

Validação

Os marcadores moleculares chegaram...e com muita validação!

José Bento Sterman Ferraz e Henry Berger de Almeida

Introdução

Uma pergunta recorrente que sempre está na cabeça dos criadores: como selecionar reprodutores e matrizes? Para se responder a essa pergunta, é necessário, antes de mais nada, responder a uma pergunta crítica para o agro-negócio da pecuária de corte: para que servem reprodutores e matrizes?

Os reprodutores e matrizes são nossas "máquinas" e valem pelo número de produtos que elas produzem: **os nossos bezerros**. Se nossas máquinas valem pelos seus produtos e, para produzir esses animais, machos e fêmeas, contribuem com partes iguais na genética dos produtos, através de seus gametas (espermatozoides e óvulos), reprodutores e matrizes valem exatamente o valor de seus gametas. Essa resposta é essencial para que saibamos dar o valor correto ao material genético que adquirimos para nossas propriedades. Mas como fazemos para conhecer esse valor?

Avaliações genéticas

Infelizmente não é possível conhecer com precisão o valor genético dos animais. O problema é muito simples: o desempenho dos animais, também denominado de fenótipo é resultado do patrimônio genético que o animal possui, o chamado genótipo e, ainda, dos efeitos de meio ambiente, existindo ainda uma interação entre os efeitos de genótipo e de meio ambiente, já que alguns animais são superiores a outros em alguns ambientes, mas se tornam inferiores àqueles em ambientes diferentes.

Para facilitar o entendimento, podemos simbolizar o fenótipo com a letra **F**, o genótipo com a letra **G**, o meio ambiente com a letra **E** e a interação entre o genótipo e o ambiente com as letras **GE** e o desempenho dos nossos animais, seja qual for a característica estudada (peso à desmama, peso ao ano, produção de leite, circunferência escrotal, etc.) poderá ser colocado numa equação muito simples:

$$F = G + E + GE$$

Esta equação nos mostra que, infelizmente, o fenótipo que medimos nos animais não demonstra diretamente sua qualidade ou potencialidade genética. Essa produção ou medida **F** estará sempre influenciada pelo meio ambiente **E** e pela interação genótipo-ambiente **GE**.

Para complicar mais um pouco, a fração **G** pode ser dividida em três componentes: o valor aditivo dos genes (**A**), que todo gene tem, o desvio da ação individual dos genes, devido aos efeitos de dominância (**D**), que depende dos gametas que vêm do pai e de mãe, e dos efeitos de interação entre genes de loci diferentes (**I**). Assim, nossa equação, ficaria:

$$F = (A + D + I) + E + GE$$

No entanto, o único termo previsível dessa equação é o **A**, o que exige o uso de modelos estatísticos bastante complexos para, dado um conjunto de observações e informações de pedigree dos animais, podermos estimar esse valor de **A**.

Avaliar a qualidade genética de um animal nada mais é do que estimar o seu valor genético aditivo, ou seja, o **A** de nossa equação. Jamais conheceremos com precisão o valor que um animal tem como reprodutor, mas, através de metodologias diversas, é possível **estimar** esse valor. É, entretanto, necessário que a estimativa seja livre dos efeitos de meio ambiente e da interação genótipo-ambiente.

O valor genético dos animais depende da ação dos genes envolvidos na determinação das características, do número de informações a respeito dos animais avaliados (quanto maior este número, melhor a estimativa do valor genético), do parentesco entre os animais avaliados e das fontes de informação (quanto mais próximo o parentesco, maior a ênfase que a informação deve ter), além dos chamados efeitos permanentes de ambiente.

