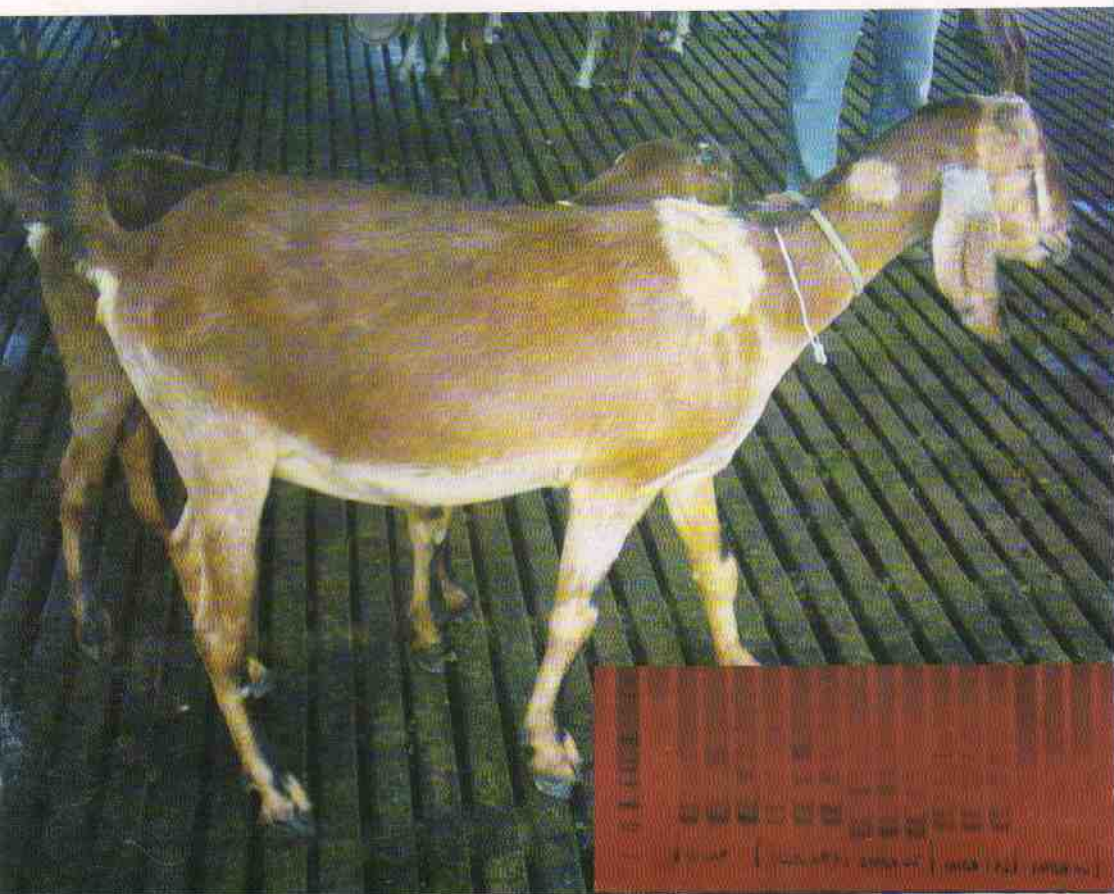


## Teste de Paternidade em Caprinos



## **República Federativa do Brasil**

*Luís Inácio Lula da Silva*

Presidente

## **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

## **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa**

### **Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*

Presidente

*Silvio Crestana*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Ernesto Paterniani*

*Hélio Tollini*

*Marcelo Barbosa Saintive*

Membros

### **Diretoria Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*

Diretor-Presidente

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

*José Gerardo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

Diretores-Executivos

### **Embrapa Caprinos**

*Maria Pinheiro Fernandes Corrêa*

Chefe-Geral

*Claudio Rogério B. Torres*

Chefe-Adjunto de Administração

*Raimundo Nonato Braga Lobo*

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

## Documentos 54

### Teste de Paternidade em Caprinos

Adriana Mello de Araújo  
Simone E. Facioni Guimarães

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Caprinos**

Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10

CEP 62011-970 - Sobral/CE

Fone:(0xx88) 3677-7000

Fax:(0xx88) 3677-7055

Home page: <http://www.cnpc.embrapa.br>

**Comitê de Publicações**

Presidente: Eneas Reis Leite

Secretário-Executivo: Ana Clara Rodrigues Cavalcante

Membros: Expedito Aguiar Lopes

José Ubiraci Alves

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisor gramatical: José Ubiraci Alves

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo

Foto(s) da capa: Adriana Mello de Araújo

Editoração eletrônica: Alexandre César Silva Marinho

**1ª edição**

1ª impressão (2005): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

---

Araújo, Adriana Mello de.

