

APLICABILIDADE DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NA REPRODUÇÃO ANIMAL

APPLICABILITY OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN ANIMAL REPRODUCTION

¹MARTTOS, A. G.; ²COSTA, I. B

¹Graduanda em Medicina Veterinária – Faculdades Integradas de Ourinhos/FIO, Ourinhos, São Paulo, Brasil – correspondência: angelicamarttos@gmail.com

²Docente em Medicina Veterinária – Faculdades Integradas de Ourinhos/FIO, Ourinhos, São Paulo, Brasil

RESUMO

Por definição, a biologia molecular é uma derivação da ciência que estuda a biologia a nível molecular. A difusão do conhecimento de tal área tem permitido a identificação de genes em humanos, plantas e animais, com isso, as técnicas de biologia molecular estão sendo amplamente utilizadas na medicina veterinária, não apenas para diagnósticos de doenças ocasionadas por patógenos, mas também, na reprodução animal, especialmente pela precisão que as técnicas oferecem, sendo muito utilizadas para sexagem de embriões, identificação de raças, testes de paternidade e outras exigências relacionadas à reprodução animal.

Palavras-chave: Biologia Molecular. Biotecnologia. Reprodução.

ABSTRACT

By definition, the molecular biology is a derivation of the science that studies the biology at the molecular level. The dissemination of knowledge of this area has allowed the identification of genes in humans, plants and animals, as a result, the molecular biology techniques are being widely used in veterinary medicine, not only for diagnosis of diseases caused by pathogens, but also, in animal breeding, especially by the precision that the techniques offer, being widely used for sexing embryos, identification of races, paternity test and other requirements related to animal reproduction.

Keywords: Molecular Biology. Biotechnology. Reproduction.

INTRODUÇÃO

A biologia molecular se originou à partir da definição da estrutura molecular do DNA, em 1953, por Watson e Crick. Descobertas posteriores demonstraram que tal molécula era considerada elemento primordial e que com isso seria possível compreender as principais características dos seres vivos (PINHO, 2006).

As técnicas de biologia molecular, como a sexagem de embriões e o teste de paternidade se tornaram exigidas na área reprodutiva veterinária para diversas espécies e raças, a fim de maximizar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico.

Atualmente, é possível contar com inúmeros marcadores moleculares para as diversas características desejáveis e estes vêm auxiliando no desenvolvimento do melhoramento genético.

Há uma grande quantidade de técnicas moleculares que estão relacionadas com a reprodução animal. Nessa revisão serão citadas as técnicas mais comumente utilizadas.

DESENVOLVIMENTO

ADVENTOS BÁSICOS

O que se conhece atualmente por genes, deve-se a estudos realizados à partir das pesquisas de Mendel, no século XIX. O genoma reúne informações responsáveis por conferir as características básicas de um ser vivo, sendo encontrado no DNA. Portanto, essa molécula é a responsável por carregar o código genético em todos os seres vivos, exceto os vírus (EÇA et al., 2004).

Os genes são constituídos por ácidos nucleicos, formados por blocos estruturais elementares, conhecidos por nucleotídeos, onde cada nucleotídeo possui uma molécula de açúcar, sendo que no RNA (ácido ribonucleico) o açúcar é uma ribose e no DNA (ácido desoxirribonucleico) o açúcar é uma desoxirribose, uma de fosfato (com propriedades ácidas) e outra de nitrogênio (com propriedades levemente básicas). Porém o que difere o DNA do RNA é um nucleotídeo distinto, sendo o RNA formado por adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracila (U) e o DNA formado por A, G, C e T (timina), sendo G e A bases purinas, estruturas bicíclicas e C, T e U bases pirimidinas monocíclicas (SNUSTAD; SIMMONS, 2010; TURNER et al., 2004).

Em 1953, James Watson e Francis Crick, deduziram que a organização dos nucleotídeos dentro do DNA se dá pela ligação de um ao outro, em cadeia. Além disso, foi visto que as cadeias são mantidas unidas por atrações químicas fracas entre pares de bases, chamadas pontes de hidrogênio, onde A parecia com T e G com C, sendo assim as duas cadeias de uma molécula de DNA são complementares (EÇA et al., 2004; TURNER et al., 2004).

