (Nisbet & Huntley, 2006). Além disso, vale ressaltar que um dos sistemas de proteólise mais bem caracterizado corresponde à degradação de hemoglobina pelo *Schistosoma mansoni*, a fim de que sejam obtidos aminoácidos necessários ao crescimento e à maturação desse helminto.

Quanto aos artrópodes importantes em saúde pública, os estudos são ainda incipientes para grande parte dos ectoparasitas. Mesmo assim, em alguns casos específicos, investigações sobre proteases produzidas pelo parasita culminaram com o desenvolvimento de imunógenos que podem ser utilizados como vacina para prevenir a infestação de bovinos por carrapatos como *Boophilus microplus* (Leal et al., 2006). Atualmente, estudos com outros artrópodes, como os dípteros, cujas larvas produzem míases no homem e em animais domésticos, demonstraram que o estabelecimento das larvas é facilitado pela produção de enzimas digestivas que são secretadas e/ou excretadas para digerirem proteínas integrais dos tecidos, auxiliando na migração e na nutrição das larvas. A caracterização dos produtos de excreção de larvas de moscas como *Lucilia cuprina*, *Hypoderma lineatum* e *Oestrus*

ovis tem revelado a presença de proteases imunogênicas, dentre as quais se destacam alguns antígenos candidatos a vacinas (Nisbet & Huntley, 2006).

Diante do que foi exposto, está claro que muitas das proteínas presentes em preparações de parasitas apresentam atividade enzimática e, em alguns casos, podem estar envolvidas em mecanismos patogênicos e nos eventos de diferenciação desses organismos. Uma vez que existem vários métodos disponíveis para o estudo de enzimas, faremos breve abordagem sobre os procedimentos mais empregados em pesquisas básicas sobre as proteases de parasitas, especialmente em estudos preliminares para a identificação e a caracterização dessas enzimas.

Obtenção de proteases

Diante da grande variedade de enzimas proteolíticas em diferentes amostras, não há procedimento padrão que assegure que todas as proteínas presentes em determinada preparação estejam aptas para serem empregadas nos ensaios enzimáticos. Assim, para a obtenção de enzimas proteolíticas, valem os mesmos procedimentos empregados para a extração de proteínas nas mais diversas preparações. É essencial considerar que as proteases, como proteínas que são, sofrem mudanças físico-químicas que podem determinar alteração ou completa perda da atividade. Com isso, é importante que os aspectos relativos à natureza e à estabilidade dessas moléculas sejam sempre levados em consideração, a fim de que os procedimentos adotados sejam adequados para a obtenção das proteases.

Os ensaios para a identificação e para a caracterização de enzimas proteolíticas podem ser realizados tanto para se detectar a maioria das enzimas presentes em uma preparação complexa como para confirmar a presença de uma enzima em particular. Normalmente, nos estudos de caracterização das proteases de parasitas, a primeira etapa consiste na análise da atividade enzimática em preparações compostas por proteínas diferentes, que apresentem ampla faixa de atividade biológica. Muitas vezes, quando as investigações requerem maior aprofundamento, torna-se necessário o isolamento de uma enzima específica, o que implica a purificação da molécula. Basicamente, o processo de purificação de uma proteína é composto por diferentes etapas, que têm como objetivo a separação das proteínas, de acordo com algumas características, tais como a seqüência de aminoácidos e o conteúdo de carboidratos e de lipídeos ou a atividade biológica.

Atualmente, dentre os métodos empregados para esse fim, destacam-se as técnicas de cromatografia, a qual consiste na passagem das proteínas por uma coluna, que pode separar as moléculas de proteínas de acordo com o tamanho e com a carga elétrica ou pela capacidade de se ligar a grupos químicos específicos.

A escolha dos substratos

Em seguida à obtenção das proteases, o grande desafio consiste na escolha do substrato para a realização dos ensaios enzimáticos. Uma vez que a especificidade pelo substrato é uma das mais importantes características das enzimas, muitas vezes essa etapa representa um problema, pois a utilização de um substrato inadequado pode interferir na eficiência dos ensaios realizados.

Na grande maioria dos estudos, as enzimas de interesse estão presentes em extratos complexos, cuja composição não é bem conhecida. Nesse caso, a escolha de substratos naturais parece ser mais conveniente, pois, como são proteínas que apresentam várias ligações peptídicas, possibilitam o reconhecimento de grande diversidade de proteases (Beynon & Bond, 1989). Dentre os substratos protéicos mais amplamente empregados, incluem-se proteínas de baixo custo e comercialmente disponíveis, tais como gelatina, caseína, albumina bovina e hemoglobina. Convém ressaltar que, mesmo que a gelatina e a caseína não sejam substratos naturais para muitas proteases, essas proteínas têm sido amplamente utilizadas para a caracterização de processos que envolvam a participação das enzimas proteolíticas, inclusive nos organismos parasitas. A maioria dos substratos protéicos tem sido empregada em ensaios que, normalmente, não requerem alto grau de especificidade. Entretanto, caso isso seja condição imprescindível, substratos protéicos específicos para certos processos de hidrólise podem ser empregados, a saber, o colágeno como a proteína de escolha para os ensaios com colagenases e as imunoglobulinas humanas para a detecção de proteases de parasitas capazes de degradar essas proteínas.