Teste de paternidade em caprinos / Adriana Mello de Araújo, Simone E. Facioni Guimarães. – Sobral : Embrapa Caprinos, 2005.

24 p. – (Documentos / Embrapa Caprinos, ISSN 1676-7659; 54).

I. Genética animal. 2. Teste de paternidade. I. Guimarães, Simone E. Facioni. II. Embrapa Caprinos. III. Título. IV. Série.

---

CDD 636.0822

© Embrapa 2005

# Autores

## **Adriana Mello de Araújo**

Zootecnista, D.Sc., em Genética e Melhoramento,  
Embrapa Caprinos, Estrada Sobral/Groaíras, Km 04,  
Caixa Postal - D10, CEP - 62011-970 - Sobral/CE  
Embrapa Caprinos  
adriana@cnpc.embrapa.br

## **Simone E. Facioni Guimarães**

Med. Vet. D.Sc., em Genética Animal  
Universidade Federal de Viçosa  
Laboratório de Biotecnologia Animal/DZO  
Av. PH. Rolfs s/n  
CEP: 36571-000, Viçosa/MG  
Fones: (0xx31) 899 2273/899 2260  
Fax: (031) 899 2275

## Apresentação

O melhoramento genético das espécies animais de interesse econômico é feito basicamente pela seleção dos indivíduos identificados como superiores, que serão os pais da futura geração. A cada geração, a perfeita identificação destes indivíduos, para acasalamentos dirigidos, promove as respostas esperadas no que se refere ao aumento de produção e produtividade dos rebanhos.

Os programas de melhoramento genético para as diversas espécies de animais domésticos aplicam os conhecimentos e as técnicas de genética quantitativa, em escala massal, na realização de avaliações genéticas que estimam o potencial genético de matrizes e reprodutores. Neste processo, as ferramentas estatísticas para estimativas requerem um adequado controle da genealogia dos animais que serão avaliados. Erros na identificação do pedigree destes animais promovem sérios prejuízos nestas avaliações, subestimando ou superestimando a estimativa do potencial genético de alguns animais o que pode comprometer os ganhos genéticos esperados com o programa de melhoramento.

Estes erros de pedigree geralmente são frutos de falhas no manejo dos animais, com problemas no sistema de controle de coberturas ou na separação dos sexos, dentre outros. Por outro lado, há casos mais graves em que a participação do criador é proposital de maneira a se beneficiar economicamente com a identificação errônea. Ainda existem casos de erros no momento da formação e manutenção dos bancos de dados.

A possibilidade de realizar o teste de paternidade permite a resolução de casos especiais, importante para a continuidade eficiente de alguns programas de melhoramento genético, além de possíveis processos judiciais.

O presente trabalho retrata esta situação e apresenta os métodos, fundamentos e normas para a realização do teste de paternidade em caprinos, além dos trabalhos já realizados entre a Embrapa Caprinos e a Universidade Federal de Viçosa. Em uma linguagem clara e objetiva, é importante material de leitura para os interessados na área de genética e melhoramento animal, além daqueles comprometidos com o desenvolvimento da caprinocultura

*Raimundo Nonato Braga Lobo*

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento*

## Sumário

Introdução .....	09
Genealogia ou Pedigree .....	09
Métodos Científicos para a Verificação de Paternidade ..	10
Fundamentos do Teste de Paternidade .....	12
Normas para o Teste de Paternidade .....	14
Resultado do Trabalho UFV - Embrapa Caprinos .....	15
Referências Bibliográficas .....	22



