

ALEX SANDRO SCHIERHOLT

GENE DE EFEITO ASSOCIATIVO NA DETECÇÃO DE *MAJOR GENES*.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

ALEX SANDRO SCHIERHOLT

GENE DE EFEITO ASSOCIATIVO NA DETECÇÃO DE *MAJOR GENES*.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 03 de abril de 2009.

Prof. Robledo de Almeida Torres
(Co-orientador)

Prof. Aldrin Vieira Pires

Prof. Paulo Luiz Souza Carneiro

Prof. José Braccini Neto

Prof. Ricardo Frederico Euclides
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar por esta caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao professor Ricardo Frederico Euclides, pela orientação, amizade, confiança e acordes no violão, minha admiração e gratidão.

Ao professor Dr. Frank Siewerd, meu pai gringo, pela acolhida e co-orientação nos EUA, idéias e sugestões, confiança e incentivo fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor Robledo de Almeida Torres, pelos aconselhamentos e incentivo, pelas conversas e confiança.

Ao professor Paulo Sávio Lopes, pelo aconselhamento, incentivo, apoio e pela amizade.

À professora Simone Facioni Guimarães, pessoa que foi fundamental para minha formação.

Aos professores Aldrin Vieira Pires, José Braccini Neto e Paulo Carneiro pela dedicação na correção da tese e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

Aos meus pais, Carlos e Nair, pelo carinho, apoio, amizade e confiança depositada em mim durante toda a minha vida. Por tudo o que fizeram para a formação do meu caráter.

Ao meu irmão Sergio, um amigo que escolhi. Pelas conversas, jogatinas e pelos fogos de supressão que permitem minha sobrevivência em situações difíceis.

À Luciara, por ter me acompanhado e me apoiado em cada passo desta caminhada.

Aos compadres professores Cláudio e Simone, de quem sempre tive apoio e amizade.

Aos amigos Brian e Siani Girl, pelo companheirismo e amizade durante minha estadia nos EUA (Jennifer, traduza para o Brian).

Ao Roots e Mara, pela estadia, e à Belinha por me emprestar o quarto.
Ao colega e amigo Nicola, que me ajudou muito durante a etapa final.
Aos meus amigos, eles sabem quem são, pelos momentos de descontração.
Aos colegas de curso, pelo incentivo e troca de conhecimento.
Aos colegas de Maryland, Ashley, Arun, Heden, José e Malora, pelo
convívio agradável.
À todos professores e funcionários da Universidade de Maryland.
À todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Viçosa.

BIOGRAFIA

ALEX SANDRO SCHIERHOLT, nascido em 20 de fevereiro de 1978, na cidade de Pato Branco - PR, filho de Carlos Antonio Schierholt e Nair Burili Schierholt.

Iniciou em março de 1998 o curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa - MG, graduando-se em fevereiro de 2003.

Em março de 2003, ingressou no Programa de pós graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Universidade Federal de Viçosa - MG, obtendo o grau de mestre em 25 de fevereiro de 2005, sob a orientação da Prof^a. Dr. Simone Eliza Facioni Guimarães.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia, na área de Melhoramento Genético Animal, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, tendo realizado estágio de doutorado na Universidade de Maryland por um período de oito meses, sob a co-orientação do professor Dr. Frank Siewerdt.

Em 03 de abril de 2009, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Zootecnia sob a orientação do Prof^o. Dr. Ricardo Frederico Euclides.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Efeitos associativos e bem estar animal.....	4
Modelando o efeito associativo.....	6
Seleção de grupos.....	11
Genes candidatos associativos.....	12
QTL de efeitos associativos.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

SCHIERHOLT, Alex Sandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009. **Gene de efeito associativo na detecção de *major genes***. Orientador: Ricardo Frederico Euclides. Co-orientadores: Robledo de Almeida Torres e Paulo Sávio Lopes.

