



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0506043-5 A**

(22) Data de Depósito: 12/07/2005  
(43) Data de Publicação: 13/03/2007  
(RPI 1888)



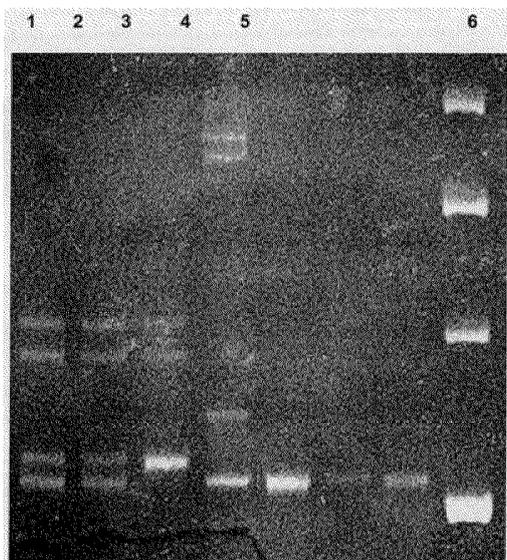
(51) Int. CI<sup>7</sup>.:  
C12Q 1/68  
G01N 33/74  
A01K 67/02

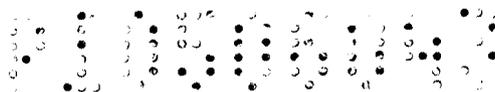
(54) Título: **PROCESSO PARA AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE ANIMAIS**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS), Universidade Federal de Santa Maria (BR/RS), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (BR/DF)

(72) Inventor(es): Tania de Azevedo Weimer, Sabrina Esteves de Matos Almeida, Clara Sabrina Steigleder Walter, João Francisco Coelho de Oliveira, Márcia Silveira Netto Machado, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Jairo Pereira Neves, José Carlos Ferrugem Moraes, Cláudio Alves Pimentel

(57) Resumo: "PROCESSO PARA AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE ANIMAIS". A presente invenção descreve um processo para avaliação genética do desempenho produtivo de animais com auxílio de marcadores genéticos o qual envolve uma etapa de determinação do DNA dos animais em teste, mais especificamente de bovinos, dos alelos presentes para um marcador específico de DNA associado aos genes da Leptina, LH, FSH, IGF, GNRH, inibina e de seus receptores; é também descrito um processo de seleção de embriões para a criação de animais, mais precisamente à criação de gado, com desempenho reprodutivo e ganho de peso melhorados.





## Relatório Descritivo

### Processo para Avaliação e Seleção de Animais

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção diz respeito a um processo para avaliação genética do desempenho produtivo de animais com auxílio de marcadores genéticos.

Mais especificamente, a presente invenção diz respeito a um processo para avaliação genética no desempenho produtivo de animais fazendo uso de polimorfismos do DNA nuclear de bovinos, esses polimorfismos constituindo  
10 um grupo de marcadores que podem ser utilizados para auxiliar a seleção dos melhores exemplares bovinos do ponto de vista produtivo e reprodutivo.

O invento encontra sua principal aplicação na indústria de sêmen, embriões e oócitos os quais podem indicar, em seus catálogos, gametas e embriões resultando na produção de animais potencialmente mais eficientes.

15

#### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

Com os altos custos associados à criação de bovinos e inseminação artificial, cada vaca obtida por um criador para a produção de laticínios e/ou carne representa um grande investimento de tempo e dinheiro.

20 De acordo com os métodos tradicionais, os descendentes de um reprodutor são estudados e as habilidades transmitidas são, então, usadas para orientar as descendências futuras.

A seleção baseada no fenótipo global envolve a criação de muitas vacas e estas devem procriar a fim de serem avaliadas quanto a sua capacidade de  
25 produção. No entanto, há variações genéticas que não são consideradas quando a seleção é feita unicamente com base nessas características. Deste modo, há uma grande necessidade de selecionar o gado bovino não somente sob o aspecto de características fenotípicas, mas também sob o aspecto de critérios genotípicos favoráveis.

30 A capacidade de acompanhar um genótipo favorável envolve a identificação de um marcador de DNA relacionado a um efeito genético

principal. O marcador pode estar ligado a um único gene com um efeito principal ou ligado a um certo número de genes com efeitos aditivos.

Marcadores de DNA têm várias vantagens: a segregação é fácil de medir e é destituída de ambigüidade, e os marcadores de DNA são co-  
5 dominantes, isto é, animais heterozigotos e homozigotos podem ser identificados distintamente.

Uma vez que um sistema de marcadores é estabelecido, decisões de seleção podem ser feitas mais facilmente, já que os marcadores de DNA podem ser testados em qualquer momento após a coleta de sangue de um  
10 filhote, ou mesmo de um embrião.

