

Aplicações da biologia molecular na reprodução animal

Use of molecular biology on the animal reproduction

Áurea Wischral¹, Manoel Adrião Gomes Filho²

¹Depto. de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil,

²Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, PE, Brasil

E-mail: aurea@dmv.ufrpe.br

Introdução

A biologia molecular é um termo já consagrado pelo uso, que compreende o estudo dos genes, sua estrutura, sua expressão e controle da expressão, portanto estuda o DNA e o mRNA (Étienne, 2003).

As biotecnologias utilizadas em reprodução animal, como a inseminação artificial, a transferência de embriões, fertilização in vitro e clonagem entre outras, obrigam o técnico a ter uma garantia do material genético que está sendo manipulado e mais ainda, certificar o produto.

O teste de paternidade está sendo uma exigência para muitas espécies e raças, bem como embriões sexados já estão disponíveis no mercado. Por outro lado, a tipificação de patógenos de um modo geral, incluindo os que estão diretamente relacionados com o aparelho reprodutivo, tornou-se exame de rotina em muitos laboratórios.

No aspecto da produção, marcadores moleculares para as mais diferentes características produtivas estão sendo estudados e muitos já aplicados na seleção de animais para a reprodução.

Há uma gama de aplicações das ferramentas utilizadas em biologia molecular que estão diretamente relacionadas com a reprodução animal. Nesta oportunidade iremos destacar as mais comuns e especialmente algumas que estamos desenvolvendo juntamente com nossa equipe de pesquisa na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Princípios básicos

Antes de passar a detalhar as aplicações das diferentes técnicas, iremos fazer uma breve revisão dos princípios básicos que norteiam os estudos em biologia molecular.

Os ácidos nucléicos, DNA e RNA, são a matéria prima para qualquer técnica, que será encontrada nos diferentes tecidos ou células, na dependência do objetivo a ser alcançado.

O DNA é mais comumente utilizado, especialmente nas pesquisas que envolvem a estrutura do gene. É também uma fonte que não sofre muita interferência do meio e pode ser obtida inclusive de indivíduos que já morreram.

O mRNA, por ser o ácido nucléico responsável pela síntese protéica, é a fonte de estudos relacionados com a expressão do gene. É encontrado no citoplasma das células e deve ser obtido do local onde se pretende avaliar a sua expressão, pois a função gênica pode ser diferente em cada tecido/célula específico.

A fita do ácido nucléico é composta por uma fila de nucleotídeos. Estes nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada (pirimídica ou púrica), ácido fosfórico e um açúcar (desoxirribose ou ribose). As bases pirimídicas são mais simples e são denominadas de citosina (C), timina (T) e uracila (U), as púricas são maiores e denominam-se adenina (A) e guanina (G). O DNA é composto basicamente pelas bases citosina, timina, adenina e guanina, enquanto que, no RNA, a timina é substituída pela uracila. O açúcar encontrado no DNA é a desoxirribose e no RNA é a ribose.

Para formar uma fita de DNA ou RNA, os nucleotídeos são interligados por ligações éster entre o ácido fosfórico e a hidroxila do açúcar. No caso do DNA, conforme descrito por Watson e Crick em 1953, a estrutura da molécula é em fita dupla, que são antiparalelas, complementares e em forma helicoidal. Para a formação da fita dupla as bases nitrogenadas de cada lado se ligam através de pontes de hidrogênio, sempre uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina. A seqüência destas bases, ao longo de uma fita, é característica de cada molécula de DNA e repercute na estrutura dos genes e posteriormente na transcrição para a formação de uma proteína.

O mRNA é uma molécula de fita simples, bem mais curta do que o DNA, pois suas bases representam apenas a seqüência correspondente a um gene específico. A ligação de suas bases com as de uma fita de DNA se dá por pontes de hidrogênio também, porém as uracilas se ligam às adeninas substituindo as timinas. Cada grupo de três nucleotídeos consecutivos do mRNA significa um códon, que corresponde a um aminoácido. Portanto a seqüência de códons de um mRNA representa a estrutura de uma proteína a ser formada.

Principais técnicas

Reação de polimerização em cadeia (PCR – polimerase chain reaction)

Dentre as técnicas utilizadas em biologia molecular, esta é a mais básica de todas, pois seu principal objetivo é amplificar uma seqüência conhecida do DNA a fim de obter uma quantidade suficiente para qualquer estudo.

