

## CAPÍTULO VIII

### BIOTECNOLOGIA ANIMAL: AVANÇOS DE METODOLOGIAS NA ÁREA

**Wilson Malagó-Jr<sup>1\*</sup>, Adriana Luiza Somavilla<sup>2</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Embrapa pecuária sudeste.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/FCAV, Campus Jaboticabal.

\* E-mail: wilson@cnpse.embrapa.br

#### RESUMO

O melhoramento genético animal é fundamentado em análises de informações obtidas a partir de mensuração de caracteres quantitativos. De fato, as observações fenotípicas constituem o mais importante fator para os programas de melhoramento. Entretanto, nos últimos anos as informações moleculares tem ganhado importância para auxiliar a seleção. Com a evolução dos marcadores moleculares os genomas estudados estão atualmente densamente cobertos e isto está provocando uma mudança no cenário do melhoramento. Deste modo, a seleção assistida por marcadores está sendo substituída pela seleção genômica. Neste contexto, as informações fenotípicas ao serem associadas com os marcadores SNPs densamente distribuídos no genoma, apresentam algumas vantagens em relação ao melhoramento genético tradicional, pautado apenas nas informações oriundas de mensurações fenotípicas. Entre elas destacam-se o aumento da acurácia da predição do valor genético sem comprometimento, e possível redução, do intervalo de gerações, a possibilidade de redução do esforço de mensurações fenotípicas e o mapeamento mais acurado de regiões genômicas envolvidas com os fenótipos de interesse.

**PALAVRAS CHAVE:** genética quantitativa, marcadores moleculares, melhoramento genético, seleção assistida por marcadores, seleção genômica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### GENÉTICA QUANTITATIVA

Os principais investimentos em programas de melhoramento animal estão voltados para mensuração de características, avaliação genética e técnicas para aumento dos índices produtivos. A qualidade dos dados de medida fenotípica e registros de pedigree são de fundamental importância em programas de melhoramento genético. Com base nas medidas fenotípicas de características de interesse são calculados os valores genéticos estimados (VGEs) e as diferenças esperadas na progênie ( $DEP = VG/2$ ). Há métodos estatísticos sofisticados para fornecer as Melhores Predições Lineares Não viesadas, ou “Best Linear Unbiased Prediction” - BLUP.

Grande parte das características de produção são quantitativas e controladas por muitos pares de genes com efeitos individuais pequenos e, os métodos de seleção baseados na informação fenotípica dos animais são efetivos na exploração desses poligenes e culminam no aumento da frequência das variantes (sejam eles de menor ou maior efeito) que explicam as características desejadas resultando em animais mais adequados a cada sistema de produção.

Os bons resultados das técnicas de inseminação artificial permitem a manutenção de um número menor de reprodutores e a rápida disseminação do material genético dos mesmos. Mais descendentes por animal resultam em estimativas mais acuradas dos valores genéticos. As avaliações genéticas culminam na predição dos méritos genéticos de cada animal que orienta a decisão sobre quais animais devem ser selecionados como pais da próxima geração. Com isso, no entanto, os animais com melhores avaliações serão excessivamente usados, podendo resultar em problemas de endogamia na população. Por isso, em longo prazo, entre as preocupações do melhoramento se encontram o controle da endogamia e a manutenção da variação genética.

A estimativa dos valores genéticos pode ser baseada em características do próprio animal ou em animais aparentados. O teste de progênie baseado em um grande número de filhos fornece estimativas mais acuradas dos valores genéticos em programas que não usam informação de marcadores moleculares. Ao escolher os pais da futura geração, a co-ascendência também deve ser levada em consideração, por estar diretamente relacionada com o aumento da endogamia, que deve permanecer abaixo de certos limites.

O mérito genético de um animal pode ser mais bem estimado usando a informação dos parentes. O método de avaliação genética que fornece estimativas dos valores genéticos com propriedades BLUP pondera a importância relativa dos parentes e do próprio indivíduo analisado. No entanto, por pressupor que as características são afetadas por uma grande quantidade de genes de efeito relativamente pequeno, além de efeitos não genéticos, o

método que gera a predição BLUP não realiza um bom trabalho na exploração de genes de efeito maior. Neste contexto, é interessante a utilização de marcadores moleculares para a identificação destes genes. Existem abordagens experimentais que identificam marcadores genéticos localizados próximos aos genes de efeito maior, facilmente observável no fenótipo dos indivíduos e que podem melhorar a estimativa do valor genético de um animal. A exploração direta dos genes que conferem (mesmo que parcialmente) o mérito genético de um animal pode proporcionar maiores progressos genéticos.

De qualquer modo, as observações fenotípicas podem ser utilizadas para selecionar os animais (visto que parte das diferenças observadas em indivíduos pode ser devida a efeitos genéticos) e o progresso genético (aumento do valor genético médio) pode ser obtido sem o conhecimento dos genes envolvidos nas características de interesse.

Os princípios dos programas de melhoramento são: Fenótipos melhores devem provir de genótipos melhores, Genótipos melhores geram genótipos e fenótipos melhores. O progresso genético ou ganho genético, ou ainda, a resposta à seleção, depende da intensidade com que os pais são selecionados (quanto os indivíduos são melhores do que a média de sua geração), da acurácia da seleção dos pais e de quanto sua superioridade será transmitida (herdabilidade de cada característica), da velocidade de substituição de gerações (intervalo de gerações) e da variabilidade genética da característica.