Esta tecnologia é denominada seleção assistida por marcadores (Marker Assisted Selection) ou "MAS". A "MAS" pode, portanto, reduzir o custo da seleção dos melhores animais, visto que jovens animais, para os quais os testes genéticos revelam ausência de marcadores desejáveis, não serão  
15 levados a procriar, e os filhotes podem ser avaliados imediatamente após o nascimento, quanto à presença ou ausência do marcador. Em geral, a técnica básica de MAS inclui extração de DNA, amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase, uma etapa opcional de clivagem com enzimas de restrição ou hibridização com sondas marcadas, separação dos fragmentos  
20 resultantes por eletroforese e, finalmente, análises de correlação dos polimorfismos identificados com características de produção para identificar um marcador que possa auxiliar a seleção animal.

A técnica de reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction" ou PCR) que amplifica o fragmento genético de interesse, acelera a  
25 análise, já que:

- 1) menos material genético é necessário;
- 2) a etapa de hibridização para detectar fragmentos de genes específicos é eliminada;
- 3) o custo de alguns materiais radioativos é eliminado, o que reduz os  
30 custos totais da análise; e
- 4) as etapas posteriores da análise são muito rápidas.

Estas técnicas já possibilitam identificar em animais, mais especificamente em bovinos, marcadores para a deficiência na adesão de leucócitos, para os genes da prolactina e da kappa caseína, sendo estes dois últimos associados com níveis elevados de produção de leite, e variantes de DNA mitocondrial associadas ao melhor desempenho na produção de leite.

Assim, a pesquisa de marcadores genéticos polimórficos, que estão espalhados por todo o genoma, tem possibilitado aos geneticistas moleculares mapear o que Edwards (Edwards et al. *In Genetics* 115:113 (1987)) definiu como locos para características quantitativas ou QTL – “quantitative trait loci”. Os QTL são genes que possuem efeito aditivo e controlam, em certo grau, as características fenotípicas que se distribuem, continuamente, em uma família de indivíduos, bem como em uma população de famílias de indivíduos.

Um polimorfismo de DNA é uma variação alélica em uma seqüência específica do genoma. Entre estes, os RFLPs (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*) se caracterizam por apresentarem variação em sítios de reconhecimento por enzimas de restrição, que são enzimas que clivam o DNA em pontos específicos. Assim, dependendo da presença ou ausência do sítio de restrição, são gerados fragmentos diferentes após a incubação de uma seqüência de DNA com uma enzima específica, permitindo identificar diferenças entre indivíduos de uma população. Estes grupos individuais podem então ser comparados para determinar se uma variante do gene está associada com um fenótipo ou característica específica.

Conforme D. Tautz em “Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences “ (“DNA Fingerprinting: State of The Science”, editado por Pena, S.D.J.; Chakrabarty, J.T.; Epplen, J.T. et al, Switzerland, Birkhäuser Verlag Basel, 1993, p. 21-28), um outro grupo de marcadores genéticos, denominados microssatélites ou STRs (“Small Tandem Repeats”), compreendem repetições de seqüências de nucleotídeos de comprimento e composição variável, ocorrendo desde poucas até milhões de vezes, e distribuídos ao acaso no genoma.

A unidade de repetição dos microssatélites varia de 1 a 6 bp e estes

marcadores são altamente variáveis entre indivíduos e populações, estimando-se que ocorra um STR a, aproximadamente, cada 50.000 pares de bases.

Irregularidades na DNA polimerase durante replicação e recombinações desiguais podem resultar em ganho ou perda de unidades de repetição, aumentando o número de alelos segregantes numa população. Isso significa que, usualmente, os microssatélites possuem vários alelos que diferem no número de unidades de repetição. Por exemplo, um microssatélite caracterizado por  $(CA)_n$ , resultaria em alelos com diferentes comprimentos de repetição, tais como  $(CA)_2$ ,  $(CA)_9$ ,  $(CA)_{10}$ ,  $(CA)_{11}$ ,  $(CA)_{12}$ , etc .

Usando iniciadores ("primers") capazes de hibridizar com regiões adjacentes a um microssatélite associado a um determinado gene e técnicas de PCR padrão, produtos de amplificação de diferentes comprimentos podem ser gerados, a depender do número de unidades de repetição dos alelos específicos.

Existem evidências de que seqüências curtas repetidas em "tandem" como os microssatélites tendem a formar Z-DNA, possibilitando a ligação de proteínas transcricionais. Desta forma os microssatélites atuariam na regulação de genes proximalmente ligados, sendo que o efeito não seria alelo específico, mas dependente de um limiar no tamanho da repetição, tal como citado por D.E. Comings (D.E. Comings et al. em "Genetic variants of the human obesity (OB) gene; association with body mass index in young women, psychiatric symptoms and interaction with the dopamine D2 receptor (DRD2) gene". *In Mol. Psych.*, 1:325-355, 1996), de modo que tanto alelos grandes como pequenos poderiam interferir na regulação gênica, levando a um aumento ou a uma redução de sua expressão.