Os efeitos associativos são gerados pela influência que o ambiente social tem sobre a expressão de genes em animais companheiros de grupo. Este ambiente social é definido em parte por genes responsáveis pelo comportamento dos animais que compõe o grupo, denominados de genes associativos. Estes genes podem estar diminuindo o poder de detecção de *major genes* de efeitos diretos, ou até mesmo estarem sendo identificados como se fossem genes de efeitos diretos. Este trabalho foi feito com o objetivo de verificar a influência que genes associativos possam ter em análises de identificação de *major genes*. Os dados foram gerados por meio de simulação. Foi simulado um genoma de 2471 cM e as frequências alélicas e efeitos de 200 QTL (locos de característica quantitativa) distribuídos pelo genoma. Dois destes QTL foram transformados em *major genes*, um com efeito direto sobre o fenótipo do animal, *major gene* direto, e outro com efeito associativo sobre o fenótipo dos companheiros de grupo, *major gene* associativo. A população estudada foi formada pela escolha ao acaso de 3740 animais simulados, filhos de 20 pais e 337 fêmeas, formando 11 classes de grupos, com 10 animais em cada grupo e estabelecendo-se 34 repetições para cada classe. As classes foram determinadas pelo número de animais portadores do alelo dominante para o gene associativo em cada grupo, variando de zero indivíduo B₋ a 10 indivíduos B₋. O *major gene* associativo foi simulado agindo de duas maneiras: influenciando na predisposição do animal a se envolver em disputas por uma melhor posição na ordem hierárquica, efeito associativo pré-hierárquico, tendo um efeito promovido pela agressividade entre os animais; e outra, o efeito associativo pós-hierárquico, promovido pelas vantagens que animais em posições mais elevadas na ordem hierárquica têm por

terem acesso diferenciado aos recursos. Dois grandes conjuntos de simulações foram realizados, utilizando a mesma população simulada, um considerando o gene associativo com efeitos pré e pós-hierárquico e outro considerando o gene associativo apenas com efeito pós-hierárquico. Dentro desses dois grandes conjuntos de simulações foram simulados três níveis de efeitos para o *major gene* direto (1%, 3% e 5% da média fenotípica da população acrescentada ao valor do fenótipo dos animais). O efeito do *major gene* associativo foi simulado contendo apenas um nível de efeito para o efeito associativo pré-hierárquico (cada animal agressivo B_ causava uma diminuição de 8% da expressão do *major gene* direto em animais companheiros de grupos) e quatro níveis de efeitos para o efeito associativo pós-hierárquico (cada animal B_ no grupo causava uma diminuição de 5%, 10%, 20% e 30% de diminuição na expressão do *major gene* direto em animais companheiros de grupos). Com o objetivo de verificar a influência de genes associativos em análises de detecção de *major genes*, ambos os *major genes* foram avaliados como sendo *major genes* de efeito direto, por testes de média, na tentativa de identificar *major genes* com efeito direto sobre o fenótipo dos animais. Os resultados mostraram que, para os níveis dos efeitos dos genes simulados, o efeito associativo não foi capaz de mascarar a identificação de *major genes* com efeito direto ($p < 0,01$). A análise testando se o *major gene* associativo seria identificado como um gene de efeito direto mostrou que, para as simulações dos níveis de efeitos do gene direto contribuindo com mais de 3% da média fenotípica da população, o *major gene* associativo foi identificado como um *major gene* de efeito direto ($p < 0,01$).

ABSTRACT

SCHIERHOLT, Alex Sandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2009. **Associative effect gene in detection of major genes.** Adviser: Ricardo Frederico Euclydes. Co-advisers: Robledo de Almeida Torres and Paulo Sávio Lopes.