Espera-se então que o fenótipo dos animais esteja correlacionado com o genótipo e, portanto, que os animais gerem melhores descendentes para as características selecionadas. No entanto, para algumas características esta relação é mais forte do que para outras. Isso depende da herdabilidade, estimada em função da variabilidade genética. Assim, quanto maior a herdabilidade, maior é a proporção do fenótipo que pode ser explicado pelo genótipo dos indivíduos.

Ao selecionar os melhores animais como pais leva-se em conta a intensidade de seleção, que é definida como o número de unidades de desvios-padrão que a média dos pais selecionados é superior à média dos animais considerados para a seleção. A intensidade de seleção permite prever a performance do grupo selecionado. Vale citar que menos animais selecionados proporcionam maior intensidade de seleção. Assim, a proporção selecionada (número de animais selecionados como pais / número de animais considerados para seleção) é inversamente proporcional à intensidade de seleção. Também, se o tamanho da população é pequeno, as intensidades de seleção são levemente reduzidas. Por exemplo: o melhor entre 10 animais não será tão bom quanto os melhores 100 entre 1000.

A escolha dos pais está sujeita a critérios adicionais que teoricamente não fazem parte dos objetivos do programa de melhoramento. Desta forma, na prática nem sempre é fácil definir o critério de seleção com uma única característica, e com isso, outros critérios são selecionados por razões culturais e/ou comerciais como, por exemplo, a cor da pelagem. Isto reduz o número de candidatos à seleção e compromete o ganho genético das características mais importantes definidas no programa.

Muitas vezes os candidatos à seleção são de grupos heterogêneos e com isso nem sempre estão disponíveis para reprodução ao mesmo tempo, podendo ser de diferentes regiões ou fazendas e diferentes épocas ou gerações. Existem outros fatores, devido ao tipo de manejo, que também contribuem para criar diferenças não genéticas de produção entre os animais. Neste contexto, por exemplo, animais que produzem em estações desfavoráveis, e apresentam baixa performance, podem ser geneticamente iguais aos animais com boas performances em estações favoráveis. Por isso, as performances devem ser comparadas entre grupos de contemporâneos. Este viés pode ser corrigido pela expressão da performance dos animais como um desvio da média dos contemporâneos.

Ao escolher a manutenção dos melhores reprodutores em um dado rebanho, por conta da sobreposição de gerações, as estimativas dos valores genéticos obtidas por metodologias de avaliação que geram BLUP desses valores, são corrigidas para diferenças de anos (classes de idade) e para a tendência genética (é esperado que as gerações mais novas apresentem ganho genético em relação as mais velhas).

Em princípio, seria interessante selecionar a menor quantidade possível de animais de cada sexo, maximizando a intensidade de seleção. Sob este aspecto a taxa reprodutiva se torna uma restrição. O número de machos e fêmeas usados na reprodução deve ser suficiente ao menos para manter o tamanho do rebanho. Com o uso de inseminação artificial a intensidade de seleção pode ser aumentada, pois quanto mais descendentes por macho, menos machos serão selecionados. Por outro lado, há um limite inferior do número de pais que podem ser usados por conta do aumento de endogamia. O grau de endogamia é inversamente proporcional ao número de pais utilizados a cada geração.

O progresso genético pode ser obtido em uma base anual e este será tão mais rápido quanto menor for o intervalo entre gerações (média de idade dos pais quando a progênie nasce). Haverá mais ciclos de seleção em um dado período se reprodutores mais jovens forem usados, e assim a mudança genética será maior. Os programas de melhoramento devem, portanto, buscar intervalos entre gerações reduzidos. No entanto, a seleção de animais jovens pode implicar em baixa acurácia de seleção, pois estes animais geralmente têm

menos informações disponíveis (por falta de medidas da própria performance, de pais, irmãos e meio-irmãos, e de teste de progênie). Os testes de progênie por sua vez podem levar tempo e aumentar o intervalo entre gerações. Uma alternativa é a inseminação da maior parte das fêmeas utilizando sêmen de reprodutores com estimativas mais acuradas e, em menor escala dos reprodutores mais jovens, com valores genéticos altos e acurácia menor.

A seleção leva a perda de variabilidade e com isso a resposta à seleção (progresso genético) em gerações futuras é inferior à resposta inicial. Assim, é esperado que em um dado momento a característica melhorada alcance um limite máximo. Além disso, a endogamia deve ser controlada evitando maior incidência de defeitos genéticos. No entanto os esforços para limitar a endogamia resultam no aumento do tamanho efetivo da população (mais animais são escolhidos para reprodução), o que limita a taxa de progresso genético. Assim programas de melhoramento ideais buscam equilíbrio entre endogamia e progresso genético.

## **MARCADORES MOLECULARES**

O verdadeiro valor genético de cada animal é desconhecido para as características de interesse econômico e os melhoristas recorrem às observações fenotípicas para fazer inferências sobre o mérito genético dos indivíduos. Em alguns poucos casos tal inferência é feita a partir de locos com genes de efeito maior. Para a localização de QTLs ou genes, podem-se usar estimativas de recombinação genética entre “pontos de referência” sobre os cromossomos, com o auxílio de marcadores moleculares (ou genéticos) que podem ser facilmente genotipados.