Inúmeros microssatélites têm sido descritos para bovinos, conforme R.Z. Ma (R.Z. Ma et al., "A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome" *in J. Hered.*, 87:261-271, 1996) e Heyen (D.W.Heyen et al., "Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing" *in Animal Genetics*, 28:21-27, 1997). Por serem bastante polimórficos, os microssatélites podem ser úteis para

identificação e mapeamento de locos para características quantitativas (QTLs), permitindo, também, através da associação destes marcadores com QTLs, a seleção precoce de indivíduos portadores de uma melhor performance produtiva. A este respeito, vide igualmente o artigo escrito por G.W. Montgomery e B.P. Kinghorn, ("Recent developments in gene mapping and progress towards markers-assisted selection in sheep", *in* Aust. J. Agric. Res., 48:729-741, 1997), onde é enfatizada a redução do tempo requerido para a seleção de animais mais produtivos.

5 O documento de patente americana US 5.374.523, depositado em  
10 10/08/1992, descreve um teste para determinar a presença, em material genético bovino, de um marcador localizado no gene somatotropina, indicativo de uma característica hereditária de produção acentuada de leite. A patente também ensina um método para determinar o potencial genético de um bovino em relação à característica de produção acentuada de leite. O marcador é o  
15 resultado de um polimorfismo na seqüência do gene da somatotropina resultando em duas formas da proteína, na população bovina. O teste também é útil para analisar o potencial genético de touros e para a seleção de touros de características superiores para inclusão em um programa de criação de gado. De acordo com o teste descrito, na patente US 5.374.523, o gene da  
20 somatotropina bovina é identificado a partir de material genético bovino exposto a uma enzima de restrição, que produz fragmentos do gene de comprimento variável; os fragmentos de restrição são separados por eletroforese ou HPLC e comparados para identificar se os indivíduos possuem ou não o marcador desejado. Se o teste é positivo o indivíduo pode ser cogitado para sua inclusão  
25 no programa de produção, e se o teste é negativo, o indivíduo pode ser descartado.

O documento de patente americana US 5,292,639, depositado em 24/04/1992, ensina avaliar características de interesse econômico, em bovinos, através de polimorfismos de DNA. A técnica utilizada envolve a avaliação das  
30 características estudadas através do DNA mitocondrial, o qual tem ligação com a herança exclusivamente materna, de modo que o emprego de variações

nesta molécula permite somente a seleção matrilinear. Ao contrário, a presente invenção propõe a utilização de polimorfismos em marcadores do DNA nuclear que permite a seleção tanto pela linhagem materna quanto pela paterna, o que representa um aperfeiçoamento no processo de avaliação genética, pela maior rapidez e eficácia.

O documento de patente americana US 5,614,364, depositado em 16/05/1994, ensina um processo de avaliação genética de gado testando um indivíduo quanto à presença de um marcador genético que indica produção melhorada de leite, incluindo rendimento e composição do leite.

O documento de patente americana US 6,410,227, depositado em 12/12/1997, descreve processos de seleção de suínos que possam produzir maior número de crias com base na identificação de alelos de OPN (osteopontina) presentes em uma amostra do DNA do genoma dos suínos. Também são providos kits para utilizar no processo de seleção.

O pedido de patente brasileiro PI 9710875, depositado em 30/06/1997, descreve processos para identificação de marcadores de porcos e processos de seleção de porcos para que se consiga as maiores ninhadas possíveis.

O pedido de patente brasileiro PI 9912460, depositado em 26/07/1999, descreve marcadores genéticos no gene MC4R, de receptor de melanocortina-4 de porco, os quais são associados com o teor de gordura, taxa de crescimento e consumo de alimento. O marcador genético aqui descrito pode ser usado para selecionar animais para fins de reprodução. Também são descritos kits para utilizar no processo de seleção.

O pedido de patente brasileiro PI 9916903, depositado em 15/01/1999, descreve marcadores genéticos para características de reprodução favoráveis em animais. Descreve ainda os processos para identificação de tais marcadores.

Dos documentos selecionados do estado da técnica é possível se verificar que, apesar de já se conhecer o uso de vários polimorfismos de DNA para a seleção mais rápida de animais mais produtivos, ainda há necessidade de um processo de avaliação e seleção de animais através da identificação de

polimorfismos do DNA nuclear por microssatélites e por RFLPs relacionando seus genótipos, sua eficiência produtiva e identificando indivíduos com melhor ganho de peso ou desempenho reprodutivo melhor, através de sua constituição genética, tal processo de avaliação sendo descrito e reivindicado no presente  
5 pedido.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

É um objeto da presente invenção um processo de avaliação genética de animais no que diz respeito à sua eficiência produtiva. Mais  
10 especificamente, a presente invenção permite selecionar animais com melhor ganho de peso e desempenho reprodutivo, através de sua constituição genética, devido a análise de polimorfismos genético.