# Teste de Paternidade em Caprinos

---

*Adriana Mello de Araújo*

*Simone E. Facioni Guimarães*

## Introdução

Os reprodutores selecionados por produtores são responsáveis pela superioridade imprimida às gerações futuras do rebanho. Por isso, grande parte dos produtores de caprinos paga um preço diferenciado na aquisição de reprodutores e matrizes superiores, descendentes, muitas vezes, de material genético importado, para assim realizar o melhoramento genético de seu rebanho. Tudo isto está baseado nas leis da genética, onde os caracteres são transmitidos dos progenitores à sua progênie. O teste de verificação de paternidade é a comprovação científica da descendência de um indivíduo, tomando por base a compatibilidade genética entre os progenitores e as progênies. A importância da identificação correta de paternidade para a produção animal está implícita no princípio do melhoramento genético por meio da identificação e multiplicação de genótipos superiores dentro dos rebanhos visando aumentar o potencial produtivo dos animais.

## Genealogia ou Pedigree

O Registro Genealógico de caprinos é realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Caprinos (ABCC) e suas filiadas. Este registro consiste nas informações de cobertura de matrizes por determinados reprodutores, que dará então origem ao registro de nascimento. O pedigree é uma garantia de pureza racial. Entretanto, não existe comprovação científica, no Registro Genealógico, da descendência genética de um animal. Existem, muitas vezes, erros de pedigree

gerados de informações errôneas de cobertura, falta de atenção nas anotações, acidentes como reprodutores que pulam as cercas, ou mesmo má fé do criador ao prestar, propositadamente, informações que favoreçam seus interesses.

As avaliações genéticas dos animais de interesse econômico, publicadas em catálogos e sumários, são fruto, na maioria das vezes, de informações de parentesco fornecidas pelo registro genealógico. A genealogia desempenha, portanto, um papel importante no melhoramento genético e na identificação de genótipos superiores nos programas de avaliações genéticas.

Trabalhos realizados no Brasil e no exterior com bovinos leiteiros demonstram erros de paternidade superiores a 10%, trazendo prejuízos aos produtores que empregam o melhoramento genético em seus rebanhos (Curi & Lopes, 2002; Rosa et al., 1997; Ron et al., 1996). Segundo Penna et al. (1998), parece haver um consenso por parte dos produtores em aceitar erros de genealogia, ignorando-se, contudo, as consequências para o melhoramento genético.

A utilização de métodos de aceleração reprodutiva, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, propicia ainda mais a ocorrência de erros de genealogia. A partir daí, tornou-se evidente a importância da realização de exames que pudessem garantir as informações contidas nos pedigrees.

## Métodos Científicos para a Verificação de Paternidade

A tipagem sangüínea foi o primeiro teste de paternidade disponível, surgiu em torno de 1930. Este método envolve exame sorológico com anticorpos, tratando-se de um método imunogenético, adicionado ao teste das proteínas sangüíneas, onde as variantes protéicas são separadas por meio de eletroforese (Burow & Blake, 1998). O teste sangüíneo de bovinos promove uma precisão de 98%, implicando que, a cada 100 pais falsamente indicados, 98 são detectados (excluídos) pelo teste.

O desenvolvimento da genética molecular possibilitou a identificação de relações entre o genótipo pai-progênie e o surgimento de metodologias visando à confirmação de paternidade. Os marcadores de DNA, baseados na técnica de PCR (*polimerase chain reaction*, ou reação em cadeia da polimerase), surgiram no final da década de 80 e se firmaram como a principal ferramenta para testes de

paternidade (Burow & Blake, 1998). Os marcadores mais utilizados na determinação de paternidade são os microssatélites, que são repetições em tandem de di- até hexanucleotídeos presentes na molécula de DNA, sendo detectados por meio da técnica de amplificação por PCR (Fig. 1). Os microssatélites fornecem marcas co-dominantes, apresentam alta variabilidade e são passíveis de automação em suas análises, destacando-se como a ferramenta ideal para testes de paternidade. Segundo Bowling (2001), para um teste de paternidade ter aplicação de rotina, são características essenciais a acurácia, a efetividade e o baixo custo, além da rapidez de resposta, da padronização de referência e da fácil transferência de informações entre laboratórios. Ainda segundo Bowling (2001), o processo não deve ser limitado ao sangue fresco, pois o material biológico utilizado pode ser sangue seco, sêmen, células do epitélio bucal, folículos pilosos, etc.