Por definição, o valor genético aditivo esperado (**Expected Breeding Value ou EBV**) de um animal é o valor que ele teria como reprodutor. Em última análise o **valor genético aditivo** (lembra-se do **A** de nossa equação?) é o que os rebanhos selecionadores vendem, pois expressa o potencial genético dos animais vendidos. Este valor mostra o quanto **a média** dos filhos de um

animal seria desviada em relação à **média** de todos os reprodutores em utilização, ou seja, produziram "a mais" ou "a menos" que os **a média** dos filhos dos outros reprodutores, que tenham sido utilizados na mesma população de animais onde estivemos estimando os valores genéticos. As **DEPs** (**D**iferenças **E**speradas de **P**rogênie) são, por definição, a fração de uma superioridade de progênie devidas aos efeitos dos genes do reprodutor.

Uma conta muito útil para entender a aplicação prática das DEPs: imagine que um touro A tem DEP de +10,0 kg para Ganho de Peso ao Sobreano e outro touro B tem DEP de -5,0 kg para a mesma característica. Os filhos do touro A serão 15 kg mais pesados que os do touro B, se ambos forem acasalados com vacas semelhantes. Multiplique esta arroba extra de peso vivo por filho por 30 filhos/ano e por 5 anos (vida útil do touro) e por 52% de rendimento de carcaça. O resultado é de cerca de 80 arrobas de peso no gancho, equivalente, a preços de dezembro de 2007, a cerca de R\$5.600,00, que é o valor da diferença, no bolso do criador, entre os valores de abate dos filhos dos touros A e B.

Este conceito de **DEP** é usado em geral pelos criadores de gado de corte, ao passo que os de gado de leite utilizam-se dos termos **PTA** (Predicted Transmitting Ability ou habilidade prevista de transmissão), **TA** (Transmitting Ability, ou Habilidade de Transmissão), ou ainda **PD** (Predicted Difference) ou **SC** (Sire Comparison ou Comparação entre Reprodutores). Em essência, todos estes termos estimam a metade do valor genético de um reprodutor.

As **DEPs** são uma potente ferramenta para auxiliar as decisões de seleção por parte dos pecuaristas. Utilizar-se dessa ferramenta no momento de decidir qual touro, ou sêmen, será adquirido, deve aumentar de maneira acentuada o progresso genético dos rebanhos.

Marcadores moleculares ou marcadores genéticos

Marcadores moleculares são frações do DNA - o ácido desoxirribonucléico, a molécula que armazena as informações genéticas de todos os indivíduos - que estão próximas a genes que condicionam características de interesse zootécnico; essas frações se tornam "marcadores" quando suas associações com essas características são comprovadas.

O uso dos marcadores moleculares é muito grande. Eles, basicamente, servem para:

- Aumento de eficiência produtiva;
- Teste de paternidade em pastagens que se utilizam de múltiplos touros;
- Seleção Assistida por Marcadores;
- Auxílio nos acasalamentos e descartes;
- Manejo Assistido por Marcadores:
 - Decisão de estratégia de compra e venda;
 - Decisão sobre o ponto ideal de abate;
 - Decisão sobre o sorteamento de grupos;
 - Decisão de estratégia de ordenha;
 - Uniformidade de lotes;
 - Bônus por sólidos totais.
- Acasalamentos dirigidos;
- Agregação de valor ao produto final;
- Ferramenta de rastreabilidade, entre inúmeras outras.

Os marcadores moleculares são ferramentas adicionais para melhorar a eficiência dos processos de seleção. Sua utilização nos permitirá ter mais segurança na escolha dos reprodutores. Ao selecionarmos reprodutores com DEPs semelhantes, escolheremos aqueles que têm em seu conjunto de genes, os marcadores associados a aumentos de produtividade. Isso será muito útil, ainda, nos casos em que a medição das características é difícil, como as medições de carcaça e qualidade de carne.

No caso do manejo, os marcadores moleculares poderão ser úteis ajudando a separar animais de grande potencial de crescimento, por terem marcadores favoráveis, daqueles com potencial mais limitado e para os quais deveremos ministrar dietas mais baratas, já que eles não têm potencial genético para ganhar tanto peso quando os anteriores. Experimentos com mais de 50.000 animais nos USA mostraram grandes diferenças, de quase uma arroba, entre grupos com genótipos favoráveis e desfavoráveis, para ganho de peso em confinamento, com dietas semelhantes. Os marcadores certamente trarão um importante aumento de velocidade de ganho genético.