The Associative effects are produced by the influence that social environment has on gene expression in group companion animals. This social environment is defined in part by genes responsible for the behavior of the animals composing the group, called associative genes. These genes may be diminishing the power detection of major genes with direct effects, or even being identified as if they were genes with direct effects. This work was made aiming the evaluation of the influence of associative genes in identification analyses of major genes. The data were generated by simulation. A genome of 2471 cM, the allele frequencies and effects of 200 QTL (quantitative trait loci) were simulated. Two of these QTL were transformed in major genes, one with direct effects over the individual phenotype, the direct major gene, and another with associative effects over the phenotype of group companions, the associative major gene. The population in study was made by selecting randomly 3740 simulated animals, offspring of 20 males and 337 females, forming 11 group classes with 10 animals in each group and setting 34 repetitions for each class. The classes were determined by the number of animals with the dominant allele for the associative gene in each group, varying from zero to 10 individuals B₋. The associative major gene was simulated acting in two ways: influencing the predisposition of the animal to be involved in disputes for a better position in the hierarchy, the pre-hierarchical associative effect, having effect promoted by the aggressiveness among the animals; and another, the post-hierarchical effect, promoted by the benefits that animals in a higher hierarchical position have for having differentiated access to the resources. Two major sets of simulations were performed, using the same simulated population, one considering the associative

gene with pre and post-hierarchical effects and another considering the associative gene only with post-hierarchical effects. Within these two major sets of simulations, three levels of effects for the direct major gene were considered (adding 1%, 3% and 5% of the population phenotype mean to the phenotype of the animals). The associative major gene effect was simulated considering only one level of effect for the pre-hierarchical effect (each aggressive animal B_ caused a decrease of 8% in the expression of the direct major gene at group companions) and four level of effects for the post-hierarchical effect (each B_ animal caused a decrease of 5%, 10%, 20% and 30% in the expression of the direct major gene at group companions). In order to verify the influence of associative genes in analyses of major gene detection, both major genes were evaluated as direct major genes, by mean test, in an attempt to identify major genes with direct effect in the phenotype of animals. The results showed that, for the genes effect levels simulated, the associative effect could not mask the identification of major genes with direct effect ($p < 0,01$). The analysis testing whether the associative major gene would be identified as a gene with direct effect showed that, in simulations with direct effect gene levels contributing with more than 3% of the phenotypic mean of the population, the associative major gene was identified as a major gene of direct effect ($p < 0,01$).

1 - INTRODUÇÃO

A maioria das metodologias atuais de seleção de plantas e animais foi desenvolvida baseada em teorias que têm geralmente ignorado as interações competitivas entre os indivíduos, especificamente os impactos de genes de um indivíduo no desempenho de outros indivíduos. Em animais confinados, tais interações não apenas reduzem crescimento e produtividade, mas também podem resultar em danos físicos e morte, aumentando assim a sua importância com relação aos impactos em programas de melhoramento.

Essa interação entre os animais gera um ambiente social, e o efeito causado pelo ambiente social é chamado de efeito associativo. O ambiente social é definido pelo comportamento dos animais, e este comportamento é controlado, em parte, por componentes genéticos, chamados de genes associativos.

Na cadeia de produção de suínos, e semelhante ao que ocorre em cadeias produtivas de outras espécies, os animais têm seus desempenhos testados em granjas núcleo, onde são alojados em gaiolas individuais. Sendo assim o desempenho dos seus filhos em granjas comerciais pode tomar três caminhos: pode ser que o animal se comporte agressivamente quando criado em ambiente social, prejudicando o desempenho dos companheiros de baia; pode ser que o animal seja criado em um ambiente social com efeitos negativos e não consiga ter um desempenho igual ao dos seus pais; ou pode ocorrer que os animais criados em grupo nem agridam e nem sofram agressões, de maneira que o ambiente social tenha um efeito nulo sobre o desempenho dos animais.

Seria justificável então que os animais da granja núcleo tivessem seus desempenhos testados em ambientes sociais, utilizando metodologias ajustadas para os efeitos associativos, antes de terem suas progênes distribuídas nas granjas comerciais. Sendo assim, as análises moleculares e avaliações genéticas também deveriam levar em consideração o ambiente social.