A PCR foi desenvolvida em 1985 por K. Mullis e seus colaboradores, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Química em 1993 (Étienne, 2003). A técnica consiste em uma série de ciclos onde a fita de DNA é separada (desnaturada), copiada (anelamento) e refeita (extensão). A cópia é iniciada através de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região de interesse no DNA, e, através de uma enzima polimerase, os nucleotídeos são acrescentados formando uma nova fita a partir da fita molde (original). A cada ciclo este procedimento é repetido em escala geométrica.

Esta técnica ganhou maior desenvolvimento a partir da descoberta de uma polimerase estável e que não se desativava pelo calor, a partir de uma bactéria *Thermus aquaticus*, daí o nome Taq polimerase. Este microrganismo foi isolado em uma nascente quente no Parque Nacional de Yellowstone (USA) em 1968, por Thomas Brock (Brock e Brock, 1968). Em 1988 a enzima foi utilizada em ensaios de PCR por Saiki *et al.* e patenteada por Guelfand *et al.* em 1989. A técnica de PCR utilizando a Taq polimerase foi patenteada por Mullis *et al.* em 1990. Antes disso, a PCR era realizada com polimerases que se degradavam pelo calor e precisavam ser repostas a cada ciclo.

Basicamente a PCR necessita de um DNA molde, nucleotídeos, oligonucleotídeos iniciadores (primers), enzima (DNA polimerase) e uma solução tampão para a reação. Esta mistura é colocada em um termociclador que automaticamente modifica as temperaturas e repete os ciclos programados. Os ciclos iniciam com uma desnaturação das fitas de DNA, separando os nucleotídeos e gerando as fitas simples, na temperatura de 91-95°C por 1 minuto. Assim os primers podem localizar a área de anelamento para iniciar a cópia desejada. A temperatura de hibridação dos primers ao DNA molde varia de 53 a 65°C e dura 1 a 2 minutos. Na seqüência, a DNA polimerase irá adicionar nucleotídeos na seqüência, na etapa chamada de extensão ou alongamento. A temperatura ótima para a ação enzimática varia de 60 a 72°C e dura de 2 a 5 minutos. Estes 3 ciclos são repetidos de 30 a 40 vezes, chegando ao final com algo em torno de 100.000 a 1.000.000 de cópias do segmento desejado.

A amplificação de um gene pode ser obtida a partir do mRNA, pelo uso de uma enzima transcriptase reversa que cria uma fita de DNA a partir da seqüência do RNA, a este novo DNA chama-se de complementar (cDNA). Desta forma a PCR pode amplificar o segmento de cDNA e a técnica para isso é denominada de RT-PCR.

PCR – RFLP (restriction fragment length polymorphism)

O polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição permite comparar indivíduos e verificar a ocorrência de mutações que modificam os sítios de restrição. Nesta técnica são utilizadas enzimas que cortam o DNA em pontos específicos e geram fragmentos de tamanhos determinados em cada segmento do DNA. Após a amplificação por PCR de um segmento de interesse, o produto amplificado será submetido à digestão por enzimas de restrição (endonucleases). O padrão de fragmentos formados a partir desta ação enzimática poderá ser visualizado em um gel de eletroforese. Se ocorrer uma mutação em um local que altere a ação enzimática, o padrão das bandas será diferente.

Esta técnica também é utilizada para estudo de populações, proximidade genética entre indivíduos, etc.

Minissatélites/Microsatélites ou VNTR (variable number of tandem repeat)

As seqüências codificadoras variam muito pouco de um indivíduo para o outro, pois os produtos são muito semelhantes, mas as regiões que supostamente não são codificadoras possuem em sua estrutura regiões altamente repetitivas de uma seqüência de nucleotídeos. A diferença entre os minissatélites e os microsatélites (STR – *short tandem repeat*) está no tamanho das seqüências de nucleotídeos repetidos. Estas seqüências repetidas são chamadas de tandem e o número de repetições é variável de um indivíduo para o outro, sendo transmitido hereditariamente. Esta é base dos testes que visam à identificação de indivíduos em pesquisa de paternidade e da medicina forense.