Existem diversos tipos de marcadores moleculares que tiveram maior ou menor importância ao longo do tempo. Estes marcadores foram listados por (Maheswaran, 2004). Entre os mais usados temos os microssatélites (Schlötterer, 2004). Os microssatélites foram muito utilizados na construção de mapas genéticos para as principais espécies de animais domésticos e são empregados em experimentos delineados para localizar QTLs. Os microssatélites são úteis também para verificar a ascendência dos animais em programas de melhoramento.

Microssatélites são regiões do DNA com número variável de repetições curtas de bases. Cada loco que constitui um microssatélite é reconhecido e identificado por primers adjacentes às repetições via PCR. Cada microssatélite pode produzir muitos alelos diferentes com diferentes números de repetição (comprimentos diferentes da região de repetição). Quanto mais alelos (microssatélite mais polimórfico), maior a probabilidade de ocorrer indivíduos heterozigotos e, maior a capacidade de observar associação entre o marcador e o fenótipo de interesse, devido à associação dos marcadores com o

alelo favorável de um QTL.

Se um alelo desejável (G) está associado a um marcador (M) esta associação pode ser quebrada, em uma progênie futura, e com isso o marcador (M) pode se associar ao alelo indesejável (g). A fase de ligação depende da proximidade física entre o marcador e o QTL. Em outras palavras, a proporção da progênie em que a associação é quebrada, dada pela taxa de recombinação, varia de acordo com a proximidade entre o alelo de interesse e o marcador estudado. Quanto mais próximos, ou ligados, estiverem o alelo e o marcador, menor a ocorrência de recombinação entre eles.

Vale lembrar que nestes estudos, as informações disponíveis são os genótipos dos marcadores e os fenótipos dos animais. Na prática centenas de marcadores microssatélites são usados para conseguir razoável cobertura do genoma. A detecção de QTLs através de marcadores é baseada na análise de segregação de indivíduos heterozigotos. Os fenótipos da progênie são registrados e sua associação com os marcadores é estimada. É importante ter em mente que pode não ser possível distinguir entre um QTL de efeito maior, mas pouco ligado ou distante do marcador, de um QTL de efeito mais moderado, fortemente ligado ao marcador. Nesta situação ambos os QTLs podem resultar na mesma superioridade da progênie que carrega o marcador analisado. Outrossim, estes estudos podem apresentar problemas ao inferir sobre a significância dos resultados. Há o risco de declarar a presença de um QTL quando de fato ele não existe e, por outro lado, omitir um QTL importante devido a uma inferência conservadora.

Marcadores fortemente ligados a QTLs podem ser usados na seleção assistida por marcadores. Por outro lado, genes candidatos posicionais podem ser usados para testar e encontrar marcadores diretos. A maior vantagem destes métodos é a possibilidade de seu uso sem a necessidade de medidas das características ou registros de pedigree, apesar de que estas informações são importantes para monitorar os efeitos dos marcadores (ou dos genes) ao longo das gerações e entre raças, populações e sistemas de produção diferentes.

Em alguns casos o conhecimento prévio das bases fisiológicas e bioquímicas de um fenótipo leva a identificação direta da mutação responsável pelo fenótipo. Isso ocorre para características afetadas por um único par de genes (raras quando se fala em características de interesse econômico em animais domésticos). Nestes casos, o marcador é o próprio gene que é genotipado ou sequenciado para testes de associação com o fenótipo. Informações de espécies próximas ou relacionadas, sobre a associação direta de fenótipos diversos, têm aumentado o número de genes candidatos potenciais ao envolvimento com características de interesse em programas de melhoramento animal. Há de fato um grande número de genes candidatos potenciais que não necessariamente tem tido sucesso ou utilidade em programas de melhoramento, pois explicam

apenas parte da variação genética e sua má utilização pode acarretar perdas no potencial de seleção. Por outro lado, estes genes podem ser “filtrados” quando mapeados a regiões próximas a marcadores que segregam junto com as características de interesse, isso diminui o número de candidatos tornando os genes “candidatos posicionais”, além de potenciais.

Existe ainda a possibilidade de identificar incorretamente um gene candidato como sendo um gene responsável pela característica de interesse devido ao desequilíbrio de ligação (proximidade que faz duas regiões do genoma segregarem junto) com o verdadeiro gene responsável. Isso destaca o valor do monitoramento do marcador em rebanhos ou condições distintas.