As ferramentas moleculares têm gerado informações valiosas para o melhoramento animal, como os dados de *microarray* e até mesmo a seleção baseada apenas em informações de SNP (*single nucleotide polymorfism*). Porém as análises moleculares, como os testes que validam os *microchips* de SNP e as diferenças de expressão genética, ignoram os efeitos gerados pelo ambiente social no qual o indivíduo vive.

Com o conhecimento de como os efeitos associativos atuam, existe a possibilidade de ocorrerem dois cenários em uma análise de identificação de *major genes*:

Um dos cenários (cenário I) ocorreria quando animais portadores de alelos específicos de genes associativos tiverem uma posição mais elevada na ordem hierárquica. Esta posição traria vantagens sobre outros animais no acesso aos recursos, gerando uma situação onde os indivíduos em posições inferiores não tivessem a mesma condição para a expressão dos seus genes quando comparados com indivíduos em posições mais elevadas na ordem hierárquica. Se indivíduos portadores de alelos benéficos para a produtividade não tiverem condições ambientais (ambiente social) para expressá-los, a diferença média entre animais portadores deste alelo e animais não portadores desse alelo não seria significativa, diminuindo assim o poder de detecção deste *major gene*, o que resultaria na ocorrência de um falso negativo;

O segundo cenário (cenário II) ocorreria quando *major genes* associativos fossem identificados como *major genes* de efeitos diretos, já que estes genes promovem um melhor acesso aos recursos para indivíduos em posições mais elevadas na ordem hierárquica. Isto ocorreria devido ao fato que indivíduos portadores de alelos que tragam vantagens sociais sobre outros animais teriam uma melhor condição de expressar seus genes para produtividade, e assim teriam uma maior média fenotípica para a característica. Devido a essa diferença na produtividade entre indivíduos portadores e não destes alelos favoráveis, o *major gene* associativo seria considerado um *major gene* benéfico ao valor da

característica, quando na verdade está prejudicando a produtividade dos companheiros de grupo.

Objetivou-se nesse estudo avaliar, por meio de simulação, a influência de um gene associativo em análises de identificação de *major genes*, considerando diferentes intensidades de efeitos dos *major genes*.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - EFEITOS ASSOCIATIVOS E BEM ESTAR ANIMAL

A maioria das avaliações de o que pode ser considerado bem estar animal, ou mais especificamente a falta desse bem estar, esta relacionada com o conceito de estresse. Estresse é outro conceito difícil de ser definido, mas uma das definições seria: estresse é qualquer ajuste comportamental ou fisiológico que um organismo desenvolve para evitar ou se adaptar a uma ameaça percebida que desafie a homeostase interna (Moberg, 2000). Em uma visão mais ampla, a falta de bem estar está geralmente associada com um estresse crônico e incontrollável, em que o animal não tem mais como voltar à homeostase inicial e preferencial. Certamente, outros conceitos são relevantes para o bem estar animal, como medo e depressão, mas as avaliações desses conceitos são bem similares ao do estresse. Possíveis sinais de estresse incluem: respostas defensivas ou assustadas, supressão alimentar e do comportamento sexual, agressões, comportamento estereotipados e apatia. Se essas respostas forem constantes, o animal corre risco de estar em falta de bem estar (Swaigood, 2006).

A falta de bem estar reflete na produtividade animal uma vez que o conjunto de genes expresso pelo genoma do animal varia conforme o ambiente no qual ele vive (Arango *et al.*, 2005).

A criação de animais agrupados em ambientes onde existem limitações de recursos leva a competições sociais pelos recursos limitados. Como resultado desta competição por alimentos, espaço e parceiros, hierarquias de dominâncias são formadas, geralmente determinadas por meio de encontros dinâmicos sucessivos dentro de um grupo de rede social (Chase *et al.*, 2003).