Nas investigações em que as enzimas de interesse são proteases bem caracterizadas ou em que correspondem a moléculas purificadas, torna-se mais adequado o emprego de substratos sintéticos, que permitem a detecção específica das enzimas. Esses substratos podem ser empregados em vários ensaios enzimáticos, principalmente quando se pretende investigar a especificidade de

determinada enzima proteolítica pelo substrato, monitorar a atividade enzimática ao longo dos procedimentos de purificação das proteases ou medir a atividade residual na análise da cinética de uma reação entre uma protease e um inibidor (Michaud, 1998). Quanto à estrutura, os substratos sintéticos correspondem a uma seqüência peptídica reduzida, em que o grupo acila está conjugado a um grupo cromogênico ou fluorogênico. Com isso, nos procedimentos que empregam esses substratos, é possível quantificar a atividade hidrolítica das enzimas por meio de análises espectrofotométricas. Além disso, como a maioria desses substratos apresenta seqüências peptídicas específicas, as proteases podem ser caracterizadas quanto à classe a que pertencem, ou seja, serinoproteases, cisteinoproteases, metaloproteases e aspartilproteases.

Cabe salientar que, na maioria das pesquisas, os ensaios que empregam substratos protéicos ainda são os primeiros métodos eleitos para a caracterização preliminar das preparações. Mais comumente, esses substratos são empregados em ensaios em que a atividade enzimática é determinada *in situ*, após a separação eletroforética das proteases.

Ensaio para a detecção das proteases

Detecção eletroforética das proteases

A busca por informações sobre as proteases em sistemas biológicos inclui avaliar a atividade enzimática nas mais variadas preparações protéicas e caracterizar a composição das moléculas no que se refere à atividade e ao peso molecular. Dentre as técnicas empregadas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS) é considerada uma das técnicas bioquímicas mais adequadas para a análise dessas enzimas.

Segundo Michaud (1998), existem vários procedimentos para a detecção eletroforética de enzimas proteolíticas, os quais podem ser incluídos em dois grupos: aqueles em que as proteases são detectadas *in situ* após a eletroforese e aqueles em que as enzimas são detectadas em um gel que contém o substrato. Mais freqüentemente, a análise da atividade de proteases presentes em preparações de parasitas tem sido demonstrada em géis em que o substrato é a gelatina. Essa técnica descrita, primeiramente, por Heussen & Dowdle (1980) é, com certeza, a mais utilizada. Nesse sistema, a gelatina é copolimerizada ao gel de poliacrilamida

e, após a migração eletroforética na presença de SDS, as proteases desnaturadas podem recuperar a atividade quando o SDS é removido, após a incubação do gel em solução de Triton[®] X-100. Para detectar a hidrólise da gelatina, o gel é incubado em tampão apropriado, em condições ótimas de temperatura e de pH. Finalmente, a visualização das proteases capazes de degradar a gelatina é feita após coloração do gel com corantes, tais como o azul-de-coomassie (*Coomassie blue*) ou preto de amido (*amido black*). A proteólise do substrato pode ser visualizada na forma de bandas ou de zonas claras contra um fundo escuro, e o conjunto das bandas nos géis é denominado zimograma.

Garcia-Carreño et al. (1993) apontam como vantagens desse método: (1) a habilidade de muitas proteases manterem a atividade após o tratamento com SDS torna esse protocolo útil no estudo de grande variedade de processos, (2) a identificação de proteínas bioativas presentes em amostras complexas, (3) a determinação do peso molecular estimado das moléculas, (4) a migração anódica das proteínas, independentemente do ponto isoelétrico, e (5) a aplicabilidade ao estudo de diversos tipos de proteínas, incluindo as proteínas de membrana. Vale destacar que, além da simplicidade e da sensibilidade, esse procedimento oferece outras vantagens na análise das proteases, incluindo a possibilidade de se detectar a atividade de enzimas presentes em preparações complexas e a obtenção de padrões de proteólise altamente reproduzíveis, o que torna viável a quantificação das bandas de hidrólise.

