

**PROGRAMA GENOMA BRASILEIRO DE BOVINOS  
E SUAS PERSPECTIVAS DE APLICAÇÕES PRÁTICAS**

**Mário Luiz Martínez e Marco Antonio Machado**

Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco,  
Juiz de Fora – MG, 36038-330.

E-mail: martinez@cnpagl.embrapa.br; machado@cnpagl.embrapa.br

## **Introdução**

A habilidade do melhorista em reconhecer aqueles animais que possuem alelos ou combinação de alelos que aumentam a produção é muito limitada. A seleção clássica é baseada no fenótipo do indivíduo e, em muitas situações, o fenótipo não se expressa no indivíduo para características ligadas ao sexo (leite e produção de ovos) ou em características de difícil mensuração (eficiência alimentar, resistência a doenças, adaptação). Em muitas situações, o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo. Isto deriva do fato de que a variação genética em produtividade depende da variação alélica em um grande número de locos e a expressão gênica destes locos é altamente afetada pelos fatores do meio ambiente. Nesta situação, diz-se que a variação da característica ou a variação genética é de natureza quantitativa; e os locos individuais que afetam a expressão da característica são denominados QTL (locos de característica quantitativa) (Geldermann, 1975).

A investigação do genoma bovino permite a geração de mapas genéticos saturados e a identificação de marcadores para características quantitativas. O marcador molecular de DNA é uma técnica que permite detectar diferenças na seqüência do DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento. O ganho genético, para características de difícil mensuração, baixa herdabilidade e limitadas pelo sexo, poderá ser aumentado com a utilização de marcadores moleculares no auxílio à seleção. A identificação individual ao nível molecular irá certamente contribuir para uma melhor utilização dos recursos genéticos. Estas novas ferramentas genômicas, baseadas na tecnologia do DNA, irão possibilitar entender a biologia dos genes envolvidos nas características de interesse.

## **Mapas de Ligação**

O primeiro passo para pesquisa em genoma é o desenvolvimento de um mapa genético de ligação saturado que requer um grande número de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares mais utilizados na área genômica são os microssatélites.

Um mapa genético de ligação é construído pela análise de segregação de uma família, ou seja, a herança dos marcadores genéticos é traçada a partir dos progenitores heterozigotos para a progênie. Por meio da genotipagem dos pais e da progênie de uma família, em relação a um par de marcadores, é possível determinar se eles estão sendo herdados ligados num mesmo cromossomo, ou independentemente, em cromossomos diferentes.

Embora qualquer estrutura de população possa ser usada para mapear marcadores polimórficos, é muito importante que os progenitores sejam os mais heterozigotos possíveis e a progênie em maior número possível. Grandes famílias de

meio-irmãos (como em rebanhos de gado de leite) ou mesmo populações experimentais F2, produzidas com auxílio de múltipla ovulação e transferência de embriões, são comumente utilizadas para a geração de mapas de ligação.

O mapa genético de ligação possui inúmeros marcadores que podem ser utilizados para identificar regiões genômicas envolvidas com características de interesse. O mapa de ligação permite acompanhar a segregação de cada marcador dos progenitores para a progênie. Comparando a segregação dos marcadores com valores de médias obtidas, de cada indivíduo da progênie, para uma característica fenotípica de interesse, é possível encontrar associações entre marcadores e a característica. Desta forma são identificadas regiões no genoma associadas com características fenotípicas de interesse (Lander & Botstein, 1989).

### **Identificação de Locos de Interesse Econômico (ETLs)**

Existem dois procedimentos que são utilizados para detectar associações entre marcadores e características de interesse econômico (ETLs – *Economic Trait Loci*). Um procedimento, denominado varredura com marcadores, baseia-se na genotipagem de todo o genoma com marcadores distribuídos ao longo dos cromossomos e são estabelecidas associações entre alelos específicos do marcador e variação para a característica fenotípica. Outro procedimento, denominado gene candidato (Rothschild & Soller, 1997), baseia-se no estudo da variação fenotípica para uma característica, em relação ao nível de polimorfismo de DNA, na seqüência de genes previamente conhecidos por estarem envolvidos na fisiologia e desenvolvimento da característica.