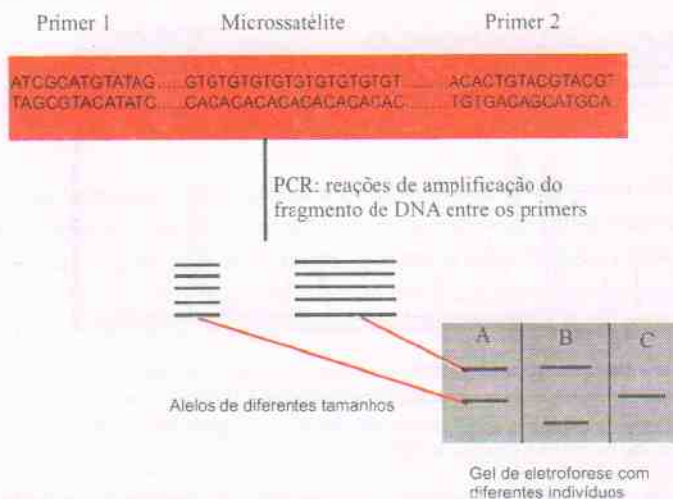


Fig. 1. Esquemática da fita de DNA, a amplificação dos fragmentos de microssatélites por meio da técnica de PCR e o polimorfismo de tamanho dos alelos visualizados após eletroforese.

As rotinas de laboratório para o teste são a extração de DNA a partir da amostra, as amplificações dos microssatélites por meio de reações PCR e a separação dos fragmentos obtidos na PCR por meio de eletroforese. Na reação de PCR, a molécula de DNA molde é multiplicada entre as seqüências flanqueadoras dos microssatélites, conhecidos como *primers*. Esta multiplicação permite ao teste utilizar pouco DNA, e mesmo assim, possuir alta especificidade e sensibilidade. Os fragmentos amplificados são os alelos, podendo cada indivíduo possuir até dois tipos, sendo obrigatoriamente um herdado do pai e um herdado da mãe.

Estes fragmentos amplificados são submetidos à eletroforese, que os separa de acordo com o tamanho (expresso em pares de base), formando bandas visíveis quando corados especificamente.

Os testes de paternidade são feitos, geralmente, em sistemas semi-automáticos, onde os *primers* são marcados fluorescentemente, permitindo que se construam painéis onde vários marcadores são analisados simultaneamente (Fig.2). Otimizando custo e tempo, tais sistemas permitem, ainda, um aumento na precisão dos resultados, pois a análise do tamanho dos fragmentos é obtida por meio de *software* específico. A facilidade de padronização da técnica tem levado à sua crescente adoção, embora o preço ao produtor da tipagem sanguínea custe em torno de US\$ 11 e o exame de DNA cerca de US\$ 45 por indivíduo analisado.

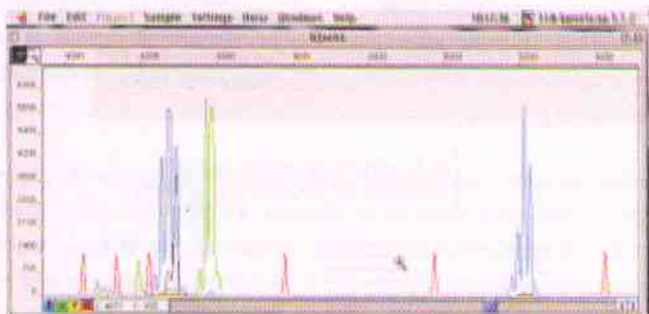


Fig. 2. Eletroferograma obtido utilizando simultaneamente quatro marcadores de microssatélites no equipamento ABI 310 Genetic Analyzer (detalhe). O vermelho é o padrão de tamanho molecular, os picos azul, verde e preto correspondem ao tamanho dos fragmentos gerados no PCR.

Em animais de maior valor comercial, como os eqüinos de corrida, o teste de paternidade é utilizado em rotina há mais de dez anos. Em bovinos, animais em centrais de inseminação e doadores de embriões são também submetidos ao teste de paternidade. Existe uma proposta do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a normatização do teste no País, indicando situações onde o uso torna-se obrigatório e indicando laboratórios credenciados em cada espécie.