A despeito das vantagens mencionadas anteriormente, esta técnica apresenta algumas limitações, tais como: (1) certas proteases perdem a atividade após o tratamento com SDS, (2) o sistema está adaptado para a detecção, principalmente, das endoproteases, (3) apesar de a gelatina ser degradada por várias proteínas, muitas vezes não é reconhecida como substrato por algumas das enzimas presentes nas preparações, e (4) a incorporação do substrato ao gel pode reduzir a migração das proteínas no gel. Diante disso, algumas modificações foram feitas no método original, a fim de evitar que essas limitações interfiram nos resultados dos ensaios. Dentre as versões modificadas do método, inclui-se um sistema em que o substrato é incorporado ao gel por difusão após a eletroforese, isto é, durante a etapa de hidrólise. O procedimento padrão para esse tipo de abordagem consiste em fracionar as proteínas de uma preparação em um gel de poliacrilamida, sob

condições nativas ou levemente desnaturantes, e, em seguida, permitir que as proteases reajam com o substrato, colocando o gel em um tampão apropriado que contenha o substrato. Além disso, considerando que as enzimas diferem quanto à especificidade pelo substrato, diferenças entre os padrões de hidrólise podem ser obtidas testando-se diferentes substratos. Com isso, alguns pesquisadores têm empregado, em substituição à gelatina, outros substratos protéicos, tais como caseína, colágeno, soroalbumina bovina, hemoglobina e imunoglobulinas.

Ensaio espectrofotométrico

Conforme o nível de informação desejado para a caracterização das proteases de determinado parasita, muitas vezes torna-se necessário acompanhar o curso da reação enzimática em estudo. Nesses casos, os estudos requerem ensaios que permitam quantificar a degradação dos substratos envolvidos em uma reação enzimática, o que é possível medindo-se a concentração do produto de hidrólise. Para isso, os substratos empregados devem estar associados a um composto cromogênico ou fluorogênico, o que permitirá a quantificação dos produtos de degradação com o auxílio de um espectrofotômetro em ensaios colorimétricos e fluorimétricos, respectivamente. Além dos substratos sintéticos que já apresentam em sua estrutura um grupo cromogênico ou fluorogênico, alguns substratos protéicos, como a caseína e a albumina podem ser empregados em ensaios quantitativos, pois derivados cromogênicos dessas proteínas, isto é, azocaseína e azoalbumina, estão disponíveis no mercado.

Ensaio para o estudo das interações entre proteases e inibidores

Nos mais diversos sistemas biológicos, a atividade das proteases é regulada por substâncias capazes de controlar e/ou inibir a atividade enzimática. Essas substâncias são denominadas inibidores e podem ser encontradas em tecidos vegetais e em tecidos animais, participando da regulação de diferentes processos, tais como a lise de proteínas celulares, a transcrição, o ciclo celular e a imunidade. Até o momento, mais de uma centena de inibidores naturais já foi identificada. Entretanto, com o advento da produção de compostos sintéticos, um volume muito maior de inibidores tem sido sintetizado. Dentre vários inibidores sintéticos, alguns têm sido identificados como compostos específicos para proteases-alvo de muitos

organismos, inclusive de parasitas, e têm sido considerados potenciais agentes antiparasitários.

O estudo bioquímico das proteases não deve se restringir apenas à análise da atividade enzimática sobre os substratos, mas incluir também a caracterização das enzimas quanto aos mecanismos de ação com base na análise do efeito de inibidores. É importante destacar que, atualmente, estão disponíveis comercialmente vários inibidores sintéticos com atividade sobre as exopeptidases e as endopeptidases (serinoproteases, cisteinoproteases, metaloproteases e aspartilproteases). Dentre alguns inibidores sintéticos freqüentemente empregados no estudo das proteases, destacam-se as seguintes substâncias: (1) E-64 e IAA, inibidores conhecidos por apresentar as cisteinoproteases como principal alvo de inibição, (2) PMSF e 3,4-DCI, inibidores para a serinoproteases, (3) TPCK, TLCK, leupeptina e antipaína, apesar de atuarem sobre serinoproteases, podem também inibir as cisteinoproteases, (4) EDTA e fenantrolina, inibidores para metaloproteases e (5) pepstatina e bestatina, que têm efeito sobre aspartases e aminopeptidases, respectivamente.

Com base na habilidade com que muitos inibidores sintéticos, quando diluídos em tampões, penetram nos géis de poliacrilamida, vários ensaios para determinar os mecanismos de ação das proteases têm sido realizados após a separação eletroforética das enzimas em géis copolimerizados com substrato. Nesses ensaios, o efeito dos inibidores sobre a proteólise é demonstrado comparando-se o padrão de hidrólise dos substratos, antes e após a incubação com os inibidores. Dessa forma, esse sistema combina o emprego de inibidores sintéticos e zimogramas.

Diante disso, os ensaios que se baseiam na detecção eletroforética das proteases tornam-se alternativas simples e eficientes para o estudo das proteases, inclusive no que se refere aos processos de inibição enzimática. Dessa forma, permitem desde a simples determinação da classe a que pertencem as proteases até a obtenção do conhecimento sobre interações entre proteases-alvo e seus inibidores específicos.