A validação de marcadores moleculares

A Merial Saúde Animal, a maior empresa de Saúde Animal do mundo, desenvolveu uma nova divisão de serviços genéticos denominada IGENITY, que se dedica à aplicação de marcadores moleculares ao agronegócio da carne e leite bovinos. Deste desenvolvimento, resultaram painéis de marcadores moleculares para gado de leite e gado de corte, tanto *Bos taurus* quanto *Bos indicus*.

A Merial fez duas parcerias "de peso" no Brasil. Uma delas, com o Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (GMAB/FZEA), de Pirassununga, para que fossem validados cerca de 100 marcadores moleculares em características de crescimento e qualidade de carcaça e carne de bovinos da raça Nelore. Essa pesquisa, ora informada ao mercado, foi apoiada financeira e administrativamente pela prestigiosa Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto (FUNPEC-RP,).

A outra, com a Embrapa Gado de Leite, de Juiz de Fora, MG, para, validação de marcadores para bovinos leiteiros das raças Gir Leiteiro e mestiços Gir x Holandês ("Girolando"). Esse processo de validação utilizou amostras de aproximadamente 3.000 vacas em produção, arquivos de pedigrees de mais de 47 mil animais e dados de mais de 43 mil lactações nessas duas raças.

A maior dificuldade de um processo de validação é colher dados fenotípicos (de produtividade), confiáveis, além da necessidade de colher amostras para extração de DNA. É um enorme esforço e, para isso, as parcerias foram de extrema valia.

O processo de validação em si envolveu as etapas de:

- **Seleção dos rebanhos de pesquisa:** não basta apenas colher amostras de animais de determinadas raças e categorias; as populações de pesquisa foram criteriosamente selecionadas para que representassem de forma incontestável o rebanho de animais da raça Nelore e suas diversas vertentes, levando-se em conta as matrizes de parentesco, a acessibilidade das progênes, os fenótipos a serem avaliados e as amostras a serem coletadas.
- **Obtenção dos fenótipos:** medidos na população de animais dos quais é tirada uma amostra para extração do DNA (normalmente amostras de pelo com o bulbo piloso ou amostras de sangue);
- **Extração do DNA:** com o uso de técnicas sofisticadas e modernas de tecnologia e manipulação de material genético;
- **Genotipagem:** o DNA extraído é analisado para se conhecer qual das diferentes formas os animais carregam para centenas de marcadores. Nessa fase, os marcadores moleculares, ou genéticos, foram comparados com dezenas de medições realizadas nos animais. Muitas das medições são muito complicadas de serem feitas no cotidiano dos criadores, como, por exemplo, as análises de características de qualidade de carne e, para isso, sofisticadas técnicas e laboratórios foram utilizadas;
- **Análises estatísticas:** Os dados de fenótipos e genótipos sofreram análises estatísticas, com uso de poderosas ferramentas e pesquisadores qualificados da equipe do Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (GMAB/FZEA/USP). Esses trabalharam em sintonia com os pesquisadores IGENITY nos Estados Unidos. Esta análise revelou não somente os efeitos de cada marcador nas características, mas o efeito conjunto de grupos de marcadores;
- **Agrupamento dos marcadores moleculares segundo sua influência nas características e geração de painéis:** De posse das análises estatísticas, os pesquisadores desenvolveram os chamados **painéis ou perfis**, grupos de marcadores que explicam uma significativa porção da variabilidade dos animais em uma dada característica. Cada animal é classificado com escores, variando de 1 (escore mais baixo), a 10 (escore mais alto). Os escores estão relacionados com o potencial que cada animal tem para ter uma determinada produção. Por exemplo, ao

escolher um reprodutor com escore 5 no painel de maciez de carne, ele deverá deixar filhos que tenham carne menos macia que um reprodutor com escore 8.