## Fundamentos do Teste de Paternidade

Não existe na genética uma prova conclusiva de paternidade, apenas indícios de não-paternidade, traduzidos como exclusão de paternidade. O compartilhamento

de alelos entre a progênie e o suposto pai estabelece a inclusão de paternidade (Fig. 3A), e o suposto pai que possui o genótipo incompatível com a progênie em questão é excluído de paternidade (Fig. 3B). O suposto pai que permaneça não excluído pelo teste é tomado como o pai verdadeiro.

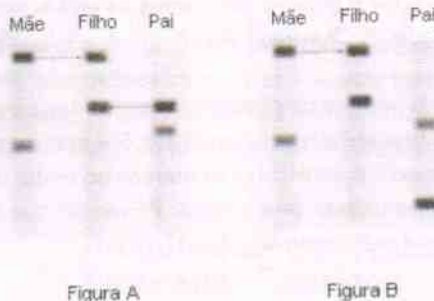


Fig. 3. Esquemática de compartilhamento de bandas eletroforéticas. (A) Inclusão de paternidade e (B) Exclusão de paternidade.

Existem duas fórmulas para o cálculo da probabilidade de exclusão (PE), quando o genótipo materno é ou não conhecido, sendo que no primeiro caso a probabilidade de exclusão torna-se maior. Assim, o teste de paternidade realizado pela genotipagem do trio mãe-progênie- suposto pai possui maior probabilidade de exclusão (Jamielson & St. Taylor, 1997).

A PE é definida como a probabilidade de um pai ser excluído como pai verdadeiro, assumindo que este pai alegado possa ser um indivíduo ao acaso. Ou seja, a PE é relacionada ao poder do teste de excluir um falso pai. A fórmula de exclusão de paternidade baseia-se nas freqüências genotípicas da população, deduzidas pelas freqüências alélicas estimadas, assumindo, portanto, acasalamento ao acaso na população (Jamielson & St. Taylor, 1997).

Em termos de freqüência genotípica, a fórmula pode ser deduzida em

$$= \sum_{-} - \sum_{=} \sum_{=+} \left[ - + \right]$$

sendo *n* o número de alelos, onde para calcular a probabilidade de usar este *locus* para detectar parentescos falsos, deve-se substituir as freqüências alélicas *p* obtidas na fórmula.

As probabilidades de inclusão (PI) e exclusão (PE) são complementares ( $PI = 1 - PE$ ). A PE combinada para mais de um marcador é obtida pelo produto das PI de cada marcador, uma vez que uma exclusão é conclusiva. Assim, a probabilidade PI é a que não é excluída em nenhum dos loci,  $(1 - PE_{n1}) (1 - PE_{n2}) \dots (1 - PE_{nk})$ .

Se o número de alelos ( $n$ ) for o mesmo para todos os loci  $k$ , então a probabilidade de exclusão combinada (PEC) é dada por  $PEC = 1 - (1 - PE_n)^k$

Na teoria, quanto maior o número de marcadores utilizados para compor o teste de paternidade, maior a probabilidade de exclusão. Em contrapartida, o preço da análise também se eleva com o acréscimo de marcas no teste. Na prática, geralmente o teste de paternidade deve possuir PE menor que 0,9999. Para isso são utilizados cerca de dez marcadores.

A inclusão de paternidade é baseada no compartilhamento de bandas eletroforéticas entre o filho e suposto pai. A exclusão de paternidade se caracteriza pela incompatibilidade em dois marcadores ou mais entre suposto pai-progênie. Os erros de tipagem que possam ocorrer no laboratório resultam quase sempre em falsa exclusão, ressaltando a importância no padrão de qualidade dos laboratórios que realizam teste de paternidade.

Exclusões de paternidade são incontestáveis, enquanto a prova da paternidade depende de inferências estatísticas baseadas na ausência de uma exclusão. Entretanto, para pares específicos mãe-filho, o alelo paterno obrigatório pode ser freqüente, enquanto em outras situações ele pode ser raro. Assim, a ausência de exclusão na última situação será mais significativa que na primeira. Isto pode ser quantificado pela razão de verossimilhança entre paternidade e não paternidade, chamada Índice de Paternidade (IP), que é uma maneira de quantificar a evidência encontrada em favor da paternidade biológica do possível pai.