### **Varredura do genoma**

A varredura do genoma é um método que tem demonstrado ser bastante efetivo na detecção de ETLs. Para detectar associações, é necessário genotipar uma população segregante para a característica a ser mapeada. Em bovinos, para se ter uma boa cobertura de todo o genoma, é aconselhável genotipar a população segregante com cerca de 150 a 200 marcadores, o que representa uma densidade de um marcador para cada 20 cM (Soller e Andersson, 1998). Quanto maior a população utilizada, mais eventos de recombinação meiótica ocorreram, o que acarreta maior poder de resolução do mapeamento para a característica de interesse. Cada animal da população é genotipado e avaliado fenotipicamente para as características de interesse. Os dados fenotípicos e genotípicos são combinados visando detectar marcadores significativos.

### **Genes candidatos**

O procedimento de genes candidatos utiliza informações prévias sobre a função e fisiologia de genes previamente identificados nos mapas de Humanos e Camundongos, visando identificar mutações específicas em genes homólogos no genoma de animais. Uma vantagem desta metodologia, em relação à varredura com marcadores anônimos, é que, uma vez detectado um ETL, não é necessária a execução de mapeamento posicional, que é um processo bastante demorado e trabalhoso (Rothschild & Soller, 1997).

Para detectar associações entre o gene candidato e a característica de interesse, é necessário encontrar formas alternativas do gene, resultantes de mutações de ponto na seqüência do gene. É necessário seqüenciar um grupo de indivíduos de uma população

segregante para encontrar os polimorfismos na seqüência do gene, denominados haplótipos.

### **Seleção Assistida por Marcadores**

Variantes na estrutura do DNA, numa determinada região do genoma, podem ser utilizados como um marcador para alelos de genes que podem possuir efeitos positivos ou negativos para a característica de interesse. A seleção de indivíduos, que possuem alelos favoráveis para os genes controlando as características em questão, baseada na avaliação direta de seu DNA, é denominada de seleção com auxílio de marcador (MAS)

A seleção com auxílio de marcadores (MAS) utiliza-se das informações de regiões específicas dos cromossomos, em que os genes que afetam as características quantitativas (QTL) estão localizados, para identificar indivíduos com combinações favoráveis de QTLs. Existem três fases no desenvolvimento de programas de seleção com auxílio de marcadores. Na fase de detecção, os polimorfismos do DNA são usados com marcadores para detectar QTL que estejam segregando em determinadas populações com frequências alélicas específicas. Um ou mais alelos associados com o QTL são identificados, o efeito do alelo do QTL determinado e a sua posição no genoma é estimada. Na fase de avaliação, os marcadores são testados em populações alvo ou em famílias para determinar se o QTL está segregando nestas populações. Na fase de implementações, os marcadores são utilizados dentro e entre famílias para gerarem um banco de dados de genótipos. Estes dados serão então combinados com as informações fenotípicas e de *pedigree* na avaliação do mérito genético dos indivíduos dentro de uma população.

Marcadores moleculares de DNA possuem várias características que os tornam atraentes para utilização em programas de melhoramento. Logo após o nascimento, os animais de ambos os sexos podem ser genotipados utilizando marcadores codominantes (p.ex. microssatélites). Com a identificação de marcadores ligados a características de interesse econômico, touros jovens podem ser selecionados, logo após o nascimento, com base no genótipo que eles carregam para os marcadores selecionados. Desta maneira, animais com alto potencial genético podem ser mantidos no programa enquanto os com baixo potencial genético podem ser descartados, evitando os custos necessários para a manutenção do animal por vários anos. Com a utilização da seleção assistida por marcadores, é possível combinar alelos para QTLs de duas ou mais raças numa única raça que irá possuir todas as características desejáveis. Mesmo considerando as vantagens que a MAS possibilita, é interessante que a seleção para características fenotípicas possa ser realizada simultaneamente, visando maximizar o ganho genético e evitando a perda de animais de alto mérito genético que possam ter sido eliminados por uma possível associação não-consistente de um marcador com um QTL.

A MAS é bastante interessante para programas de melhoramento que visam características de produção, bem como resistência a doenças. O desenvolvimento da doença compromete a expressão dos caracteres relacionados com produção, portanto a seleção para resistência a doenças vai influenciar na seleção para produção. A seleção para a resistência a doenças pode ser realizada com marcadores moleculares para a resistência, evitando expor o animal a doença e possibilitando uma seleção eficiente para as características de produção (Soller e Andersson, 1998).