Além de apresentarem um nucleotídeo distinto, o RNA e DNA apresentam outra característica que os difere, sendo o DNA uma molécula bifilamentar (dupla hélice) e o RNA uma molécula unifilamentar (SNUSTAD; SIMMONS, 2010).

Assim, com a descoberta do DNA e do código genético, foi possível a manipulação intencional do DNA, através de técnicas da engenharia genética, além de propiciar incríveis avanços na área genética e da biologia molecular (FALEIRO et al., 2011).

TÉCNICAS

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION – REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE) E PCR EM TEMPO REAL

A PCR foi desenvolvida em 1985 por Kary Mullis, o qual recebeu o prêmio Nobel da Química por seu trabalho (WISCHRAL e GOMES FILHO, 2009). Essa técnica vem se destacando na medicina veterinária nas mais diversas áreas, como por exemplo, o diagnóstico de doenças infecciosas, aprimoramento da reprodução e identificação de doenças genéticas.

De acordo com Melo et al.,(2012), na área da reprodução animal, a técnica torna possível a identificação do sexo de embriões, entretanto, para que seja favorável comercialmente, precisa atender algumas exigências, tais como, ser barata, reproduzível e suficientemente rápida, permitindo assim avaliar, em pouco tempo, grande quantidade de embriões.

O método consiste em amplificar uma determinada sequência selecionada de DNA ou RNA, permitindo sintetizar em algumas horas, milhões de cópias da sequência de interesse. Para isso necessita de um DNA como molde, nucleotídeos, oligonucleotídeos, enzimas e uma solução tampão para a reação, sendo dividida em três etapas: na etapa 1, o DNA que contém a sequência que será amplificada é desnaturado por aquecimento a 92-95°C, por aproximadamente 30 segundos; na etapa 2, o DNA desnaturado é helicoidizado a um excesso de oligonucleotídeos, incubando-os juntos a uma temperatura de 50-60°C pelo tempo de 30 segundos; e na etapa 3, a DNA polimerase (enzima), é empregada para replicar o segmento de DNA entre os sítios complementares aos oligonucleotídeos (SNUSTAD; SIMMONS, 2010).

Baseada na PCR convencional há a PCR em Tempo Real, responsável por determinar medidas quantitativas nos ciclos da PCR, o que a torna mais rápida, específica e sensível, permitindo a quantificação do DNA durante as reações, além da amplificação simultânea, como ocorre na PCR convencional. Esta técnica revolucionou o processo de quantificação de DNA e RNA, uma vez que, de maneira precisa, quantifica os ácidos nucleicos, apresentando maior reprodutibilidade, por determinar valores na fase exponencial da reação, a partir de um ponto que detecta o ciclo em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, permitindo a quantificação exata e reprodutível utilizando a fluorescência (MELO et al., 2012).

MICROARRANJOS DE DNA

A metodologia é realizada inicialmente pela formação prévia de uma biblioteca genômica, onde, a partir do *pool* de fragmentos genômicos, coloca-se clones em uma microplaca de maneira automatizada, assim cada microplaca tem a representação de grande parte dos clones da biblioteca para determinado genoma (FALEIRO et al., 2011). Geralmente, para se criar uma biblioteca genômica, o DNA genômico é preparado por digestão com protease e extração de fase, sendo fragmentado por digestão ou agitação com enzimas de restrição, assim tem-se a variação de tamanho para o vetor escolhido (TURNER et al., 2004).

A técnica de microarranjo está amplamente requisitada em pesquisas da área animal, em especial nos estudos relacionados a características de herança complexa e/ou de baixa herdabilidade (ROSA et al., 2007).