## Normas para o Teste de Paternidade

Existe um órgão científico mundial responsável pelo intercâmbio de informações na área de genética molecular animal. O International Society for Animal Genetics (ISAG) produz informações de microssatélites de DNA a serem utilizados em cada espécie para o teste de paternidade. Recentemente, o padrão para caprinos foi estabelecido, com dezoito marcas para composição. No Brasil, o teste de paternidade em caprinos e ovinos deverá conter no mínimo oito

marcadores, de acordo com Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Animal.

O ISAG promove, também, testes interlaboratoriais visando comparar os laboratórios habilitados para o teste de paternidade, com o objetivo de estabelecer um padrão de qualidade nos resultados fornecidos por estes laboratórios.

No Brasil, está sendo criada uma Instrução Normativa do Ministério para o credenciamento de laboratórios com vistas a realizar teste de identificação genética junto ao Departamento de Defesa Animal (DDA), da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## Resultados do Trabalho UFV- Embrapa Caprinos

Recentemente, a Universidade Federal de Viçosa desenvolveu junto com a Embrapa Caprinos um painel de marcadores de microssatélites para teste de paternidade em caprinos (Araújo, 2004), obtendo probabilidade de exclusão de 0,999, ou seja, uma probabilidade de inclusão errada de 1 em 2.400 casos. Foram testados onze *loci* de microssatélites: BETACAP, INRA005, ILSTS0087, INRA006, INRA172, ILSTS005, ILSTS011, SRCRSP05, INRA063, OARFCB48 e BM3205, sendo cinco pertencentes ao ISAG e cinco cedidos em colaboração com o INRA, França. Os demais foram retirados do Goatmap através da internet. O *locus* BETACAP é pertencente ao *cluster* gênico da caseína (Pépin et al., 1995). O *loci* ILSTS0087, INRA005, INRA006, INRA063, INRABERN172, ILSTS005, ILSTS011 e BM3205 foram descritos em caprinos por homologia em bovinos e o *locus* OARFCB48 por homologia em ovinos (Bishop et al., 1994; Crawford et al., 1995; Vaiman et al., 1996). O SRCRSP05 foi descrito por Arevalo et al. (1994) em caprinos.

No estudo aplicou-se o painel de onze marcadores de microssatélites para a verificação de paternidade nos casos onde a mãe é ou não genotipada. Os microssatélites foram analisados em PCR multiplex e eletroforese multiplex, em sistema de genotipagem semi-automático (ABI 310, Applied Biosystems), visando otimizar tempo e custo com as genotipagens (Tabela 1).





Tabela 1. Continuação

<i>Locus</i>	Mix	T <sub>s</sub>	Mg <sup>2+</sup>	Pr	Dye	PE	N	(pb)	FG
								143	0,057
								145	0,078
								147	0,339
								149	0,349
								153	0,029
INRA006	2	55	2,50	0,16	Hex	0,656	10	106	0,041
								108	0,034
								112	0,224
								114	0,102
								116	0,110
								118	0,288
								120	0,107
								122	0,081
								124	0,009
								126	0,003
INRABERN172	1	55	1,25	0,20	Hex	0,568	8	136	0,029
								140	0,009
								142	0,145
								Continua...	



Tabela 1. Continuação

<i>Locus</i>	Mix	T <sub>0</sub>	Mg <sup>2+</sup>	Pr	Dye	PE	N	(pb)	FG
								274	0,377
								276	0,214
								278	0,098
								280	0,002
SRCRSP05	3	56	2,0	0,16	Hex	0,477	7	157	0,032
								159	0,048
								163	0,134
								165	0,191
								167	0,498
								169	0,056
								173	0,041
INRA063	3	56	2,0	0,20	6-Fam	0,475	9	162	0,017
								164	0,061
								166	0,115
								168	0,380
								170	0,347
								172	0,078
								207	0,002

Continua...

Tabela 1. Continuação

<i>Locus</i>	Mix	T <sub>a</sub>	Mg <sup>2+</sup>	Pr	Dye	PE	N	(pb)	FG
OARFCB48	4	58	3,0	0,20	Tet	0,584	7	152	0,071
								154	0,024
								156	0,212
								158	0,234
								160	0,189
								162	0,262
								164	0,008
BM3205	5	50	1,25	0,20	Hex	0,570	11	215	0,067
								217	0,044
								219	0,010
								223	0,350
								225	0,131
								227	0,281
								229	0,035
								231	0,060
								233	0,002
								235	0,008
237	0,010								