Algumas doenças, tais como mielo-encefalopatia degenerativa progressiva (Weaver) e a deficiência adesiva de leucócitos (BLAD), estão bem caracterizadas a nível molecular. Desta forma, animais geneticamente portadores destas deficiências

podem ser detectados por meio de um exame de DNA, e podem ser descartados do rebanho, evitando a dissiminação dessas doenças (Kehrli et al. 1992).

### **Outras Aplicações dos Marcadores Moleculares**

Os marcadores moleculares detectam pequenas variações na seqüência de DNA entre diferentes animais, podendo, então, ser utilizados para determinação inequívoca de paternidade. O manuseio das paletas de sêmen pode provocar erros na identificação dos touros utilizados na inseminação, que podem ser corrigidos com o exame de DNA. Um laudo, atestando com 99,9% de certeza de que determinado animal apresenta uma determinada genealogia, pode ser de grande interesse aos criadores, o que ocasionaria um aumento do valor de mercado desse animal.

Em bovinos de leite, a seleção do sexo é de grande importância pelo fato da fêmea ser a unidade produtiva. Manipulando embriões bovinos, é possível retirar uma célula de um embrião jovem e analisar o conteúdo genético com marcadores microsatélites específicos para o cromossomo Y, determinando se o embrião é macho ou fêmea (Herr *et al.*, 1990).

### **Isolamento de Genes**

O número de marcadores moleculares disponíveis nos mapas de ligação de bovinos aumentou bastante nos últimos anos. Vários ETLs foram identificados, mas somente alguns poucos genes foram isolados (Smith *et al.*, 1997; Rijnkels *et al.*, 1997). Esses genes foram isolados utilizando informações sobre a fisiologia de genes homólogos de Humanos e Camundongos. O grande desafio dos geneticistas é identificar novos genes, visando atender à grande demanda do setor agropecuário. Atualmente, a maneira mais indicada para o isolamento de genes é por meio de clonagem posicional utilizando mapeamento comparativo (Kappes, 1999).

O mapeamento comparativo possibilita o mapeamento fino de ETLs detectados por meio de varreduras de genoma. Os programas do genoma de Humanos e Camundongos vão ajudar no mapeamento de ETLs em bovinos, pois estes mapas possuem um grande número de genes mapeados e existe uma alta homologia entre os genomas de mamíferos. Um grande número de genes que estão sendo mapeados em Humanos e Camundongos são resultantes do mapeamento de ESTs (Expressed Sequence Tags), que são pequenas seqüências do DNA de genes oriundos de bibliotecas de cDNA. Uma vez identificado um ETL no genoma de bovino, são selecionados genes de regiões homólogas nos mapas de Camundongos e Humanos, que são utilizados para identificar clones homólogos no genoma de bovinos. Esses clones são parcialmente seqüenciados e mapeados no genoma de bovino. Se esses genes de bovino mapearem na região previamente identificada pelo ETL, faz-se o seqüenciamento desses genes em vários animais da população segregante, visando encontrar mutações de ponto na seqüência do DNA. A próxima etapa é verificar se a variação na seqüência do gene está associada ao fenótipo de interesse.

Além do mapeamento comparativo, podem ser realizados estudos de expressão visando o isolamento de genes candidatos oriundos das bibliotecas de cDNA. Uma biblioteca de cDNA é produzida a partir do isolamento de mRNA de diversos tecidos de interesse. O cDNA é produzido por meio da transcrição reversa do mRNA isolado em cada tecido. Pela comparação dos inúmeros cDNAs produzidos, nas diversas bibliotecas, é possível identificar genes específicos para cada tecido, e com a utilização da tecnologia de *microarrays*, é possível analisar, simultaneamente, milhares de

sequências de cDNA. Este procedimento está sendo bastante utilizado para isolar genes candidatos para características de importância econômica em bovinos, como por exemplo, genes de resistência a parasitas gastro-intestinais, carrapatos e mastite.

O sucesso no isolamento de genes em bovinos deve envolver uma ação combinada das estratégias de mapeamento de ETLs, mapeamento comparativo e estudos de expressão, como está mostrado na Figura 1.