Segundo ROSA et al. (2007), a utilização de microarranjos em bezerras pré-púberes e fêmeas adultas, é possível a partir da comparação do perfil de transcritos de oócitos e embriões em inicial estágio de desenvolvimento. Os resultados apresentaram número relevante de genes entre os modelos de estudo. Além disso, a técnica pode ser empregada para outras finalidades dentro da reprodução animal e outros ramos da zootecnia, como crescimento e metabolismo, resposta imune a doenças e parasitoses e resposta a fatores de estresse não infecciosos, que podem ser restrição alimentar, exposição a elementos tóxicos e outras condições ambientais que sejam desfavoráveis.

RFLPS (POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO)

Os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) podem acontecer dentro de sequências curtas, sendo reconhecidas por enzimas de restrição, fazendo com que o tamanho do fragmento gerado por cortar uma molécula de DNA com enzimas de restrição seja diferente para cada alelo, isto é chamado de RFLP (TURNER et al., 2004).

Os RFLPs foram uma das primeiras técnicas a ser desenvolvida e uma das mais utilizadas. As enzimas de restrição expressam, quando clivados, por meio da eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos do DNA, sendo observadas através da hibridização dos fragmentos com sequências homólogas, que pode estar marcado por radioatividade ou luminescência. Os RFLPs podem ter origem por mudanças de pares de bases, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou ainda diversidade natural nas populações, sendo as enzimas necessárias para identificação de *locus* polimórficos. A técnica apresenta expressão codominante, e como abrangem todo o genoma, há a possibilidade de ser associada com genes de interesse econômico (ABAD et al., 2014).

Segundo Abad et al. (2014), nos últimos anos a técnica vem sendo empregada em conjunto com a PCR (PCR-RFLPs), o que aumentou a sensibilidade do método, tornando mais fácil a identificação dos polimorfismos, sendo necessárias pequenas quantidades de DNA. Essa associação das técnicas é muito utilizada para caracterização de raças bovinas e em estudos de associação a caracteres produtivos. Entretanto, a técnica apresenta limitações, sendo o uso intensivo de mão de obra e o tempo necessário para a realização, os principais fatores limitantes.

QTL (QUANTITATIVE TRAIT LOCI)

O objetivo primordial da análise de DNA em animais domésticos está relacionado com características de interesse econômico, estabelecendo os genes que conferem as características fenotípicas (COUTINHO et al., 2010).

O QTL é uma das técnicas empregadas para identificação de genes de interesse e seu mapeamento está relacionado com a identificação de determinadas regiões cromossômicas relacionadas a características de interesse econômico,

também chamado de loci de interesse quantitativo, porém isso depende do desenvolvimento de mapas genéticos saturados pela utilização de marcadores moleculares polimórficos e uma estrutura populacional que apresente a característica de interesse (COUTINHO et al., 2010; MILAZZOTTO et al., 2008).

Atualmente é possível a identificação de genes determinantes que estão relacionados com o desenvolvimento muscular, qualidade da carne e rendimento do leite, por exemplo. Porém, a identificação de regiões no genoma que apresentem os genes de interesse, pela utilização do QTL, apresenta limitações, como o alto custo, pela necessidade em ter uma população experimental com no mínimo duas gerações e a realização de genotipagem e fenotipagem completa dos indivíduos, o custo de genotipagem para marcadores moleculares, a eficácia da técnica, que pode ser variável, a herdabilidade da característica de interesse e a principal restrição é que, como a técnica indica uma região cromossômica específica, onde se encontra os genes de interesse, pode também conter diversos outros genes (COUTINHO et al., 2010).

SEQUENCIAMENTO DE DNA

A técnica baseia-se na teoria de que organismos com características fenotípicas distintas podem expressar genes relacionados às características, além de obter a sequência de genes no genoma e ser a base para a construção de plataformas de microarranjos, criadas para se analisar padrões de expressão gênica em larga escala (COUTINHO et al., 2010).

O método também auxilia no diagnóstico molecular, pois permite o conhecimento de sequências gênicas específicas, podendo, através de programas de bioinformática, ser comparados e assim, oligonucleotídeos específicos podem ser sintetizados e, assim, permitir a amplificação específica de fragmentos que podem identificar de maneira específica animais, plantas e patógenos (FALEIRO et al., 2011).