É um adicional objeto da presente invenção um processo de avaliação de animais, mais especificamente animais bovinos, através da identificação de  
15 polimorfismos do DNA, o qual compreende:

a) obtenção de uma amostra de DNA de um bovino em avaliação, mais especificamente, o DNA é genômico e extraído a partir de sangue, de sêmen ou de qualquer outro tecido ou fluido biológico;

b) submissão do DNA extraído à reação em cadeia da polimerase  
20 (PCR), em presença de primers adequados, para a identificação de microssatélites e/ou RFLPs específicos, mapeados em cromossomos contendo genes relacionados ao ciclo reprodutivo e/ou metabolismo, mais especificamente genes dos hormônios luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH), liberador de gonadotrofinas (GnRH), da inibina, da Leptina e/ou do fator  
25 de crescimento semelhante a insulina e/ou de seus respectivos receptores;

c) realização de eletroforese dos fragmentos; em especial, a eletroforese é realizada em gel. Mais especificamente, o gel pode ser de agarose ou poliacrilamida; a eletroforese pode ser vertical ou horizontal; os fragmentos podem ser oriundos de RFLP ou microssatélites;

30 d) análise e identificação dos fragmentos de RFLP e/ou microssatélites;

Opcionalmente, o processo envolve ainda uma etapa de clivagem enzimática com enzimas de restrição, entre as etapas b) e c).

Um outro objeto da invenção é um processo de seleção de gado pelo qual um teste do tipo descrito acima é conduzido sobre uma pluralidade de seqüências genéticas de diferentes embriões bovinos a serem selecionados, e a partir dos resultados são selecionados alguns indivíduos e outros abandonados. De acordo com a invenção, polimorfismos microssatélites e/ou RFLPs nos genes relacionados ao ciclo reprodutivo e/ou ao metabolismo, permitem identificar indivíduos com melhor desempenho reprodutivo e/ou maior ganho de peso, e assim possibilitam a seleção desses animais logo após a formação do embrião, facilitando a decisão de quais indivíduos deverão ser selecionados.

Mais especificamente, esse processo de seleção compreende as etapas de:

a) seleção de embriões de animais; em especial os embriões são embriões bovinos;

b) realização do processo de avaliação de animais baseado no material genético do animal; Mais especificamente, tal processo é baseado na presença de polimorfismos, em especial na presença de RFLPs e microssatélites;

c) seleção dos embriões adequados;

### **BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURA**

A Figura 1 ilustra o padrão do STR BMS3004, sendo 1 e 2 = 129/132; 3 = 132/132; 4 = 129/138; 5 = 129/129 e 6 = marcador de peso molecular de 25pb.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção compreende um processo para identificar, no DNA de um animal, mais especificamente um bovino em teste, a presença de marcadores genéticos associados a um maior ganho de peso e/ou a um melhor desempenho reprodutivo.

Os microssatélites e/ou RFLPs estão em sintonia com os genes envolvidos direta ou indiretamente com o mecanismo reprodutivo ou com ganho de peso, tais como LH, FSH, GnRH, inibina, IGF, Leptina e seus receptores.

5           Como é conhecido na técnica, os polimorfismos genéticos, em especial os microssatélites, determinados por número variável de repetições de 1 a 6 nucleotídeos, em tandem, e os RFLPs, caracterizados pelos padrões de restrição, podem ser identificados por comparação com marcadores de peso molecular conhecidos.

10           A análise da associação desses produtos PCR usando, por exemplo, o microssatélite ILSTS002 também associado ao gene LH, vacas portadoras do alelo de 137 pb apresentam maior peso ao parto, enquanto as que possuem o alelo de 139 pb têm menor peso ao parto, quando comparadas com o restante da população. Por outro lado, no microssatélite BMS3004,  
15           associado ao gene LH, indicou que vacas portadoras do alelo de 132 pares de bases (pb) apresentam menor intervalo entre partos, tendo assim, melhor desempenho reprodutivo. Outras análises envolvendo o microssatélite IDVGA51 e o RFLP LEPSau3A1, ambos associados ao gene da Leptina indicaram que as fêmeas portadoras dos alelos *IDVGA51\*181* e *LEPSau3A1\*+*  
20           têm maior intervalo entre partos, e, conseqüentemente, pior desempenho reprodutivo. Ao analisar animais heterozigotos *LEPSau3A1\*+* e *LEPSau3A1\*-*, eles apresentaram maior peso no primeiro parto, o que permite uma melhor recuperação no pós-parto e um retorno mais rápido ao cio.