Para estes testes são utilizados oligonucleotídeos que identificam as seqüências repetidas no DNA e as amplificam por PCR. O resultado é visualizado em gel de eletroforese pela comparação dos padrões de repetições dos indivíduos em estudo, levando em conta a herança paterna e materna.

Seqüenciamento de DNA

Para estudar a composição de um segmento de DNA é necessário fazer a identificação da seqüência de nucleotídeos. Isto tem sido feito pela técnica enzimática de Sanger, usando nucleotídeos normais e

didexosinucleotídeos trifosfato (ddATP), estes últimos foram alterados para parar a seqüência no momento em que são inseridos, durante a síntese de uma fita de DNA sobre o DNA molde.

São feitas 4 reações separadas, uma para cada base (A, C, G e T), e em cada reação ocorrerão inúmeras cópias da fita, onde serão incorporados os nucleotídeos normais e o didexosinucleotídeo aleatoriamente e portanto as cópias terão comprimentos diferentes. O alinhamento destas cópias das 4 reações resultará na seqüência dos nucleotídeos.

A leitura poderá ser feita manualmente após eletroforese em um gel de acrilamida ou em seqüenciadores automáticos que utilizam marcadores fluorescentes.

O conhecimento de uma seqüência de DNA permite identificar o gene contido naquele segmento da fita e estudar a proteína que será codificada a partir da transcrição para um mRNA.

Sexagem

A indústria da produção animal, ao longo do tempo, vem se especializando e buscando novas formas de agregar valor aos produtos comercializados. Neste sentido a sexagem de sêmen, embriões ou fetos tem se destacado. Também entre as aves este processo tem fundamento, especialmente naquelas que apresentam dimorfismo sexual tardio, como por exemplo, o avestruz.

A partir de 1910, com a descoberta dos cromossomos sexuais (X e Y), a pré-seleção do sexo passou a ser uma técnica científica e, ao longo dos anos, muitos métodos foram testados e sugeridos para a identificação do sexo genético.

Os métodos mais conhecidos envolvem a visualização de cromossomos sexuais a partir da realização do cariótipo (citogenética), que é um método de visualização dos cromossomos metafásicos através de colorações convencionais (Giemsa, Orceína Acética, reativo de Schiff, hematoxilina/eosina, etc.; Guerra, 1988). Nesta técnica busca-se visualizar o par cromossômico responsável pela determinação do sexo genético, no caso dos mamíferos X e Y, nas aves denominados de W e Z. No entanto esta técnica, apesar de ter boa acurácia, apresenta eficiência variável de 30% (Cotinot *et al.*, 1991) a 70 % (Van Vliet *et al.*, 1989), pois há necessidade de um alto número de células em divisão (10-15), o que nem sempre é obtido. Porém, pela sua precisão (normalmente de 100 %), esta técnica é valiosa e continuará sendo usada como método controle para testar a exatidão de outros métodos de sexagem (Van Vliet *et al.*, 1989).

Outra forma de sexagem, mais moderna e mais rápida que a citogenética, é a detecção de uma seqüência de DNA específica do cromossomo Y, após amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Luz *et al.*, 2000). Neste caso, o material de estudo é o DNA que pode ser obtido de um número reduzido de células e, posteriormente, amplificado para estudo do gene de interesse.

Atualmente, a sexagem pela técnica de PCR pode ser aplicada a vários tecidos ou células de embriões, fetos, líquido amniótico, sangue, penas e pelos (estes últimos devem ser obtidos com bulbo). Considerando que o sexo genético é determinado pela presença do cromossomo Y nos mamíferos, a detecção de um gene específico para este cromossomo é a base para a técnica.

Já foram descritos vários genes nesta situação, mas o SRY é o mais conhecido como fator de diferenciação testicular (TDF; Wilkens, 1982). São conhecidos vários outros genes importantes para determinação sexual dos mamíferos, como SOX9, AMH, WT1, SF1, DAX1 e DMRT1, por exemplo. Estudos revelaram que a determinação do sexo é o resultado da interferência conjunta desses genes, onde a expressão de cada um resulta na determinação sexual, variando entre os vertebrados, mas tendo sua seqüência e modo de expressão conservados (Bronwyn e Andrew, 2002).

Qualquer que seja o gene escolhido, deve ser específico do cromossomo Y e ter seqüência conhecida para que possa ser amplificado.