Os marcadores têm evoluído e a tendência é uma progressão natural de marcadores ligados para marcadores diretos (Maheswaran, 2004; Schlötterer, 2004). Outra categoria de marcadores identificados aos milhares tem mudado o horizonte do melhoramento genético. Trata-se dos polimorfismos de base única, ou SNPs, do inglês Single Nucleotide Polymorphism. Os projetos de sequenciamento de genomas (ver no próximo item) de animais domésticos e estudos de sequências de interesse em populações distintas proporcionaram a identificação de um grande número de SNPs para os animais domésticos (Liu et al., 2009) permitindo a disponibilização pública de SNPs no bancos de dados dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)). Estes marcadores apresentam grande cobertura do genoma (muito maior que os marcadores anteriores como microssatélites) e estão atualmente organizados em painéis (lâminas) disponíveis para ensaio em larga escala (Matukumalli, 2009). A plataforma mais recente para genotipagem em bovinos (“Illumina BovineHD”) possui mais de 770 mil SNPs, com espaçamento médio de cerca de 3 kb (3000 pares de bases) entre os SNPs e possibilitam um monitoramento de todo o genoma segregando variantes de sequências genômicas envolvidas nas características de interesse.

## **SEQUENCIAMENTO GENÔMICO**

O sequenciamento genômico foi primeiramente realizado com o projeto genoma humano. Este projeto teve início ao final da década de 80 tendo sido viabilizado após a automatização do método de sequenciamento de Frederick Sanger (método da terminação da cadeia), que permitiu a leitura computadorizada das sequências de bases do DNA (Smith et al., 1986). Para ler a sequência de bases do DNA genômico os cromossomos são fragmentados em pequenos pedaços e após a leitura os segmentos são remontados na ordem correta. Dois métodos foram empregados para o sequenciamento do genoma humano. Eles diferem no modo em que fragmentam o DNA genômico, montam a sequência na ordem correta e se mapeiam ou não os cromossomos antes de sequenciar. São eles: o método “BAC-to-BAC” (Shizuya et al.,

1992; Kelley et al., 1999) e o método “Shotgun Sequencing” (Venter et al., 1996; Venter et al., 1998). O primeiro é baseado no mapeamento prévio dos cromossomos antes do sequenciamento mais detalhado (base por base), o que facilita a montagem final da sequência, mas apresenta velocidade lenta. O segundo possui maior velocidade, é menos custoso e laborioso, mas apresenta (e apresentou principalmente na época do seu surgimento) problemas de montagem de sequência, especialmente em regiões repetitivas do DNA (Liu et al., 2009), uma vez que produz sequências aleatórias sem mapeamento prévio.

No sequenciamento “BAC-to-BAC” o DNA genômico é fragmentado em sequências de 150.000 pares de bases e clonado em cromossomos artificiais de bactéria (“Bacterial Artificial Chromosome” - BAC). Os flancos destes clones são sequenciados ou mapeados por marcadores e os clones são mapeados nos cromossomos de origem e agrupados em ordem sequencial. Os clones BAC são então fragmentados em sequências menores de 500 a 1.500 pares de bases, e clonados em plasmídeos apropriados, para sequenciamento detalhado, que proporciona a ordenação da sequência interna do BAC. No sequenciamento “Shotgun Sequencing” o mapeamento físico prévio é dispensado e o DNA genômico é fragmentado diretamente em pequenos pedaços de 2.000 a 10.000 pares de bases. Estes fragmentos são clonados em plasmídeos apropriados e sequenciados para posterior montagem “in silico” da sequência original.

O projeto genoma humano culminou na montagem do genoma com o uso de informações geradas pelas duas técnicas, reunindo o mapeamento prévio do método “BAC-to-BAC” com a velocidade de sequenciamento do método de “Shotgun Sequencing”. Até os dias de hoje, com as novas tecnologias de sequenciamento (ver texto abaixo), há quem defenda que nenhum dos dois métodos quando usados separadamente são eficientes. Desta forma, o método “BAC-to-BAC” continua sendo usado para auxiliar na montagem final das sequências em conjunto com o método de “Shotgun Sequencing” (Taudien et al., 2001).

Em meados dos anos 2000, outros métodos de sequenciamento apareceram. São os chamados métodos de sequenciamento de nova geração ou “Next Generation Sequencing” (Ansorge, 2009; Liu et al., 2009). Estas técnicas permitiram um aumento massivo no número de sequências gerado. O genoma humano, por exemplo, sequenciado em anos de trabalho, nestas novas plataformas pode ser sequenciado em alguns dias. Além disso, comparativamente os custos de sequenciamento também caíram drasticamente. As ferramentas computacionais de montagem dos genomas e conhecimento na área também evoluíram significativamente. Isto tornou possível a disponibilização pública de grande quantidade de sequências de genomas inteiros, de sequências de transcriptomas (conjunto de RNAs originados de tecidos de interesse) e de marcadores SNPs. Devido à facilidade de sequenciamento existem atualmente estudos nos quais genomas de indivíduos

da mesma espécie são sequenciados para análises comparativas. Neste contexto, não parece que estamos muito longe de uma realidade na qual não se usem mais marcadores moleculares para estudos de genômica aplicados ao melhoramento, e sim o que será usada em substituição, será a informação da própria sequência do genoma de cada animal alvo de estudo em programas de melhoramento.

Animais domésticos como aves, suínos, equinos, ovinos e bovinos tiveram o genoma sequenciado (Bai et al., 2012). Desta forma as plataformas novas de sequenciamento abriram caminho para estudos que objetivam o esclarecimento do funcionamento do genoma em termos de suas características estruturais e permitiu o mapeamento de grande quantidade de marcadores SNP viabilizando a tecnologia de genotipagem em larga escala realizada em lâminas de alta densidade de SNPs ou “chips de SNP” (ver abaixo no item seleção genômica).