A parceria Merial/GMAB-USP para a validação de marcadores genéticos na raça Nelore envolveu mais de 7.000 animais, em processos de validação de marcadores para características de crescimento, carcaça, qualidade de carne e longevidade de vacas.

A parceria Merial-Embrapa Gado de Leite envolveu aproximadamente 3.000 vacas das raças Gir Leiteiro e mestiços Gir x Holandês, de quase uma centena de rebanhos, onde marcadores ligados à produção de leite, gordura e proteína foram validados.

Agora, ao fim do processo de validação, foram desenvolvidos painéis de marcadores moleculares validados em milhares de animais, criados nos sistemas de produção brasileiros, com raças utilizadas no Brasil. Esses painéis já foram lançados no Brasil, com um diferencial da maior importância: os dados utilizados em seu desenvolvimento foram obtidos no Brasil, com animais aqui utilizados e nos sistemas de criação do Brasil. Os criadores e técnicos precisam ficar preparados para interpretar seus resultados, usando essa mais nova ferramenta de maneira adequada, aumentando a velocidade dos ganhos genéticos.

O desenvolvimento dos painéis IGENITY para a raça Nelore, no Brasil

Populações avaliadas

Validar marcadores moleculares na raça Nelore, no Brasil é uma tarefa difícil. O Brasil tem cerca de 150 milhões de animais Nelore ou "anelorados". Dentro dessa raça existe a variedade "mocho" e "padrão", animais "elite" e animais "comerciais", animais criados a pasto, semi-confinados ou até mesmo terminados em confinamento. O primeiro grande passo foi definir as populações onde esses marcadores moleculares seriam validados.

Foram definidas, para isso, uma série de "populações", que viessem a representar de forma incontestável o rebanho de animais da raça Nelore e suas diversas vertentes. Essas populações forneceram os fenótipos, amostras de DNA e abriram seus bancos de dados aos pesquisadores, reconhecendo a importância dos processos de validação.

Os painéis desenvolvidos

O processo de validação é um processo contínuo e que deverá continuar dinamicamente nos próximos anos, seja pela introdução de novos marcadores, seja pela incorporação de novas informações a respeito dos animais. As análises estatísticas comprovaram que muitos dos marcadores estudados foram importantes para explicar parte significativa da variação das produções dos animais e, portanto, deram suporte científico para o lançamento comercial de painéis ou perfis IGENITY para a raça Nelore, nas seguintes características:

- Peso ao sobreano;
- Peso de carcaça (característica relacionada com o valor dos animais no frigorífico);
- Área de olho de lombo (característica relacionada com a quantidade de carne na carcaça e rendimento de cortes primários);
- Espessura de gordura (característica relacionada com o acabamento de gordura das carcaças e com os prêmios pagos pelos frigoríficos);
- Maciez (característica relacionada com a qualidade da carne; o uso de touros que produzem filhos com carne mais macia poderá ajudar muito o Brasil a conquistar mercados que pagam melhores preços pela carne);
- Animais portadores de Infecção Persistente para Diarréia Viral Bovina (BVD);
- Verificação de paternidade.

Todos os painéis desenvolvidos traduzem para o produtor, em escores que variam de 1 a 10, o potencial genético daquele animal, reprodutor ou matriz, como transmissor de genes favoráveis (ou desfavoráveis) a uma dada característica.

O uso dos painéis IGENITY é ainda mais amplo, uma vez que podem identificar reprodutores ou

matrizes que transmitem doenças genéticas ou até mesmo para identificar a paternidade de animais filhos de lotes de touros múltiplos.

Porque utilizar marcadores molecular?