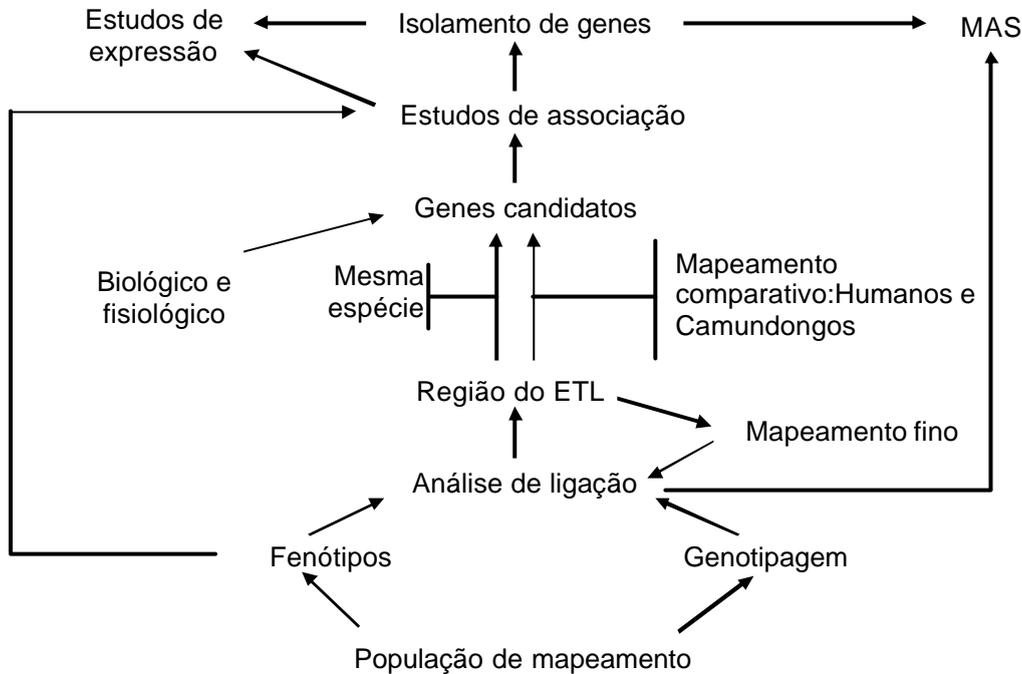


Figura 1. Esquema mostrando as diferentes estratégias utilizadas no isolamento de genes em bovinos.

#### Iniciativa Brasileira em Genoma de Bovinos.

Nas regiões tropicais a infestação dos animais por endo e ectoparasitas causa uma redução na produtividade dos animais susceptíveis, levando em alguns casos a morte dos mesmos. Produtos químicos têm sido utilizados, em grande quantidade, para combater estes parasitas, sem todavia conseguir eliminá-los totalmente. O uso destes produtos, além de representar um custo considerável aos produtores, causa efeitos colaterais, pois estes produtos podem deixar resíduos químicos que contaminam a carne, o leite e o meio ambiente. Uma outra fonte importante de perda econômica na pecuária leiteira em todo o mundo é o estresse térmico que tem efeito adverso sobre a produção de leite, fisiologia de produção, reprodução, mortalidade de bezerros e saúde do úbere, o que provoca uma queda na produção de leite nas regiões quentes e úmidas.

O uso indiscriminado de produtos químicos e a não observância, por parte dos criadores, dos prazos para a utilização do leite e da carne, dos animais tratados, afetam diretamente a qualidade destes produtos e indiretamente contaminam o meio ambiente.

Além deste aspecto, a melhoria da qualidade nutricional constitui-se também de grande importância para a sustentabilidade econômica da atividade.

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 160 milhões de cabeças, sendo que 130 milhões são exploradas para a atividade de corte e 30 milhões para atividade de leite. A atividade agropecuária representa cerca de 50% do PIB agropecuário do Brasil, o que mostra a grande relevância econômica e social para o país. As perdas provocadas pelos ecto e endoparasitas provocam reduções drásticas na produção de carne e leite. O país deixa de produzir 26 milhões de arrobas de carne/ano (aproximadamente R\$1,04 bilhões) e 4 bilhões de litros de leite/ano (aproximadamente R\$1,2 bilhões). Além disso, a infestação por carrapatos e bernes contribui significativamente para a perda da qualidade do couro, sendo que apenas 8% do couro produzido é comercializado como de primeira qualidade. Além dessas perdas, estima-se que o gasto anual com os produtos químicos para o combate aos parasitas, seja da ordem de R\$ 800 milhões.