Portanto, a determinação de alelos dos genes da IGF, Leptina, LH, FSH,  
25           GnRH, inibina e/ou seus respectivos receptores envolve a determinação da presença de pelo menos um alelo associado a pelo menos um marcador de DNA relacionado direta ou indiretamente a esses genes. Pares de primers adequados que hibridizam as regiões próximas desses microssatélites incluem, por exemplo, qualquer seqüência presente nos referidos microssatélites.

A invenção será, a seguir, ilustrada por exemplos, que não devem ser considerados limitativos, devendo ser considerados como uma possível forma

de realização da invenção.

### **Exemplo 1**

#### Preparação do DNA

5 O DNA pode ser preparado a partir de qualquer fonte de tecido ou fluido biológico contendo núcleos de célula, por exemplo células de sangue brancas, músculos, sêmen, folículos de cabelo, incisões na orelha, etc. O resultado deve ser um lisado contendo DNA bruto adequado para amplificação por PCR. A preparação é descrita de modo esquemático a seguir, e necessita, em geral, de  
10 dois dias para ser completada.

#### **1º dia:**

1. Coletar sangue com anticoagulante e centrifugar para separar plasma de leucócitos e eritrócitos;
- 15 2. Aspirar o plasma com pipeta Pasteur, sem perturbar a camada de leucócitos;
3. Transferir o sangue para um tubo de 50 ml e adicionar 'solução A' (descrita abaixo) até completar 12,5 ml. Agitar vigorosamente.
4. Colocar os tubos no gelo por 30 minutos.
- 20 5. Centrifugá-los por 15 minutos, a 2500 rpm, em temperatura ambiente.
6. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur, cuidando para não deslocar o *pellet*.
7. Completar novamente os tubos a 12,5 ml com 'solução A' (descrita abaixo) e agitar vigorosamente.
- 25 8. Colocar no gelo por 20 minutos.
9. Centrifugar novamente nas mesmas condições do item 4.
10. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur, cuidando para não deslocar o *pellet*, deixando este secar um pouco.
11. Ressuspender o *pellet* em 750 µl de 'solução B' (descrita abaixo) e  
30 transferir para um tubo de 15 ml com auxílio de uma pipeta.
12. Adicionar 25 µl de SDS 20% ou 50 µl de SDS 10% e 125 µl de

proteínase K. Agitar.

13. Incubar "overnight" a 37°C.

**2º dia:**

- 5
1. Adicionar 250 µl de NaCl 6M e agitar.
  2. Centrifugar durante 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente.
  3. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 15 ml.
  4. Adicionar 2 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA.
  5. Lavar o DNA com algumas gotas de etanol 70% gelado.
- 10
6. Ressuspender o DNA em frascos de polietileno (popularmente conhecidos como *ependorf*) com 250-500 µl de TE.

A Tabela 1 abaixo ilustra a composição das Soluções A e B, citadas nas etapas 3, 7, e 11 do primeiro dia.

15

Tabela 1: Composições das Soluções A e B

Solução A	Solução B
0,32 M de sacarose (PM=342,3 g/mol)	10 mM TRIS (PM=121,14 g/mol)
10 mM TRIS (PM=121,14 g/mol)	400 mM NaCl (PM=58,44 g/mol)
5 mM MgCl <sub>2</sub> (PM=203,2 g/mol)	2mM EDTA (PM=372,2 g/mol)
1% (v/v) Triton X-100	

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizada para amplificar os fragmentos dos microssatélites e RFLPs, segue o seguinte protocolo padrão, listado na Tabela 2 abaixo.

20

Tabela 2 - Condição padrão de amplificação dos marcadores:

25

Locos	Reação de Amplificação	Protocolo de Amplificação
Todos	80ng de DNA 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM KCl 10 mM TRIS 250µM dNTP 0,4 µM primer I e II 2,5 U de Taq	94 <sup>o</sup> C 2min 30 Ciclos : 94 <sup>o</sup> C 1min, TA* 30 seg, 72 <sup>o</sup> C 1 min 4 <sup>o</sup> C indefinidamente

\*TA = temperatura de anelamento (específica para cada loco);

Fonte: Almeida et al. (2000).

Adicionalmente, as seguintes medidas são recomendadas para um

5 melhor desempenho do ensaio:

1. Iniciar a confecção da mistura de reação pelo reagente de maior volume. A seguir, adicionar os demais reagentes na parede do frasco de polietileno (*ependorf*) (para se certificar de que foram realmente adicionados). Adicionar a enzima *Taq* polimerase por último.

10 2. Cuidar sempre para utilização correta das pipetas (volume máximo e mínimo). Utilizar ponteiras de deslocamento positivo ou de barreira para os reagentes (com as pipetas próprias para PCR) e as ponteiras de barreira com a pipeta para adicionar o DNA.