Além desse sistema, em situações em que as investigações requerem maior aprofundamento, os mecanismos de ação das proteases podem ser determinados em ensaios que associam a análise da atividade das proteases sobre substratos sintéticos e o efeito de inibidores específicos.

Considerações finais

Mesmo para parasitas intensamente investigados, como *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp., o estudo das proteases ainda não respondeu a todas as questões sobre o papel dessas enzimas. No que diz respeito a muitas espécies de protozoários e de helmintos e à grande maioria dos ectoparasitas, os estudos são ainda incipientes. Para esses parasitas, as informações estão sendo reunidas, mas ainda há um longo caminho pela frente, até que se possa decifrar a real participação das proteases na biologia, na fisiologia e na patogenia das infecções parasitárias causadas por esses parasitas.

A detecção de proteólise em diferentes preparações, em especial naquelas em que as enzimas ainda não foram caracterizadas, tem sido feita a partir da realização de ensaios qualitativos em géis copolimerizados com substratos e em ensaios quantitativos nos quais se empregam substratos cromogênicos ou fluorogênicos. Entretanto, para a escolha do procedimento ideal a ser empregado em uma investigação, é importante levar em consideração o objetivo do estudo em questão, as informações sobre as características físico-químicas e biológicas que o pesquisador dispõe sobre o material a ser estudado e o grau de especificidade necessário durante as análises enzimáticas. Da mesma forma, a interpretação dos resultados requer conhecimento básico para se evitar inferências indevidas, tais como relacionadas às observações feitas nas análises *in vitro* das proteases. Nesse caso, muitas vezes a atividade das enzimas sobre substratos protéicos (colágeno, imunoglobulinas, hemoglobina, albumina bovina, entre outros) pode conduzir à idéia de que a clivagem desses substratos ocorre *in vivo* e de que seja fator importante na relação parasita-hospedeiro. Sem, contudo, descartar a idéia de que este fato seja uma possibilidade, é pertinente que estudos mais aprofundados sejam realizados, a fim de que tais funções possam, realmente, ser atribuídas às enzimas dos parasitas em estudo.

Referências bibliográficas

BOND, J. S.; BUTTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 333-364, 1987.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989. 278 p.

GARCIA-CARREÑO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, N. F. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 1, p. 65-69, 1993.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 102, n. 1, p.196-202, 1980.

LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; SILVA VAZ Jr, I. da; MASSUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus yolk* pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 114, n. 3-4, p. 341-345, 2006.

McKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review Microbiology**, v. 47, p. 821-853, 1993.

MICHAUD, D. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. **Analytical Chemistry Acta**, v. 372, n. 1, p.173-185, 1998.

NISBET, A. J.; HUNTLEY, J. F. Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, p.165-172, 2006.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiological Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EM ESTUDOS DE DOENÇAS DE INTERESSE VETERINÁRIO

Márcia Cristina de Sena Oliveira

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.

Introdução

Nos últimos cem anos, os estudos relacionados a doenças tiveram como base a análise de características fenotípicas de parasitas, de bactérias e de vírus: características morfológicas, produção de metabólitos e reações bioquímicas específicas. Apesar de muitas dessas técnicas permanecerem como padrão “ouro”, as técnicas moleculares assumiram grande importância e proporcionaram avanço significativo nos estudos das enfermidades dos animais. Essas técnicas possibilitam a análise de quantidades muito pequenas de DNA e de RNA, para fins diversos, tais como seqüenciamento de genes, caracterização genética de cepas, estudos de filogenia e de taxonomia, genética de populações, ecologia, epidemiologia, desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, descoberta de mecanismos de resistência a drogas, mecanismos de escape ao sistema imunológico do hospedeiro, novos alvos para quimioterapia, e produção e desenvolvimento de vacinas. O conhecimento e a disponibilidade das seqüências dos genes de muitos agentes de doenças torna possível a execução de muitos trabalhos de pesquisa. Dentre as técnicas moleculares, aquelas baseadas na amplificação enzimática do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) são as que mais impacto produziram nos estudos de doenças.

Genoma de parasitas

O seqüenciamento dos genes de vários organismos possibilita a utilização dessas informações em muitos trabalhos de pesquisa. Na última década, foram criados diversos programas de seqüenciamento e de mapeamento de genes (determinação da localização dos genes nos cromossomos) dos mais diversos organismos. O seqüenciamento do genoma do *Caenorhabditis elegans*, primeiro organismo multicelular a ter seu genoma seqüenciado, possibilitou o

desenvolvimento de trabalhos com muitos outros helmintos. Para se ter uma idéia da abrangência desses trabalhos de seqüenciamento, os resultados obtidos no “projeto *Schistosoma*” forneceu informações que foram utilizadas no estudo de parasitas de interesse veterinário, como *Fasciola hepatica*. Outros projetos de avaliação de genoma, também direcionados para doenças humanas, tiveram ampla aplicação em pesquisas de parasitas de animais, como os projetos *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Brugia malayi*.