Teste de paternidade

O Melhoramento Genético Animal evoluiu, por meio de estudos de genes ligados a características morfológicas que são, geralmente, de fácil visualização e identificação (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Mas a simples visualização das características externas de um animal não é suficiente para se estabelecer vínculos genealógicos entre diferentes indivíduos. Muitas das características que se expressam fenotipicamente, ao longo de toda a vida do animal, não são estáveis, e muitas delas sofrem influência de fatores como idade, condições de saúde, além de outros fatores do meio ambiente. Assim, o melhoramento genético propicia avanços na obtenção de produtos de origem animal tais como carne, leite e pele, e isto se deve principalmente à seleção e cruzamento entre raças. No melhoramento genético, um dos principais objetivos em uma população é caracterizar reprodutores melhores e mais adaptados ao meio ambiente em que vivem, e a avaliação genética é realizada através de observações quanto ao desempenho de produção dos seus descendentes através do teste de progênie.

A utilização de recursos, como inseminação artificial e a transferência de embriões, que resultam no comércio expressivo de material genético (sêmen e de embriões), pode favorecer erros ou mesmo fraudes no registro genealógico (Gurgel, 1998), aumentando a demanda por resultados precisos da paternidade. Deve-se

considerar que a identificação incorreta de um animal em relação à progênie resulta em valores genéticos incorretos, os quais refletem em uma produção diferente daquela esperada. Enfim, estes, entre tantos outros dados, assinalam a dimensão que a problemática da determinação da genealogia (paternidade) pode assumir frente aos diferentes tipos de cultura animal.

Toda informação gênica de um organismo encontra-se armazenada, na forma de seqüências específicas de nucleotídeos, constituindo a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucléico). Contudo, os genes que são as seqüências que codificam informações para construção de proteínas (exons), estão intermediados por outras seqüências de nucleotídeos, cujo significado biológico não é totalmente conhecido (introns). Quando ocorre mutação, a chance de que esta atinja um gene é pequena, portanto, muitas destas mutações não alteram o fenótipo (mutação silenciosa), permanecendo por muito tempo numa população. Sendo assim, a porção do DNA que não transcreve está mais sujeita a acumular mutações, e constitui-se em uma grande fonte de variabilidade perante o conjunto de moléculas de DNA dos organismos (Lewin, 2001).

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, foi possível acessar regiões específicas do DNA, permitindo desenvolver formas mais eficazes para a comprovação de vínculos genéticos entre os indivíduos (Meadows *et al.*, 1995). A técnica de microssatélites ou STR (short tandem repeat), que são loci altamente polimórficos, codominantes, é a que apresenta o maior potencial de aplicabilidade quando se deseja a caracterização individual ou agrupamento de animais em espécies. Esse teste é feito por meio do uso da PCR, seguido de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida para visualização das bandas correspondentes aos fragmentos do DNA, o que torna possível a padronização dos protocolos entre laboratórios.

O Teste de Paternidade consiste na análise do patrimônio genético que um filho herdou de seus pais, procurando-se efetuar uma comparação entre os diferentes perfis de distribuição de seqüências específicas de nucleotídeos, em várias regiões de diferentes cromossomos; podendo estar incluídos alguns genes ou fragmentos dos mesmos. As regiões do DNA estudadas são especificamente selecionadas por possuírem grande diversidade de tamanho dentro de uma população (marcadores genéticos). Portanto, cada animal tem um padrão de DNA único, o que é extremamente significativo para determinação de paternidade biológica.

Em 2004, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) emitiu a Instrução Normativa nº 74, que regulamenta os Laboratórios que realizam testes de identificação genética em animais através do DNA. Neste documento estão estabelecidas as condições mínimas necessárias para um laboratório ser credenciado pelo MAPA, neste tipo de atividade, bem como são relacionados os lócus microssatélites mínimos para cada espécie, validados internacionalmente pela "*International Society of Animal Genetics*" (ISAG).

Diagnóstico de doenças

A presença de microrganismos causadores de doenças infecciosas pode atingir diretamente a produtividade (Cardoso *et al.*, 2000). Várias são as doenças infecciosas que afetam o desempenho reprodutivo de bovinos: brucelose, leptospirose, campilobacteriose e tricomoníase estão entre as mais freqüentemente associadas à distúrbios reprodutivos (Eaglasome e Garcia, 1992).