## **SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES**

Marcadores podem ser importantes em programas de melhoramento para garantir maior ganho genético em função de maior acurácia na escolha dos melhores genótipos. Isto não significa que só o uso destes marcadores promove o ganho genético almejado, pois apenas a parte da variação genética é explicada pelos marcadores. Neste contexto, é possível combinar as informações moleculares e quantitativas para obter melhores resultados no melhoramento.

A eficiência dos programas de melhoramento pode ser aumentada com a seleção de animais cada vez mais jovens resultando em maiores ganhos anuais. O conhecimento de genes específicos que sejam potencialmente bons pode ser bastante vantajoso para selecionar as idades mais baixas. A genética quantitativa utiliza a informação fenotípica para ajudar a identificar os animais com bons genes e a genética molecular objetiva localizar e explorar genes que tenham efeito na expressão de características quantitativas.

A maioria das características de importância econômica são quantitativas e controladas por um grande número de genes. No entanto, alguns genes podem ter um efeito mais acentuado sobre a característica em questão. Apesar de o termo QTL se referir a genes de qualquer efeito, na prática ele é aplicado a genes de efeito maior (grande o suficiente para serem detectados e mapeados). Assim a variação genética total é determinada pela variação dos poligenes em conjunto com o polimorfismo dos QTLs. Com isso, as informações dos QTLs aumentam a acurácia da estimativa dos valores genéticos. Neste contexto, é desejável a combinação de informações de marcadores e do fenótipo.

Contudo, na seleção assistida por marcadores devem-se ponderar as duas fontes de informação. Por exemplo, para preferir um entre dois animais em

uma situação na qual um animal possui um marcador desejado e o outro não o possui, mas se apresenta fenotipicamente melhor, é necessário levar em conta: o tamanho do efeito do QTL, a frequência do alelo (se estiver próxima de ser fixada não acrescentará muito ao progresso genético), a taxa de recombinação entre o alelo e o marcador (a probabilidade de um animal herdar o alelo junto com o marcador). Quando bem aplicada, a seleção assistida por marcadores do tipo microssatélites ou similares (considerados de baixa densidade), pode aumentar a resposta à seleção. Mais adiante, no item “Seleção genômica” será comentada a seleção realizada com auxílio de marcadores do tipo SNP.

## **SELEÇÃO GENÔMICA**

A escolha de animais geneticamente superiores para uma ou mais características em uma população (raça, rebanho, grupamento genético), para serem pais da geração seguinte, tem se baseado em metodologias da genética quantitativa. Estas metodologias procuram prever o valor genético dos animais em função de informações de desempenho do próprio animal e de seus parentes, estimando a contribuição dos componentes genético, ambiental e interações entre ambos na manifestação do fenótipo. Nesse processo surge a questão do balanço entre a capacidade de predição (acurácia) desses componentes e o tempo para alcançar o volume de informações fenotípicas necessário para se obter boa avaliação. Assim, quanto mais observações de desempenho de um animal e de seus parentes, maior a acurácia das predições. Além disso, para características que se expressam somente em um sexo (ex: produção de leite, idade ao primeiro parto, perímetro escrotal) ou que são avaliadas após o abate, é preciso aguardar que um touro jovem produza descendentes em quantidade suficiente para que se possa avaliar eficientemente seu potencial genético, aumentando o intervalo de gerações e reduzindo o ganho genético anual.

Desde que surgiram se tem preconizado que os marcadores moleculares podem auxiliar a seleção, contribuindo para aumentar a confiabilidade das predições de valores genéticos. Estudos demonstraram que era possível associar variações de desempenho a regiões do genoma, que se denominaram locos de caracteres quantitativos ou QTLs. Apesar de terem contribuído para o conhecimento, desenvolvimento de metodologias estatísticas e, principalmente, para a integração de pesquisas nas áreas de genética quantitativa e genética molecular, a aplicação desse conhecimento no melhoramento genético foi limitada pelo alto custo da análise de marcadores e pelo baixo poder de detecção desses QTL. Tipicamente, ao final de um projeto de mapeamento de QTL, só se conseguia identificar as regiões genômicas que tinham maior efeito individualmente sobre a característica, e a soma de todos os efeitos dos QTL mapeados representava pequena fração da variação total.

Posteriormente, com a análise de marcadores moleculares do tipo polimorfismos de única base (SNP Single Nucleotide Polymorphism), presentes em alta densidade no genoma (em bovinos, em média um SNP a cada 3 kb) e passíveis de análise simultânea em arranjos de milhares de marcadores (genotipagem em larga escala), os “chips de SNP” (com até 770 mil SNPs em chips para bovinos), é que se deixou de falar em seleção assistida por marcadores para se pensar em seleção genômica.

A seleção genômica depende da avaliação de desempenho dos animais da “população de treinamento” sob seleção para identificar as regiões genômicas associadas às características de interesse e estimar seus efeitos sobre a média da população. A associação das regiões genômicas às características de interesse com informações de SNPs é conhecida como GWAS, do inglês “Genome Wide Association Studies”. Uma vez determinados os parâmetros para os marcadores, diferentes métodos podem ser utilizados para integração dos processos de predição de DEP tradicional (informações quantitativas) e genômicas (informações moleculares) (Garrick, 2011).