A maioria dos organismos que provoca doença apresenta genoma de tamanho considerável, fato que dificulta e que onera os trabalhos de seqüenciamento. Atualmente, apenas uma fração do genoma (cerca de 5% a 10%) dos parasitas é seqüenciada. A fração escolhida para ser seqüenciada é aquela que contém os genes que codificam a síntese das proteínas produzidas pelo organismo. O DNA complementar (cDNA) é aquele DNA produzido a partir de RNA mensageiro (mRNA), que é utilizado como molde. A enzima transcriptase reversa catalisa a reação de síntese de uma fita de DNA, com base no mRNA, procedimento conhecido como transcrição reversa. Este método é muito útil, pois se sabe que todo DNA gerado corresponde quase totalmente à seqüência do gene, sem conter os íntrons (partes não transcritas do gene). O seqüenciamento é feito com base nas bibliotecas de cDNA, que são coleções de genes inseridas em vetores artificiais. Os fragmentos seqüenciados são denominados “etiquetas de seqüências expressas” (EST) e podem ser usados para verificação de similaridades e para identificação de novos genes nos bancos de dados. Atualmente, milhares dessas seqüências estão disponíveis nos bancos de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html). Devido à grande quantidade de ESTs geradas, foram criados vários programas computacionais que ajudam a gerenciar e a manipular de forma mais adequada esses dados, como é o caso do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e do Phred.

Vários patógenos de interesse humano ou veterinário já foram ou estão sendo seqüenciados. Dentre as bactérias, podemos destacar: *Rickettsia prowazekii*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdoferi*, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Dentre os parasitas, temos: *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp.,

Toxoplasma gondii, *Entamoeba histolytica* e *Strongyloides stercoralis*. O *Caenorhabditis elegans* é o parasita atualmente mais bem estudado e esse fato é atribuído ao total seqüenciamento de seu genoma.

A técnica de PCR

A técnica de amplificação de DNA (Mullis & Faloona, 1987), denominada reação em cadeia da polimerase, possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada, produzindo milhares de cópias de determinado fragmento de DNA. Os elementos envolvidos nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre no interior das células e são os seguintes:

- Amostra de DNA que contém a seqüência que será amplificada.
- Mistura com os nucleotídeos (A,T,C e G).
- Enzima DNA-polimerase (Taq DNA-polimerase).
- *Primers* ou iniciadores (pequenas seqüências de DNA que são complementares à região alvo que se deseja amplificar).

Para que a reação ocorra, a mistura com todos os componentes citados (em concentrações adequadas) é preparada e colocada em pequenos tubos ou placas. Essas amostras são então incubadas em aparelho chamado termociclador, que é programado para direcionar as três etapas da reação, por meio da mudança de temperatura:

- 1) A primeira etapa é a **desnaturação do DNA**, em que ocorre a separação das fitas devido ao aumento da temperatura (94 – 95°C).
- 2) A segunda etapa é o **anelamento dos primers**, que ocorre quando a temperatura é reduzida para 55 – 65°C (a temperatura de anelamento é diferente para cada *primer*). Os iniciadores ligam-se, um em cada fita, nas respectivas seqüências complementares à região-alvo da amplificação.
- 3) A terceira e última etapa é a **extensão**, que ocorre quando a temperatura é aumentada para 72°C. Nessa temperatura, a DNA-polimerase promove a duplicação das fitas de DNA.

Após cada ciclo, todo o processo é repetido desde a desnaturação até a extensão, por várias vezes (40 vezes, em média). A sucessão desses ciclos produz

o acúmulo de quantidade razoável da seqüência alvo de amplificação, que são denominados produtos de amplificação ou *amplicons*.

Visualização dos produtos de PCR

O DNA ou o RNA podem ser facilmente separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose, e corados com brometo de etídio. O brometo de etídio é um corante que se intercala entre as fitas da dupla hélice de DNA ou de segmentos dentro de uma molécula de RNA (que é de fita simples). As bandas de DNA ou de RNA são visualizadas colocando-se os géis no transiluminador. Esse aparelho é equipado com lâmpadas que emitem luz ultravioleta (254 nm); o brometo de etídeo emite fluorescência, tornando visível os ácidos nucléicos em estudo. A olho nu, essa técnica de leitura permite a visualização de 1 a 10 ng de DNA ou de RNA.

Devido à propriedade de se intercalar entre as fitas da dupla hélice, o brometo de etídeo é um agente mutagênico potencialmente perigoso para a saúde das pessoas e para o ambiente. Dessa maneira, cuidados especiais devem ser tomados no seu manuseio e na eliminação dos seus resíduos do laboratório.