15 3. Concluída a mistura, agité-la no vórtex e, a seguir, centrifugar rapidamente (*spin*).

4. Distribuir o conteúdo da mistura de reação nos frascos de polietileno previamente separados e identificados. Fechar os frascos de polietileno novamente.

20 5. Adicionar o DNA a cada um dos tubos correspondentes. Se necessário, adicionar óleo mineral utilizando-se de um conta-gotas ou pipeta Pasteur, cuidando para não encostar nas paredes dos frasco de polietileno, se isto ocorrer descartar o conta-gotas para evitar futuras contaminações.

6. Fechar bem os frascos de polietileno e colocá-los no equipamento.

Os fragmentos amplificados dos microssatélites podem ser separados através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, não desnaturante a 7% conforme descrito por LAHIRI e cols., 1997 (Lahiri, D. K.; Zhang, A.; Nurnberger, J. I., 1997: "High-resolution detection of PCR products from microsatellite markers using a nonradioisotopic technique", in: *Biotechnology and Molecular Medicine* 60: 70-75). A confecção de gel de poliacrilamida é feita como segue:

## 10 Exemplo 2

### Solução de Acrilamida

1. Pesar acrilamida e bis-acrilamida nas quantidades necessárias, respeitando a proporção de 1 parte de bis-acrilamida para 19 partes de acrilamida;
- 15 2. Adicionar as quantidades de acrilamida e a bis-acrilamida e TBE 1x em um Becker com agitador magnético por no mínimo 30 minutos. Evitar excesso de luz, recomendando-se cobrir o copo de béquer com papel alumínio;
3. Após a dissolução completa dos reagentes filtrar a solução com papel de filtro para um frasco âmbar, devidamente rotulado em geladeira.

20

A Tabela 3 abaixo lista as proporções que devem ser pesadas para preparação de soluções com concentrações distintas.

TABELA 3: Material utilizado para preparação de soluções de poliacrilamida.

Concentração	5%	8%	10%
Acrilamida	4.75g	7.6g	9.5g
Bis-acrilamida	0.25g	0.4g	0.5g
TBE 5x	20ml	20ml	20ml
Água	Até completar 100ml	Até completar 100ml	Até completar 100ml

25

### Solução de persulfato de amônio (aps 10%)

Pesar 1g de persulfato de amônio e diluir até 10ml com água destilada.

Esta solução pode ser armazenada em geladeira ao abrigo da luz por aproximadamente 15 dias.

#### Preparação das placas para eletroforese

5 1. Após limpeza para se retirar qualquer gordura e água, e com auxílio de fita adesiva, espaçadores e grampos deve-se fechar as placas de modo a evitar futuros vazamentos. As placas montadas devem permanecer levemente inclinadas, quase em posição horizontal.

10 2. Separar a quantidade de solução de acrilamida necessária em um Becker com agitador magnético, adicionar TEMED e solução de APS 10%. Rapidamente, com auxílio de uma seringa, preencher a placa inteira e ajustar o pente.

15 3. Depois de polimerizado (cerca de 2 hs), retirar os grampos e as fitas adesivas para executar a eletroforese.

A Tabela 4 abaixo lista as propriedades típicas de uma placa assim preparada.

TABELA 4: Propriedades de placas para eletroforese em gel de poliacrilamida

	Placas grandes	Placas Pequenas
Volume Total	90ml	50ml
Volume de APS 10%	1000 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Volume de TEMED	80 $\mu$ l	40 $\mu$ l

20

#### **Exemplo 3**

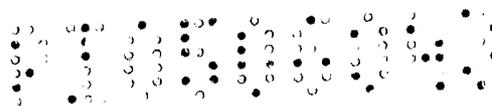
25 Pode-se também realizar eletroforese em gel de agarose. Neste caso, deve-se utilizar endonucleases específicas para clivagem dos RFLPs, de acordo com o protocolo dos fabricantes. Para a identificação dos genótipos são usadas as técnicas de coloração com prata ou com brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta.

**Exemplo 4**

Para a avaliação do desempenho reprodutivo são computados os dados relativos a intervalos entre partos (IEP), peso vivo ao primeiro parto (PV1P) e/ou peso vivo ao segundo parto (PV2P), sendo estes parâmetros associados aos marcadores genéticos através de análise de variância simples. A avaliação do ganho de peso é efetuada através de testes em campo, onde os animais são submetidos a diferentes condições nutricionais (oferta e/ou restrição alimentar).

Para a análise e seleção, dependendo do número de alelos, é feita a comparação do desempenho produtivo entre os diferentes genótipos ou entre portadores de alelos específicos ou ainda os genótipos classificados em função do tamanho dos alelos em homozigotos para alelos curtos, homozigotos para alelos longos e heterozigotos.