Uma das contribuições da seleção genômica é o aumento da acurácia da predição do valor genético sem comprometimento do intervalo de gerações, incorporando informações de regiões do genoma (coberta densamente por SNPs) associadas às características de interesse para o melhoramento. Além disso, há uma tendência para a diminuição do uso contínuo de testes de progênie e de obtenção de informações de fenótipo, que apresentam difícil mensuração. Isto por que já é realidade estimar com acurácia o valor genético de um touro sem o teste de progênie do mesmo e apenas com informações de marcadores SNPs de alta densidade no genoma.

Outra possível contribuição é a redução dos “efeitos carona” da seleção em caracteres geneticamente correlacionados, mas não desejados. Exemplos desses efeitos são bem conhecidos no melhoramento animal, tal como o aumento da frequência do gene responsável pela síndrome da carne pálida, macia e exsudativa em decorrência da seleção para musculosidade em suínos. À medida que se consegue identificar regiões genômicas que afetam individualmente cada uma das características correlacionadas, a informação pode ser utilizada para reduzir esse efeito. A seleção genômica permite ainda estimar efeitos não aditivos (epistasia, co-dominância, etc) e com isso pode trazer progressos genéticos em programas de melhoramento nos quais os ganhos chegaram ao máximo com a utilização de informações quantitativas.

As informações dos SNPs densamente distribuídos no genoma facilitam o monitoramento da manutenção da variabilidade preservando regiões genômicas que podem apresentar importância futura. Por último, com a associação entre os marcadores SNP e de regiões genômicas com os fenótipos estudados (premissa da seleção genômica) é possível mapear um alto número

de genes candidatos posicionais, uma vez que os SNPs apresentam densa cobertura do genoma. Com a descoberta de genes envolvidos com os fenótipos é possível esclarecer o funcionamento de vias metabólicas desconhecidas podendo assim contribuir para a determinação de técnicas de manejo que visam aumentar a produtividade do rebanho.

A acurácia da estimativa de parâmetros genéticos relacionados aos marcadores depende, entre outros fatores, do tamanho amostral e da herdabilidade da característica. Como no melhoramento tradicional, essas estimativas se alteram na medida em que a própria seleção promove mudanças na população. Assim, de tempos em tempos, há necessidade de refazer as estimativas incluindo indivíduos das gerações mais novas na “população de treinamento”, os quais precisam ter tanto informação de marcadores quanto de desempenho. A dependência de grande volume de registros fenotípicos pode ser um dos maiores desafios, como por exemplo, no caso da aplicação de seleção genômica em bovinos de corte, quando comparado à situação encontrada em bovinos leiteiros, em que a utilização de inseminação artificial é mais intensa, propiciando a avaliação mais acurada de touros em função do desempenho de suas progênes.

No Brasil há algumas iniciativas para o desenvolvimento e incorporação da genômica ao melhoramento de gado de corte. Desde 2007 a Embrapa financia um projeto multi-institucional no qual se pretende avaliar a variabilidade genética de representantes da raça Nelore para características de eficiência alimentar, qualidade da carne e temperamento. No projeto, que integra a rede de pesquisa Bifequali, três safras de progênes de 34 touros Nelore, escolhidos segundo critérios que propiciassem representar a máxima divergência genética (menor parentesco) e preço de sêmen compatível com a realidade do produtor, estão sendo avaliadas do nascimento até o abate. Ao final desse projeto 796 animais, incluindo os novilhos e seus progenitores (34 touros) foram mensurados e genotipados em larga escala em painéis de 770 mil SNPs. Os resultados são promissores, tendo sido possível identificar associação de dois genes, que não haviam sido estudados em bovinos, com a maciez da carne, além de identificar dezenas de SNPs associados à esse fenótipo (Tizioto et al., 2012, Regitano et al., 2012).

## **ASSINATURAS DE SELEÇÃO**

Além da possibilidade de identificação de regiões genômicas associadas com características de interesse por estudos de GWAS, nos quais são utilizadas informações fenotípicas e informações de marcadores SNP, a genotipagem de SNPs em larga escala permite a identificação de regiões do genoma que controlam características de interesse econômico e que estejam sob seleção através de estudos de assinatura de seleção. Vale destacar que

diferentemente dos estudos de GWAS, a busca por assinaturas de seleção não necessita de informações de mensurações fenotípicas.

A seleção artificial é capaz de promover a fixação de fenótipos desejáveis na população em um curto período de tempo, quando comparada à seleção natural (Innan & Kim, 2008). Além disso, este tipo de seleção resulta em alterações no genoma, que podem ser detectadas, por exemplo, por diferenças nos padrões de homozigose dos indivíduos de uma população, permitindo a identificação de regiões do genoma que controlam características sob seleção. A domesticação das espécies de interesse zootécnico está diretamente relacionada à seleção fenotípica de características, que diferiram ao longo do tempo, de acordo com a necessidade e o objetivo dos criadores. Sabe-se que a seleção pode alterar a frequência dos alelos de diversos genes que controlam as características de interesse e, conseqüentemente, de regiões neutras ligadas a eles. Para a busca de assinatura de seleção é necessária a análise estatística dos dados de genotipagem em larga escala de SNPs, avaliando principalmente, o rápido aumento relativo nas frequências alélicas dos locos adjacentes às mutações favoráveis que foram selecionadas ao longo do melhoramento da raça estudada (Qanbari et al., 2010). Em função do LD (desequilíbrio de Ligação), as mutações favoráveis tendem a ser transmitidas junto com os marcadores SNPs pelo efeito carona (Fay & Wu, 2000).