Existem, todavia, recursos naturais nas regiões tropicais que, se adequadamente identificados, podem contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção animal. A variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus* permite a identificação de características associadas a resistência a estes parasitas, ao calor e a qualidade dos produtos. As atuais ferramentas da genética molecular possibilitam a prospecção e o isolamento de genes associados à saúde animal e à qualidade de produtos.

Em 1995 a Embrapa Gado de Leite iniciou um projeto que visa identificar regiões genômicas associadas às características de resistência a endo e ectoparasitas e ao estresse térmico em bovinos. Para isso, vem sendo desenvolvida uma população F2, de 400 animais, provenientes do cruzamento de Gir X Holandês, utilizando a técnica de Múltipla Ovulação com Transferência de Embriões (MOET). Esta população será utilizada como fonte de variabilidade genética para as características a serem estudadas. Cada animal, desta população, será avaliado para diversas características fenotípicas relacionadas com a resistência a endo e ectoparasitas e ao estresse térmico. Devido ao grande número de avaliações a serem realizadas e que utilizam diferentes áreas do conhecimento, a Embrapa Gado de Leite conta com diversos parceiros de outras instituições. Ao todo são 25 pesquisadores envolvidos no projeto, sem considerar o grande número de bolsistas que também integram a equipe. Além das avaliações fenotípicas, cada animal da F2 terá o seu genoma investigado, com a genotipagem de cerca de 250 marcadores microssatélites. Estes marcadores foram escolhidos a partir dos mapas existentes, visando cobrir toda a extensão dos 30 cromossomos bovinos, espaçados regularmente a cada 20 cM. Os dados referentes às avaliações fenotípicas serão integrados aos dados moleculares, visando a identificação de regiões no genoma associadas às características de resistência. A etapa seguinte visa o mapeamento fino das regiões genômicas detectadas e a validação dos resultados. Para isso, serão analisados rebanhos comerciais da raça Girolando, sendo que os animais serão avaliados fenotipicamente e genotipicamente para as características mapeadas. Com este procedimento, a região genômica, contendo a característica mapeada, será mais detalhada geneticamente, possibilitando a utilização de marcadores moleculares no auxílio à seleção. Estando as regiões genômicas detalhadas, a etapa seguinte é o isolamento dos possíveis genes presentes na região.

No estado de São Paulo, algumas equipes vem trabalhando com marcadores moleculares associados a características de interesse em bovinos. Recentemente foi desenvolvido um trabalho de varredura de genoma com marcadores microssatélites em bovinos da raça Girolando, realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

(Machado, 2001). Alguns trabalhos com genes candidatos associados a características de interesse econômico têm sido desenvolvidos, bem como estudos de frequência de genes e marcadores microssatélites em bovinos têm sido realizados. Ribeiro et al. (2000) estimaram a frequência do gene da deficiência de adesão de leucócitos em gado Gir e Holandês por meio de PCR. Regitano et al. (1999) estudaram a frequência do gene do hormônio do crescimento e IGF-1 em relação à seleção em rebanhos da raça Canchin. Outros grupos no país, também estão desenvolvendo trabalhos com marcadores moleculares em bovinos. Almeida et al. (2000) estimaram a frequência de marcadores microssatélites num rebanho da raça Brangus Ibagé. Unanian et al. (2000) estudaram a associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com ganho de peso em bovinos da raça Nelore. Também estão sendo iniciados projetos visando a geração de ESTs a partir de bibliotecas específicas visando o estudo de genes de resistência a carrapatos, vermes gastrointestinais e mastite em bovinos das raças Zebuínas.

### **Considerações Finais**

A escolha de reprodutores baseada na seleção assistida com marcadores moleculares possibilitará uma redução nas perdas provocadas por endo e ectoparasitas. Estimando-se que grande parte da população de bovinos poderá se beneficiar destes resultados, isto significará uma grande economia no total destas perdas. Haverá também uma redução na quantidade de produtos químicos atualmente utilizados no controle destes parasitas. É importante ressaltar que esses ganhos serão acumulativos nas gerações futuras, o que significa uma redução ainda maior nos anos subsequentes.