O uso de marcadores moleculares serve para ajudar o criador a identificar reprodutores e matrizes, ainda na idade jovem, que têm potencial para transmitir genes favoráveis para o melhoramento dos rebanhos, uma vez que serão alteradas as frequências desses genes, em detrimento de outros menos favoráveis ou até mesmo desfavoráveis, que existem na população. Os marcadores são poderosas ferramentas auxiliares dos processos de seleção. Juntamente com as DEP, os marcadores genéticos ou moleculares serão de grande valia para:

- Aquisição de touros, matrizes, animais de reposição e mesmo de lotes para engorda;
- Escolha de animais que deverão ser utilizados com maior intensidade, como doadores de sêmen ou oócitos (escolha de doadoras);
- Orientar acasalamentos de maneira mais objetiva;
- Classificação de animais em grupos de melhor desempenho, com alimentação diferenciada, numa nova ciência que está nascendo, a nutrigenômica;
- Identificação de reprodutores a serem utilizados em maior escala, para produzir carne de exportação, mais macia, com a cobertura adequada de gordura;
- Orientar a compra de novilhas de reposição e material genético, como sêmen e embriões;
- Antecipar em muito tempo a tomada de decisões, descartando-se antecipadamente animais não interessantes;
- Agilização do progresso genético.

No entanto, é preciso ressaltar que o fato de um reprodutor ter altos escores não garante que seus filhos terão desempenhos superiores naquelas características. Todos os demais cuidados com o ambiente oferecido aos animais devem ser observados, dentre os quais devemos destacar os adequados estado sanitário, alimentação, nutrição, manejo e instalações, para garantir o aumento de produtividade que o potencial genético, identificado pelos marcadores, oferece.

Próximos passos

O processo de validação dos marcadores deverá ser contínuo, trazendo um aumento do número de observações e, conseqüentemente, maior segurança nas associações estatísticas. Novos marcadores serão incorporados aos estudos já no próximo ano, assim como novas características serão analisadas.

Todo esse processo de validação deverá resultar, nos próximos anos, em informações de alta qualidade que deverão agilizar sobremaneira o progresso genético nos rebanhos. As estimativas de produção podem variar com a inclusão de novos marcadores e/ou com novas análises.

Com o avanço da genética, novos usos dos marcadores serão desenvolvidos, como, por exemplo, o uso para agrupar os animais em grupos de manejo, ou saber se um animal é transmissor de genes para mocho em dose simples ou dupla. Já se iniciaram os estudos de seqüenciamento do DNA dos touros mais representativos da raça Nelore, numa pesquisa de ponta que deverá resultar na descoberta de marcadores moleculares do tipo SNP (Single Nucleotide Polimorphism) específicos da raça Nelore, o que deverá trazer avanços ainda maiores para esse processo. Tanto o GMAB/FZEA/USP, quanto a Merial estão envolvidos nessas pesquisas. Pesquisas semelhantes já estão programadas para outras raças zebuínas, com grupos de pesquisadores dos Estados Unidos, em cooperação com o grupo que pesquisa a raça Nelore.

Conclusões

Os marcadores moleculares chegaram para ficar.

Eles são um conjunto de ferramentas de enorme valor para o criador aumentar a velocidade de ganho, pois, com seu uso, o responsável pela seleção dos animais conseguirá escolher com maior precisão os animais que servirão como reprodutores, ou seja, transmitirão os genes mais interessantes para as próximas gerações. Os marcadores moleculares se tornarão, rapidamente,



importante fonte de apoio ao manejo, quer pela identificação de paternidade, quer pela identificação de animais mais adequados aos diferentes tipos de manejo, ajudando a uniformizar os lotes.

Finalizando, os marcadores genéticos poderão ser utilizados num sem número de novas aplicações, que agregam valor ao produto e poderão causar um grande impacto na pecuária brasileira, colocando-a em nível semelhante ao dos principais países concorrentes do Brasil no mercado mundial da carne bovina a agregando valor aos produtos de nossa pecuária e facilitando a conquista e manutenção de mercados.