Preparo de amostras para PCR

O DNA em forma de dupla fita é muito estável e resistente a condições adversas, no entanto, ele é fisicamente frágil. O isolamento e a purificação de ácidos nucléicos de amostras de agentes de doenças é uma etapa muito importante para se conseguir alta eficiência de amplificação e de especificidade nos testes de PCR. A obtenção de DNA de amostras de helmintos é particularmente difícil, devido à presença de cutícula e de substâncias que precipitam com os ácidos nucléicos durante o seu isolamento. A quantidade de 0,1 pg de rDNA de *Oesophagostomun* spp. é uma quantidade adequada para ser utilizada em amplificação por meio de PCR (Gasser et al., 1998).

Existem vários métodos para extração de ácidos nucléicos que podem ser usados para parasitas, no entanto, devido à pequena quantidade de DNA presente nesses organismos, é importante que o processo seja adequadamente padronizado.

Para extração de DNA, amostras com o agente são homogeneizadas em tampão que contenha ribonucleases, então, as células são submetidas à lise e a amostra é digerida com proteinase K. A partir daí, o DNA pode ser extraído com

fenol, precipitado com etanol e dissolvido em água purificada esterilizada ou tampão aquoso.

A extração de RNA exige maiores cuidados, devido a sua característica de ser facilmente degradável. Dessa maneira, o congelamento em nitrogênio líquido é usado para inativar rapidamente as ribonucleases, que geralmente se mantêm estáveis por longo período, não requerendo co-fatores para sua ativação. Todo o material utilizado na colheita das amostras deve ser livre dessas enzimas, de modo que a utilização de luvas deve ser obrigatória. Enquanto o material está congelado, um agente desnaturante como fenol ou guanidina pode ser adicionado e, dessa maneira, após a lise das células e a digestão das proteínas, o RNA pode ser fracionado e separado de outras macromoléculas.

As amostras de DNA ou de RNA também podem ser obtidas por meio da utilização de *kits* para purificação, que podem tornar o processo de extração mais fácil e mais rápido.

Primers

Algumas técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de *primers* ou seqüências iniciadoras para PCR. A seqüência do gene 18S rDNA é comumente utilizada para o desenvolvimento de *primers*, devido à sua disponibilidade para grande número de protozoários e de outros parasitas (Morgan & Thompson, 1999). Os *primers* podem ser facilmente obtidos com base nessas seqüências, porém, devido à grande conservação observada nesses genes, pode haver ocorrência de reações cruzadas com outros organismos. Um método alternativo é a construção de bibliotecas de DNA genômico. Esse método é caro, demanda tempo e necessita de grande quantidade de DNA, que pode ser difícil de se obter, dependendo do microrganismo em questão. A técnica de amplificação de DNA polimórfico ao acaso (RAPD-PCR), desenvolvida independentemente por Williams et al. (1990) e por Welsh & McClelland (1990), também pode ser utilizada para obtenção de *primers*. Essa técnica detecta polimorfismos em seqüências de nucleotídeos nos testes de PCR, sem a necessidade de qualquer informação prévia. Como essa técnica é baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise. Muitos dos produtos gerados pela RAPD-PCR são derivados de seqüências repetitivas do DNA, portanto são característicos de cada espécie e dessa maneira

adequados para o delineamento de técnicas de diagnóstico. Assim, bandas geradas por RAPD-PCR podem ser eluídas do gel, seqüenciadas e com base nessas seqüências os *primers* podem ser desenhados e sintetizados (Morgan & Thompson, 1999). Importante característica dos *primers* é a temperatura de “*melting*” [TM = (número de G + C) x 4 + (número de A + T) x 2]. Essa é a temperatura na qual metade dos *primers* está ligada à região-alvo de amplificação e que é utilizada para determinar a melhor temperatura para anelamento dos *primers*. Atualmente, existem várias facilidades para análise completa das seqüências utilizadas, como é o caso do programa Generunner e os termocicladores equipados com a função Gradiente.

Identificação e diagnóstico por meio da PCR e da *Nested-PCR* (N-PCR)

No estudo das doenças, as técnicas de diagnóstico apresentam dois parâmetros de grande importância: a sensibilidade e a especificidade. Tais atributos são importantes porque o exame de diagnóstico ideal é aquele que, quando positivo, indica com certeza a presença da doença e que, quando negativo, a ausência. Pode-se dizer, que a sensibilidade de um teste é a sua capacidade de reconhecer os realmente positivos e a especificidade, os realmente negativos (Menezes & Santos, 1999). Esses parâmetros devem ser estabelecidos para cada reação em cadeia que se padroniza, utilizando-se sempre padrões positivos e padrões negativos. Os ensaios de N-PCR são preparados com uma segunda reação em cadeia com base nos produtos de amplificação da primeira reação. Os *primers* utilizados na N-PCR delimitam a seqüência de bases presente no primeiro *amplicon* e por isso o fragmento gerado é sempre menor do que o produto da primeira reação. A N-PCR é capaz de aumentar a sensibilidade da PCR em cerca de 100 vezes, fato altamente desejável, por exemplo, na detecção de indivíduos portadores sadios. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e a possibilidade de análise de grande número de amostras simultaneamente fazem dessas técnicas uma opção atrativa para diagnóstico e utilização em estudos de epidemiologia molecular (Morgan & Thompson, 1999). Desse modo, essas técnicas foram empregadas com sucesso em diversos estudos, tais como detecção em fezes (Leng et al., 1996), diagnóstico específico de *Plasmodium* spp. (Ayyanathan & Datta, 1996), estudos epidemiológicos sobre a malária (Roper et al., 1996), diagnóstico de *Tritrichomonas foetus* (Ho et al., 1994), diferenciação de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