Entretanto, como o QTL, o sequenciamento de DNA apresenta limitações, pois os microarranjos obrigam o conhecimento da sequência do gene impresso na plataforma, limitando assim, a disponibilidade de arranjos para a espécie de interesse (COUTINHO et al., 2010).

MINISSATÉLITES (VNTR- VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS) E MICROSSATÉLITES (SSR- SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

O DNA repetitivo no genoma de eucarióticos consiste em sequências curtas, em disposição em tandem de centenas de cópias, ficando conhecida como DNA satélite, por terem sido identificadas como bandas satélite (TURNER et al., 2004).

Os VNTRs são marcadores formados por repetições de DNA em sequência, sendo localizados em regiões controméricas e teloméricas nos cromossomos. A técnica consiste em unidades repetidas de 15-100 nucleotídeos, sendo observada em um *locus* que pode ser repetido em até 50 vezes, porém, o alto custo para sua realização é um fator limitante. As repetições que os formam, servem como base do *fingerprinting* de DNA, técnica empregada na identificação de pessoas e seus parentescos (TURNER et al., 2004, 27 - 29; ABAD et al., 2014).

Os SSRs são marcadores que se encontram no genoma de eucariontes, sendo utilizados nos estudos relacionados com a biodiversidade.

De acordo com Abad et al. (2014), a técnica consiste em pequenas sequências que possuem de um a cinco pares de bases, repetindo-se em série em um número variável, de uma dezena a uma centena de vezes. Além disso, são necessários dois pares de oligonucleotídeos específicos, sendo complementares às sequências que estão ao redor dos microssatélites.

Entretanto, por se encontrarem distribuídos no genoma e os nucleotídeos repetidos serem poucos, são mais utilizados que os minissatélites, fazendo com que a PCR se torne mais eficiente.

MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são utilizados para identificar a variação genética entre indivíduos, podendo ser utilizado para associar uma característica de interesse, sendo amplamente utilizado em decorrência de diversas características de interesse (Polido et al., 2012).

Os diferentes tipos de marcadores disponíveis se diferenciam de acordo com a tecnologia empregada, com o objetivo de revelar a variabilidade a nível de DNA, além de proporcionar variação quanto à habilidade de identificar as diferenças entre

indivíduos, facilidade na utilização, custo, possibilidade de repetição e consistência (MILACH, 1998, 14 - 17).

SEXAGEM DE EMBRIÕES

A sexagem de embriões auxilia no desenvolvimento do melhoramento genético em animais com alto valor comercial, com isso o criador pode, ainda na fase embrionária, escolher o sexo desejado.

A sexagem fetal em equinos é realizada através da técnica de PCR, por fornecer resultados sensíveis e confiáveis, visto que a diferenciação sexual é estabelecida pela presença ou não do cromossomo Y e pela expressão do gene SRY, responsável por codificar a proteína TDF (fator de determinação testicular), que agindo nos tecidos gonadais gera: atrofia dos ductos de Muller, desenvolvimento dos testículos, formação dos túbulos seminíferos, formação das células de Leydig e produção de testosterona (OLIVEIRA et al., 2014).

Segundo Passaglia; Chaves (2007), o Brasil apresentou, nos últimos anos, uso crescente da sexagem em animais de genética superior a partir da amplificação da região repetitiva específica do cromossomo Y, seguida da eletroforese, sendo estes os métodos mais utilizados comercialmente.

TESTE DE PATERNIDADE

Testes de paternidade se baseiam na exclusão genética, sendo assim, todos os alelos do DNA presentes na prole precisam se encontrar na mesma posição dos alelos dos pais, encontrando a origem materna e em seguida a paterna (VIEIRA et al., 2011).