A identificação de regiões do genoma que controlam caracteres que estejam sob seleção, por meio da análise dos padrões dos dados genômicos (dados de genotipagem de SNPs), sem a necessidade de informações fenotípicas (como no caso de estudos de GWAS), auxilia na busca por esses genes (Simianer et al., 2010). De fato, a detecção de assinaturas de seleção delimita regiões do genoma funcionalmente importantes (Biswas & Akey, 2006) e permite a mineração de genes que tiveram papel importante nas mudanças genéticas recentes (Innan & Kim, 2008), auxiliando na anotação funcional dos genes que afetam as características produtivas (Wiener et al., 2003). Assim, a identificação das regiões que estão sob pressão de seleção artificial torna possível um melhor entendimento da evolução e da biologia de fenótipos específicos (Stella et al., 2010), podendo direcionar estudos para regiões ou grupos de genes específicos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A definição de quais características serão incorporadas aos programas de melhoramento genético deverá receber maior atenção em bovinos de corte, pois o mercado consumidor cada vez mais direcionará os caminhos da seleção. Assim, questões como qualidade do produto, bem estar animal e impacto ambiental da produção serão cada vez mais presentes na determinação dos critérios de seleção. Dessa forma, a avaliação de características fenotípicas

relacionadas à qualidade do produto, temperamento dos animais e eficiência da produção, em termos de degradação da terra e emissão de poluentes vem sendo preconizada nos países do hemisfério norte, sugerindo mudança de cultura nos programas de melhoramento dirigidos para caracteres de fácil avaliação como é o caso do desenvolvimento ponderal (Garrick, 2011). Além das características mencionadas anteriormente, a seleção genômica deve ter impacto sobre características de resistência a doenças infecciosas e parasitárias e outros estresses ambientais, tais como a termotolerância.

Além dos métodos citados acima outras abordagens experimentais têm sido empregadas no estudo da biologia dos animais domésticos. Entre elas está o sequenciamento de RNA mensageiro nas plataformas de nova geração. Este método permite qualificar e quantificar os níveis de RNA mensageiro de um dado tecido de interesse (por exemplo, músculo em estudos de qualidade de carne), proporcionando uma visão panorâmica da expressão gênica diferencial ao nível transcricional (de expressão de RNA mensageiro) entre animais ou grupos de animais. O conjunto de RNA mensageiro de um dado tecido de interesse é chamado de transcriptoma. O sequenciamento do transcriptoma gera informações que são usadas no esclarecimento do funcionamento gênico por trás das características de interesse, além de permitir a descoberta de novos SNPs em regiões expressas (transcritas) do genoma (Auer & Doerge, 2010; Cánovas et al, 2010). Estudos de perfil proteômico (Peddinti et al., 2008; Ang et al., 2011) de tecidos ou tipos celulares de interesse (análise do proteoma) também podem ser utilizados para gerar informações a cerca da expressão gênica ao nível protéico, qualificando e quantificando proteínas.

Neste contexto, o desafio existente na fronteira do conhecimento nos dias atuais está em trabalhar conjuntamente com os dados que informam a respeito de estrutura do genoma e suas variações (oriundos de sequenciamento de DNA e painéis de SNPs), e dados de transcriptoma e proteoma (que informam sobre a expressão gênica e o funcionamento do genoma), associando estes dados com medidas fenotípicas, com objetivo de gerar conhecimento aplicado na Biotecnologia Animal.

## LITERATURA CITADA

ANG, C.S.; BINOS, S.; KNIGHT, M.I.; MOATE, P.J.; COCKS, B.G.; MCDONAGH, M.B. **Global survey of the bovine salivary proteome: integrating multidimensional prefractionation, targeted, and glyco capture strategies.** J Proteome Res. Nov 4;10(11):5059-69, 2011.

ANSORGE, W.J. **Next-generation DNA sequencing techniques.** New Biotechnology, Vol 25, N 4, 2009.

AUER, P. L.; DOERGE, R. W. **Statistical Design and Analysis of RNA Sequencing Data.** Genetics, v. 185, n. 2, p. 405-U32, 2010.

BAI, Y.; SARTOR, M.; CAVALCOLI, J. **Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes.** Journal of Animal Science and Biotechnology v.3, n.8, 2012.

BISWAS, S.; AKEY, J.M. **Genomic insights into positive selection.** Trends in Genetics, v.22, n.8, p. 437-446, 2006.

CÁNOVAS, A.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A.; WICKRAMASINGHE, S.; MEDRANO, J.F. **SNP discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology.** Mammalian Genome, v. 21, n. 11-12, p. 592-598, 2010.