(Lally et al., 1996), detecção de *Trypanosoma* spp. em hospedeiro vertebrado (Katakura et al., 1997) e prevalência de *Trypanosoma* spp. em hospedeiros invertebrados (Masiga et al., 1996).

Testes baseados em PCR, desenvolvidos para a detecção de *Babesia* spp., têm demonstrado sensibilidade de 100 a 1.000 vezes maior do que o limiar de detecção em microscopia óptica (Böse et al., 1995). Com isso, oligonucleotídeos estão disponíveis para a detecção de diferentes espécies, tais como *Babesia gibsoni* (Fukumoto et al., 2001) e *Babesia equi* e *Babesia caballi* (Battsetseg et al., 2001, 2002) e são utilizados para pesquisa de protozoários tanto em hospedeiros vertebrados como em invertebrados.

Figuroa et al. (1992) desenvolveram método de diagnóstico da babesiose bovina (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) que foi utilizado em muitos estudos conduzidos em várias partes do mundo: Hermans et al. (1994), na Costa Rica; Smeenk et al. (2000), no Zimbábue; e Almeria et al. (2001), na Espanha. No Brasil, Oliveira et al. (2005) utilizaram esses *primers* para desenvolver um teste de N-PCR para o diagnóstico de *Babesia bovis* e de *Babesia bigemina* em amostras de sangue de bovinos, e em fêmeas adultas e em ovos de *Boophilus microplus*. A sensibilidade estimada da PCR para *Babesia bigemina* foi de 6×10^3 eritrócitos parasitados em 18×10^6 eritrócitos, o que corresponde à parasitemia de 0,00003%. Nos testes de N-PCR, a sensibilidade estimada foi de 0,000003%.

PCR multiplex

Essa forma de PCR envolve a amplificação simultânea de mais de uma seqüência-alvo por reação, mediante a mistura de múltiplos pares de *primers*. Essa técnica é especialmente útil para análise de amostras que contenham parasitas cuja distinção morfológica seja difícil ou que se apresentem em número muito baixo. Desse modo, *primers* altamente específicos são usados para amplificar seqüências conhecidas do DNA, produzindo padrões únicos para cada espécie. Esses testes são muito úteis em estudos de triagem. Vários trabalhos foram conduzidos com essa técnica, para diferenciar parasitas: *Taenia saginata* de *Taenia asiatica* (Zarlenga et al., 1991), espécies do gênero *Trichinella* (Zarlenga et al., 1999), espécies do gênero *Leishmania* (Belli et al., 1998). Figuroa et al. (1993) desenvolveram uma PCR *multiplex* para detecção simultânea de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em sangue bovino. A sensibilidade do teste, avaliada por meio da hibridização do

ácido nucléico, foi de 0,00001% de eritrócitos infectados com *B. bovis* e *B. bigemina* e de 0,0001% com *Anaplasma marginale*. Na prática, a PCR *multiplex* tem o inconveniente de apresentar menor sensibilidade, quando comparada à execução das reações separadamente.

PCR–RAPD

A análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso é um método de *fingerprinting*, usado para comparar diferenças e similaridades no DNA amplificado em testes de PCR com *primers* selecionados ao acaso ou únicos. Os fragmentos sintetizados são separados e visualizados por eletroforese, de modo que a natureza polimórfica dos produtos amplificados de diferentes amostras pode ser comparada (Prichard, 1997). A maior vantagem dessa técnica é ser facilmente executável, no entanto, ela apresenta o inconveniente de ser influenciada por muitos fatores, tais como qualidade do DNA, especificidade dos *primers*, concentração do DNA-alvo da amplificação o que pode resultar em baixa reprodutibilidade da reação (Gasser, 2006).

A análise de RAPD tem sido utilizada em estudos de caracterização de espécies ou de isolados de *Trypanosoma* de ruminantes e de suínos (Dirie et al., 1993; Waimtumbi & Murphy, 1993). Os produtos da PCR–RAPD podem ser também utilizados como marcadores moleculares de populações geográficas de parasitas.