Segundo Abad et al. (2014), a utilização de marcadores moleculares propiciou avanços no melhoramento genético, pois auxiliou na identificação de indivíduos e essa prática se tornou essencial para a comercialização de animais, em especial, àqueles com significativo valor zootécnico, assim como para, caracterização de populações, estudos de biodiversidade e seleção assistida. A técnica de PCR é amplamente empregada, em decorrência da necessidade de pouco material e curto espaço de tempo para obter o resultado. Por outro lado, o emprego de marcadores

moleculares, permite a automatização do processo, favorecendo a utilização de outras técnicas como os microssatélites.

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS

A biologia molecular é comumente utilizada para diagnosticar doenças, em especial aquelas causadas por patógenos. Segundo Queiroz (2008), a PCR tem se mostrado bastante útil para identificação de espécies de *Leishmania*, possibilitando a detecção de cães assintomáticos e cães soronegativos.

Técnicas moleculares também são empregadas na identificação da Erliquiose, Pseudorabia, entre outras doenças, através da técnica de PCR, no estado latente ou de replicação, auxiliando no controle de doenças (FONSECA JÚNIOR et al., 2010; ALVES et al., 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de serem eficazes e quase sempre seguras, muitas técnicas de biologia molecular se mostram com uso limitado na rotina veterinária devido ao alto custo que apresentam e, muitas vezes pela necessidade de se ter conhecimento prévio da sequência de gene da espécie de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A.C.A; LOPES, F.A; PINHEIRO, J.W; MOTA, R.A. Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas em bovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.1, p.10-18, 2014.

ALVES, L.M; LINHARES, G.F.C; CHAVES, N.S.T; MONTEIRO, L.C; LINHARES, D.C.L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.1, p.49-54, jan./mar. 2005.

EÇA, L.P et al. **Biologia molecular**: Guia prático e didático. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

FALEIRO, A.M. **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.19; 31-52. 2011.

FONSECA JÚNIOR, A.A; CARMAGOS, M.F; D'AMBROS, R.M.F; BRAGA, A.C; CIACCI-ZANELLA, J; HEINEMANN, M.B; LEITE, R.C; REIS, J.K.P. Diagnóstico e

genotipagem do vírus da pseudorraiva por nested-PCR e análise de restrição enzimática. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p.921-927, abr, 2010.

MELO, A.N; SANTOS JÚNIOR, E.R; ADRIÃO, M; WISCHRAL, A. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. **Revista Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.105-112, abr./ jun. 2012.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.5, p.14-17, mar./abril. 1998.

MILAZZOTTO, M.P; VISINTIN, J.A; ASSUMPÇÃO, M.E.O.d'. Biotecnologias da reprodução animal: biotecnologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife- PE, v.11, p.145-148, abril – 2008.

OLIVEIRA, R.A; YAMIM, R.S; PIVATO, I; RAMOS, A.F. Sexagem fetal em equinos. **Revista Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.37-42, jan./mar. 2014.

PASSAGLIA, P.G; CHAVES, A.H. Sexagem de embriões bovinos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.37, p.30-35, 2007.

PINHO, M.S.L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Revista Brasileira Coloproct**, v.26, n.3, p.331-336, jul./set., 2006.

POLIDO, P.B; FERREIRA, F.G; ALBERTON, O; SOUZA, S.G.H. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v.15, n.2, p.161-169, jul/dez. 2012.

QUEIROZ, N.M.G.P. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-TESTE**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

ROSA, G.J.M; ROCHA, L. B; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Botucatu- SP, v. 36, p.185-209, 2007.

SNUSTAD, D.P; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**. 4ª ed.- [Reimpr.]- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TURNER, P.C; McLENNAN, A.G; BATES, A.D; WHITE, M.R.H. **Biologia molecular**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

VIEIRA, J.N; TEIXEIRA, C.S; KUABARA, M.Y; OLIVEIRA, D.A.A. Importância de teste de DNA para verificação de parentesco em Búfalos (*Bubalus bubalis*). **PUBVET**, Londrina, v.5, n.2, ed. 149, art. 1004, 2011.

WISCHRAL, A; GOMES FILHO, M.A. Aplicações da biologia molecular na reprodução animal. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p.59-63, dez. 2009.