As associações citadas anteriormente no presente relatório (ver descrição detalhada da invenção; pág 9, 3º parágrafo) dentre marcadores genéticos e o desempenho reprodutivo, comprovam que o presente processo pode ser utilizado com sucesso para a seleção precoce de animais bovinos com maior potencial reprodutivo.



## Reivindicações

### Processo para Avaliação e Seleção de Animais

- 1- Processo para avaliação de animais caracterizado por compreender as etapas de:
- 5
- a) determinar pelo menos um parâmetro de eficiência produtiva dos animais;
  - b) identificar pelo menos um polimorfismo genético nestes mesmos animais;
  - 10 c) associar os resultados obtidos na etapa b) com os parâmetros impostos na etapa a)
- 2- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos parâmetros de eficiência produtiva serem escolhidos dentre o grupo que compreende parâmetros de desempenho produtivo, ganho de peso e mistura dos mesmos.
- 15 3- Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelos parâmetros de desempenho produtivo serem escolhidos do grupo que compreende dados relativos ao intervalo entre partos (IEP), dados relativos ao peso vivo ao primeiro parto (PV1P), dados relativos ao peso vivo ao segundo parto (PV2P) e mistura dos mesmos.
- 20 4- Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelos parâmetros de ganho de peso serem escolhidos do grupo que compreende dados relativos à oferta alimentar, dados relativos à restrição alimentar e mistura dos mesmos.
- 5- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos animais serem escolhidos do grupo que compreende, bovinos, ovinos, suínos, caprinos, e mistura dos mesmos.
- 25 6- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela identificação de polimorfismo compreender as etapas de:
- a) obtenção de pelo menos uma amostra de DNA extraído a partir do grupo que compreende sangue, sêmen, qualquer outro tecido, qualquer fluido biológico e mistura dos mesmos;
  - 30 b) submissão do DNA extraído à reação em cadeia da polimerase

(PCR), em presença de primers adequados;

c) realização de eletroforese dos fragmentos;

d) análise e identificação dos fragmentos;

5 8- Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 6, caracterizado pelo polimorfismo genético ser escolhido do grupo que compreende RFLP, microssatélite e mistura dos mesmos.

9- Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 6, caracterizado pelo polimorfismo genético estar relacionado a genes associados ao ciclo reprodutor e/ou metabolismo.

10 10- Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelos genes associados ao ciclo reprodutor serem escolhidos do grupo que compreende LH, receptores para LH, FSH, receptores para FSH, GnRH, receptores para GnRH, inibina, receptores para inibina, e mistura dos mesmos.

15 11- Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelos genes associados ao metabolismo serem escolhidos do grupo que compreende leptina, receptores para leptina, IGF, receptores para IGF e mistura dos mesmos.

20 12- Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por compreender adicionalmente uma etapa de clivagem do material genético com enzimas de restrição adequadas entre as etapas b) e c).

13- Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela eletroforese dos fragmentos ser realizada em gel de agarose e/ou poliacrilamida.

14- Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela eletroforese dos fragmentos ser do tipo vertical e/ou horizontal.

25 15- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela associação levar em conta a presença e/ou ausência de alelos específicos.

16- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela associação levar em conta o tamanho de alelos específicos.

30 17- Processo de seleção de animais caracterizado por compreender as etapas de:

a) seleção preliminar de pelo menos um embrião dos animais;

- b) determinar pelo menos um parâmetro de eficiência produtiva dos animais;
  - c) identificar pelo menos um polimorfismo genético nestes mesmos animais;
  - 5 d) associar os resultados obtidos na etapa c) com os parâmetros impostos na etapa b);
  - e) seleção definitiva dos embriões dos animais;
- 18- Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelos parâmetros de eficiência produtiva serem escolhidos dentre o grupo que
- 10 compreende parâmetros de desempenho produtivo, ganho de peso e mistura dos mesmos.
- 19- Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelos parâmetros de desempenho produtivo serem escolhidos do grupo que
- 15 compreende dados relativos ao intervalo entre partos (IEP), dados relativos ao peso vivo ao primeiro parto (PV1P), dados relativos ao peso vivo ao segundo parto (PV2P) e mistura dos mesmos.
- 20- Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelos parâmetros de ganho de peso serem escolhidos do grupo que compreende
- 20 dados relativos à oferta alimentar, dados relativos à restrição alimentar e mistura dos mesmos.
- 21- Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelos animais serem escolhidos do grupo que compreende, bovinos, ovinos, suínos, caprinos, e mistura dos mesmos.
- 22- Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela
- 25 identificação de polimorfismo compreender as etapas de:
- a) obtenção de pelo menos uma amostra de DNA extraído a partir do grupo que compreende sangue, sêmen, qualquer outro tecido, qualquer fluido biológico e mistura dos mesmos;
  - b) submissão do DNA extraído à reação em cadeia da polimerase
  - 30 (PCR), em presença de primers adequados;
  - c) realização de eletroforese dos fragmentos;

d) análise e identificação dos fragmentos;

23- Processo, de acordo com a reivindicação 17 ou 22, caracterizado pelo polimorfismo genético ser escolhido do grupo que compreende RFLP, microsatélite e mistura dos mesmos.