Os trabalhos em genoma de bovinos, a curto prazo, possibilitarão:

- Aumento da eficiência do processo de seleção, por meio da seleção assistida por marcadores.
- Conhecimento da variabilidade genética, a nível molecular, das populações.
- Geração de um grande número de informações de sequências de DNA.
- Identificar genes candidatos para as características relacionadas a saúde animal e qualidade de produtos em bovinos.

E a longo prazo:

- Geração de conhecimento dos mecanismos biológicos ao nível de genes.
- Patenteamento de genes e marcadores associados às características de importância econômica.
- Patenteamento de processos ou mecanismos de ação gênica envolvidos na resistência à doenças e na qualidade de produtos.
- Redução do uso de químicos no combate a endo e ectoparasitas.
- Redução na contaminação do meio ambiente.
- Melhoria da qualidade dos produtos leite e carne.
- Contribuição para a melhoria da segurança alimentar.
- Contribuição para a sustentabilidade da atividade pecuária bovina.

## Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, S.E.M., MACHADO, M.S.N., STEIGLEDER, C.S., GAMA, C.L., HUTZ, M.H., HENKES, L.E., MORAES, J.C.F., WEIMER, T.A. (2000). Genetic diversity in a Brazilian bovine herd based on four microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 23 (2):347-350.
- BAND, M; RON, M. Isolation of polymorphic AGC repeats located 3'to bovine SINEs. *Animal Genetics*, v.25, p. 281-283, 1994.
- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DELEON, S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J. E., O'BRIEN, P. J.; MACLENNAN, D. H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, v.253, p. 448-453, 1991.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* v. 46, p. 319-330. 1975.
- HEARNE, C.M.; GHOSH, S.; TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genet.* v.9, p. 288-294, 1992.
- HERR, C.M.; HOLT, N.A.; MATTHAEI, K.I. REED K.C. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology*, v.33, p. 247-252, 1990.
- KAPPES, S.M. Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology*, v.51, p.135-147, 1999.
- KEHRLI, M. E. JR.; SHUSTER, D. E.; ACKERMAN, M. R. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein Cattle. *Cornell Vet.*, v.82, p. 3-8, 1992.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, K. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v.121, p.185-199, 1989.
- MA, R.Z.; RUSS, I; PARK, C.; HEYEN, D.W.; BEEVER, J.E.; GREEN, C.A.; LEWIN, H.A. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. *Animal Genetics*, v.27, p. 43-47, 1996.
- MACHADO, S.G. *Marcadores moleculares associados a características de importância econômica em bovinos da raça Girolando*. 2001. 103f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2001.
- MULLIS, K. B.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, v.155, p. 335-339, 1987.
- REGITANO, L.C.A., AZEVEDO, J.L., VENCOVSKY, R., PACKER, I.U., BARBOSA, P.F., ROSA, A.J.M., SILVA, N.A., ETCHEGARAY, M.A.L., COUTINHO, L.L. (1999). Selection for breed-specific growth hormone and IGF-1 alleles in a synthetic beef cattle cross, Canchim. *Genetics and Molecular Biology* 22 (4):531-537.
- RIBEIRO, L.A.; BARON, E.E.; MARTINEZ, M.L.; COUTINHO, L.L. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.23 (4), p.831-834, 2000.
- RIJNKELS, M.; MEERSHOEK, E.; DE BOER, H.A.; PIEPER, F.R. Organization of the bovine casein gene locus. *Mammalian Genome*, v.8, p.148-152, 1997.
- ROTHSCHILD, M.F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe*, v.8, p.13-20, 1997.
- SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; KAPPES, S.M.; SONSTEGARD, T.S. Myostation maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammalian Genome*, v.8, p.742-744, 1997.
- SOLLER, M.; ANDERSSON, L. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. *Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz* v.17, p. 329-345, 1998.

- SPRECHER, C. J.; PUERS, C.; LINS, A. M.; SCHUMM, J. W. A general approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques*, v. 20, p. 266-270, 1996.
- UNANIAN, M.M.; BARRETO, C.C.; FREITAS, A.R. CORDEIRO, C.M.T.; JOSAHKIAN, L.A. Associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com a característica peso em bovinos da raça Nelore. *Rev. bras. Zootec.*, 29 (5): 1380-1386, 2000.