O diagnóstico de doenças por técnicas moleculares consiste em um grande avanço, seja na confiabilidade dos diagnósticos, uma vez que são altamente específicos, ou na sensibilidade, pois uma quantidade mínima de patógeno é suficiente para a identificação e amplificação do material genético para o diagnóstico.

Marcadores moleculares

Os animais da mesma espécie possuem o mesmo grupo de genes, ou seja, as informações para a síntese de proteínas do tecido muscular, tecido adiposo, produção de anticorpos, hormônios, etc. As diferenças de produção entre os animais são resultantes de pequenas mudanças que ocorrem nas seqüências de nucleotídeos que constituem a informação genética de cada indivíduo.

Na teoria, os genes mapeados, podem ser empregados como marcadores genéticos do DNA. Os maiores benefícios de se incorporar esses genes identificados nos programas de cruzamento são para as características mais difíceis de melhorar, especialmente, quando uma alta fração de variação genética é explicada pelos genes já conhecidos. Daí a importância dos testes de DNA combinados às técnicas reprodutivas, no sentido de reduzir o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, aumentar o ganho genético animal (Goddard, 2002).

Mapas genéticos estão disponíveis para várias espécies, proporcionando uma base genética para o desenvolvimento de programas de seleção assistida (Davis e DeNise, 1998).

Referências

- Brock TD, Brock ML.** Measurement of steady-state growth rates of a thermophilic alga directly in nature. *J Bacteriol*, v.95, p.811-815, 1968
- Bronwyn CM, Andrew HS.** Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*, v.124, p.447-457, 2002.



- Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, Cunha R.** Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR based detection assay. *Vet Microbiol*, v.72, p.241-250, 2000.
- Cotinot C, Gianquinto L, Fellous M.** Le déterminisme du sexe: son contrôle génétique. In: Thibault C, Levasseur MC (Eds). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Ellipses, 1991. p.205-219.
- Davis GH, DeNise SK.** The impact of genetic markers on selection. *J Anim Sci*, v.76, p.2331-2339, 1998.
- Eaglesome MD, Garcia MM.** Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet Bull*, v.62, p.743-775, 1992.
- Étienne J.** *Bioquímica genética e biologia molecular*. São Paulo: Santos Editora, 2003. 504p.
- Ferreira ME, Grattapaglia D.** *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2.ed. Brasília: Embrapa CENARGEM, 1996. p.220.
- Guelfand DH, Stoffel S, Lawyer FC, Saiki RK.** Purified thermostable enzyme, *United State Patent Number* 4.889.818, 26 dez 1989.
- Goddard ME.** Breeding wool sheep for the 21st century. *Wool Technol Sheep Breed*, v.50, p.349-58, 2002.
- Guerra M.** *Introdução à citogenética geral*. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.142,
- Gurgel SA.** *Análise do polimorfismo de Loci microssatélites em equínos da raça quarto de milha brasileiros*. 1998. 61f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- Lewin B.** Ciclo celular e regulação do crescimento. In: *Genes VII*. Porto Alegre: Artmed, 2001. p.799-829
- Luz MR, Watanabe YF, Ferro JA, Ferro MAT, Mauro SMS, Hossepian de Lima, VFM, Franceschini, PH.** Sexagem de embriões bovinos fecundados *in vitro* pela técnica de PCR multiplex. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.37, n.6, 2000. doi: 10.1590/S1413-95962000000600006.
- Meadows SJ, Binns MM, Newcombe JR, Thopson CJ, Rosedale PD.** Identical triplets in a Thoroughbred mare. *Equine Vet J*, v.27, p.394-397, 1995.
- Mullis KB, Erlich HA, Gelfand DH, Horn G, Saiki RK.** Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme. *United State Patent Number* 4.965.188, 23 out 1990.
- Saiki RK, Gelfand SS, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.
- Van Vliet RA, Gibbins AMV, Walton JS.** Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y- specific DNA probes. *Theriogenology*, v.32, p.421-438, 1989.
- Watson JD, Crick FHC.** Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, v.171, p.737-738, 1953.
- Wilkens H.** Embryologie und Anatomie des weiblichen Genitale. In: Grunert E, Berchtold M. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. Berlin: Verlag Paul Parey, 1982. p.25-48.
-