RT-PCR

A técnica de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) envolve a síntese de um transcrito de DNA complementar (cDNA) com base em moléculas de RNA, por meio da utilização da enzima transcriptase reversa. O DNA sintetizado é submetido à amplificação por meio da técnica de PCR, utilizando *primers* específicos que se ligam a moléculas de mRNA do gene de interesse. A utilização do RNA contido na amostra tem como principal vantagem o fato de aumentar a sensibilidade do teste, já que esse ácido nucléico está presente em maior quantidade (cerca de 50%) em uma célula típica, quando comparado ao DNA (Zarlenga et al., 2001).

PCR quantitativo

As técnicas de PCR quantitativo foram desenvolvidas nos anos de 1990 e têm ampla aplicação nos estudos de doenças, principalmente aquelas relacionadas à quantificação da expressão gênica. A análise quantitativa por meio da cinética da PCR é feita pela adição de um corante fluorescente intercalante na reação em cadeia (Gasser, 2006). A amplificação produz quantidades crescentes de DNA de dupla fita, o qual se liga ao corante, resultando em aumento da fluorescência em cada ciclo da PCR. Curvas-padrão são construídas com os dados obtidos da reação, de modo a se obter a quantidade relativa de DNA-alvo na amostra em análise. Essa reação pode ser utilizada para diferenciar produtos de PCR de seqüências variadas, por meio da análise das curvas de dissociação de produtos em estudo, tendo sempre como controle a amplificação de um segmento de um gene conhecido. A principal desvantagem dessa técnica é que os corantes utilizados se ligam a todo o DNA presente na amostra e, desse modo, deve-se obter a fluorescência a temperaturas específicas que desnaturem os produtos inespecíficos, deixando os produtos específicos intactos.

As técnicas padrão para contagem de parasitas são freqüentemente demoradas e difíceis e possuem baixa acurácia, principalmente quando se trata de protozoários. Por isso, as técnicas de PCR quantitativo vêm sendo aplicadas a estudos de parasitologia sobre *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* e *Neospora* (Bell & Ranford-Cartwright, 2002).

Referências bibliográficas

- ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIERREZ, J. F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 249-259, 2001.
- AYYANATHAN, K.; DATTA, S. Identification and characterization of a generic DNA probe capable of detecting plasmodial infections in blood. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 273-278, 1996.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 384-386, 2001.

- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested-polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351-357, 2002.
- BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.
- BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 102-109, 1998.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; de VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.
- DIRIE, M. F.; MURPHY, N. B.; GARDINER, P. R. DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 132-134, 1993.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2576-2582, 1992.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.
- FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SHIGENO, S.; KIMBITA, E.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 977-981, 2001.
- GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 69-89, 2006.
- GASSER, R. B.; ZHU, X. Q.; MONTI, J. R.; DOU, L.; CAI, X.; POZIO, E. PCR-SSCP of rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 1998.
- HERMANS, P., DWINGER, R.H., BUENING, G. M., HERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Review of Biology Tropical**, v. 42, n. 3, p. 623-632, 1994.
- HO, M. S.; CONRAD, P. A.; CONRAD, P. J.; LEFEBVRE, R. B.; PEREZ, E.; BONDURANT, R. H. Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe

and PCR amplification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 98-104, 1994.

KATAKURA, K.; LUBINGA, C.; CHITAMBO, H.; TADA, Y. Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. **Parasitology Research**, v. 83, n. 3, p. 241-245, 1997.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Development a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 169-178, 1996.

LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 643-647, 1996.

MASIGA, D. K.; MCNAMARA, J. J.; GIBSON, W. C. A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1-2, p. 27-33, 1996.

MENEZES, A. M. B.; SANTOS, I. S. Curso de epidemiologia básica para pneumologistas. **Journal of Pneumology**, v. 25, n. 6, p. 321-326, 1999.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, v. 117, n. 7, p. 73-85, 1999.

MULLIS, K.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 255, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO Jr, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 61-67, 2005.

PRICHARD, R. Application of a molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 155-175, 1997.

ROPER, C.; ELHASSAN, I. M.; HVIID, L.; GIHA, H.; RICHARDSON, W.; BABIKER, H.; SATTI, G. M. H.; THEANDER, T. G.; AARNOT, D. E. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 325-331, 1996.

SMEENK, I.; KELLY, P. J.; WRAY, K.; MUSUKA, G.; TREES, A. J.; JONGEJAN, F. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 71, n. 1, p. 21-24, 2000.

WAIMTUMBI, J. N.; MURPHY, N. B. Inter and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 181-185, 1993.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZARLENGA, D. S.; CHUTE, M. B.; MARTIN, A.; KAPEL, C. M. O. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1859-1867, 1999.

ZARLENGA, D.S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZARLENGA, D. S.; McMANUS, D. P.; FAN, P. C.; CROSS, J. H. Characterization and detection of a newly described Asian taeniid using cloned ribosomal DNA fragments and sequence amplification by the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 2, p.174-183, 1991.