5 24- Processo, de acordo com a reivindicação 17 ou 22, caracterizado pelo polimorfismo genético estar relacionado a genes associados ao ciclo reprodutor e/ou metabolismo.

25- Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelos genes associados ao ciclo reprodutor serem escolhidos do grupo que compreende  
10 LH, receptores para LH, FSH, receptores para FSH, GnRH, receptores para GnRH, inibina, receptores para inibina, e mistura dos mesmos.

26- Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelos genes  
- associados ao metabolismo serem escolhidos do grupo que compreende  
leptina, receptores para leptina, IGF, receptores para IGF e mistura dos  
15 mesmos.

27- Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por compreender adicionalmente uma etapa de clivagem do material genético com enzimas de restrição adequadas entre as etapas b) e c).

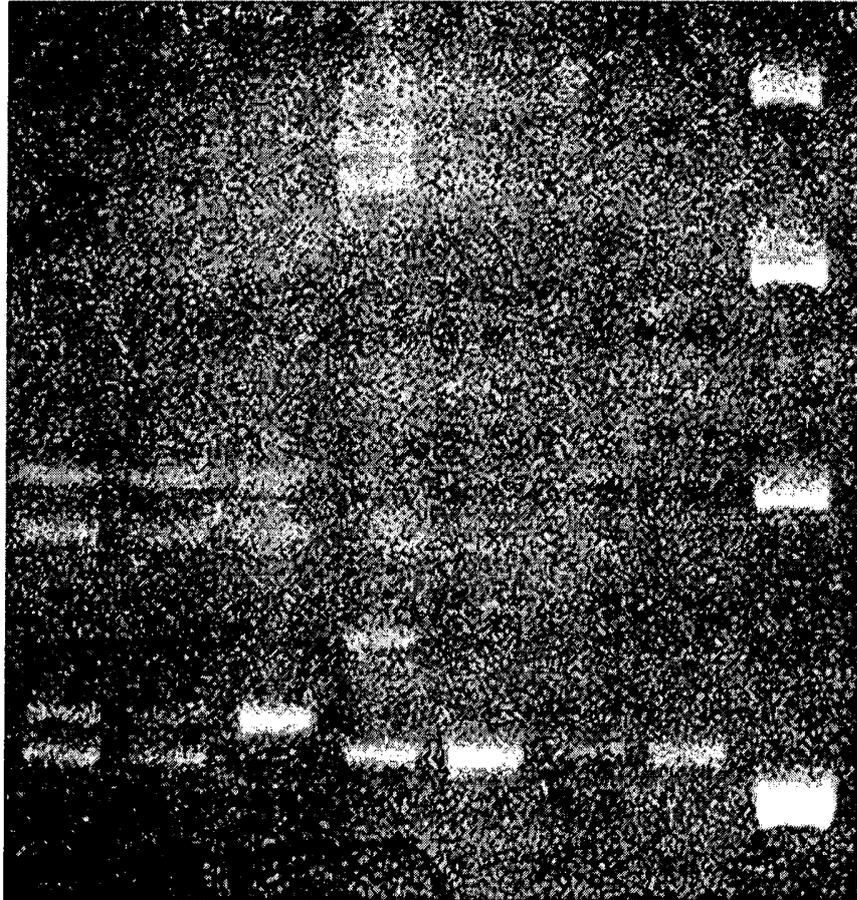
28- Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pela  
20 eletroforese dos fragmentos ser realizada em gel de agarose e/ou poliacrilamida.

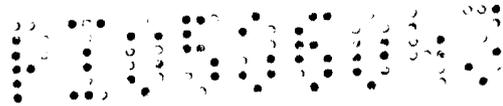
29- Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela associação levar em conta a presença e/ou ausência de alelos específicos.

30- Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela associação  
25 levar em conta o tamanho de alelos específicos.

FIGURA 1

1 2 3 4 5 6





## Resumo

### // Processo para Avaliação e Seleção de Animais //

A presente invenção descreve um processo para avaliação genética do desempenho produtivo de animais com auxílio de marcadores genéticos o qual envolve uma etapa de determinação do DNA dos animais em teste, mais especificamente de bovinos, dos alelos presentes para um marcador específico de DNA associado aos genes da Leptina, LH, FSH, IGF, GnRH, inibina e de seus receptores; é também descrito um processo de seleção de embriões para a criação de animais, mais precisamente à criação de gado, com desempenho reprodutivo e ganho de peso melhorados.