**dbSNP Home Page** [[www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)].

FAY, J.C.; WU, C. **Hitchhiking under positive Darwinian selection.** Genetics, v.155, p.1405-1413, 2000.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A.L.; BORTOLOSSI, J.C. **A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado e perspectivas.** R. Bras. Zootec. v.36, 2007.

GARRICK, D.J. **The nature, scope and impact of genomic prediction in beef cattle in the United States.** Genet Sel Evol. May 15;43:17, 2011.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução a Genética.** 9ª Edição. P.288-300 Tradução: P. A. Motta, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2009.

INNAN, H.; KIM, Y. **Detecting local adaptation using the joint sampling of polymorphism data in the parental and derived populations.** Genetics, v.179, p.1713-1720, 2008.

KELLEY, J.M.; FIELD, C.E.; CRAVEN, M.B.; BOCSKAI, D.; KIM, U.J.; ROUNSLEY, S.D.; ADAMS, M.D. **High throughput direct end sequencing of BAC clones.** Nucleic Acids Res. Mar 15;27(6):1539-46, 1999.

KINGHORN, B.; WERF AND, J.V.D.W.; RYAN, M. **Animal breeding: use of new technologies; a textbook for consultants, farmers, teachers and for students of animal breeding.** Sydney : Post Graduate Foundation in Veterinarian Science of the University of Sydney, 1999.

LIU, G.E. **Applications and case studies of the next-generation sequencing technologies in food, nutrition and agriculture.** Recent Pat Food Nutr Agric.; p.75–79, 2009.

MAHESWARAN, M. **Molecular Markers: History, Features and Application.** Advanced Biotech, Aug. 17-24, 2004.

MATUKUMALLI, L.K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; ALLAN, M.F.; HEATON, M.P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S.S.; SMITH, T.P.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL C.P. **Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle.** PLoS One, 4(4):e5350. Epub Apr 24, 2009.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J.M.; BURGESS, S.C.; MEMILI, E. **Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility.** BMC Syst Biol. Feb 22;2:19, 2008.

QANBARI, S.; PIMENTEL, E.C.G.; TETENS, J.; THALLER, G.; LICHTNER, P.; SHARIFI, A.R.; SIMIANER, H. **A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle.** Animal Genetics, 2010.

REGITANO, L. C. A., TIZIOTO, P. C., OLIVEIRA, P. S. N., MUDADO, M. A., MOURAO, G. B., BIFEQUALI, R. Associação Genômica com maciez de carne na raça Nelore In: IX Simpósio Brasileiro De Melhoramento Animal, 2012, João Pessoa-PB. Anais do IX Simpósio Brasileiro De Melhoramento Animal , 2012.

SCHLÖTTERER, C. **The evolution of molecular markers - Just a matter of fashion?** Nature Reviews Genetics. Jan, 63-69, 2004.

SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; KIM, U.J.; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIIRI, Y.; SIMON, M. **Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector.** Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 15;89(18):8794-7, 1992.

SIMIANER, H.; QANBARI, S.; GIANOLA, D. **Detection of selection signatures within and between cattle populations.** Em: **9th world congress on genetic applied to livestock production**, 1-6.8, Leipzig, Germany, 2010.

SMITH, L.M.; SANDERS, J.Z.; KAISER, R.J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C.R.; HEINER, C.; KENT, S.B.; HOOD, L.E. **Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis.** Nature Jun 12-18;321(6071):674-679, 1986.

STELLA, A.; AJMONE-MARSAN, P.; LAZZARI, B.; BOETTCHER, P. **Identification of selection signatures in cattle breeds selected for dairy production.** Genetics, v.185, p.1451-1461, 2010.

TAUDIEN, S.; STEUERNAGEL, B.; ARIYADASA, R.; SCHULTE, D.; SCHMUTZER, T.; GROTH, M.; FELDER, M.; PETZOLD, A.; SCHOLZ, U.; MAYER, K.F.; STEIN, N.; PLATZER, M. **Sequencing of BAC pools by different next generation sequencing platforms and strategies.** BMC Res Notes, Oct 14;4:411, 2011.

TIZIOTO, P.C., MEIRELLES, S.L., VENERONI, G.B., TULLIO, R.R., ROSA, A.N., ALENCAR, M.M., MEDEIROS, S.R., SIQUEIRA, F., FEIJÓ, G.L.D. SILVA, L.O.C., TORRES JUNIOR, R.A.A., REGITANO, L.C.A. **A SNP in ASAP1 gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed.** Meat Science, Volume 92, Issue 4, Pages 855-857, 2012.

VENTER, J.C.; SMITH, H.O.; HOOD, L. **A new strategy for genome sequencing.** Nature. May 30;381(6581):364-6, 1996.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; SUTTON, G.G.; KERLAVAGE, A.R.; SMITH, H.O.; HUNKAPILLER, M. **Shotgun Sequencing of the Human Genome.** Science Vol. 280 no. 5369 pp. 1540-1542, 5 June, 1998.

WIENER, P.; BURTON, D.; AJMORE-MARSAN, P.; DUNNER, S.; MOMMENS, G.; NIJMAN, I.; RODELLAR, C.; VALENTINI, A.; WILLIAMS, J.L. **Signatures of selection? Patterns of microsatellite diversity on a chromosome containing a selected locus.** Heredity, v.90, p.350-358, 2003.