A prática de misturar grupos de animais provenientes de grupos diferentes, comumente realizada na indústria suína moderna, leva a muitas agressões e lutas entre os indivíduos estranhos para estabelecer uma nova hierarquia social entre

animais dominantes e submissos (Cautellier *et al.*, 2007). As agressões começam após as primeiras horas e dentro de dois dias uma ordem hierárquica estável já é estabelecida em suínos. Porém níveis menores de agressão podem ser observados por uma ou mais semanas (Jensen, 1994, Hayne e Gonyou, 2003). Os efeitos negativos geralmente são refletidos na taxa de crescimento corporal, não só nas primeiras semanas após a mistura dos grupos como também em períodos posteriores. Stookey e Gonyou (1994) demonstraram que em roedores a exposição dos animais a um curto período de mistura, por 24 horas, pode levar a um efeito negativo no ganho de peso corporal por até duas semanas após a mistura.

Em trabalhos em que o tempo de coexistência entre animais dominantes e subordinados era mais extenso ocorreu um efeito negativo para a taxa de crescimentos em animais derrotados em desafios. Talvez isso indique que a coexistência prolongada de animais dominantes com submissos leve a um estresse responsável pela redução no seu desempenho (Ruiz *et al.*, 2001).

Em suínos, fêmeas que sofreram derrota na disputa hierárquica sofreram alterações endócrinas agudas, como elevação na atividade hipotalâmica pituitária adrenal (HPA), na atividade simpático adrenal e nos níveis de prolactina. Essas elevações na atividade HPA e na atividade simpática adrenal durante interações agonísticas foram observadas em suínos por Otten *et al.* (1997). Com relação à prolactina, poucos estudos foram realizados em suínos para detalhar o efeito do ambiente social sobre os níveis de prolactina. Porém em roedores foi observado que a liberação de prolactina é aumentada em situações de medo. Dessa maneira a prolactina pode ser usada como um parâmetro para se ter acesso ao nível de estresse em suínos. No estudo também foi reportado mudanças nas características imunológicas do sangue induzida por derrotas em disputas. Enquanto que a quantidade de linfócitos diminuiu (linfopenia), o contrário ocorreu com neutrófilos granulócitos (granulocitose). Mudanças similares na quantidade de leucócitos foram observadas em aves (Gross e Siegel, 1983) e suínos (McGlone *et al.*, 1993).

Dessa maneira o ambiente social no qual o animal convive, ou seja, a interação que existe entre os animais criados num mesmo grupo, pode ser considerado um efeito ambiental, mas com uma característica peculiar, já que o comportamento dos animais é composto por um componente genético, e dessa maneira torna o efeito ambiental social um efeito herdável e passível de seleção. A mudança no conjunto de genes expresso pelo genoma, conforme o ambiente social, é um dos efeitos ambientais que fazem com que o progresso genético obtido na granja núcleo de melhoramento não seja expresso em granjas comerciais (Arango *et al.*, 2005). Esses efeitos sociais, definidos como efeitos associativos (Griffing, 1967), por terem componentes genéticos, podem acabar viesando a estimação dos parâmetros genéticos.

2.2 - MODELANDO O EFEITO ASSOCIATIVO

O fenótipo observado, P_i , do indivíduo i , em um grupo com n indivíduos, é devido a dois efeitos fenotípicos ocultos não observáveis: um efeito direto ($P_{D,i}$), originado pelos genes e pelo efeito ambiental do animal, e os efeitos fenotípicos associativos ($P_{S,j}$) originados de cada um dos $n-1$ membros do grupo (Griffing, 1967).

Dessa forma o fenótipo de um indivíduo i pode ser expresso pela equação:

$$P_i = P_{D,i} + \sum_{j \neq i}^n P_{S,j}$$

A equação representa que o fenótipo observado é afetado tanto pelo indivíduo que apresenta o fenótipo e pelos indivíduos que estão sendo criados no mesmo grupo. Cada indivíduo afeta o próprio fenótipo e o fenótipo de seus associados. Dessa maneira cada indivíduo tem dois efeitos não observáveis: um efeito direto, expresso no próprio fenótipo, e um efeito associativo, expresso no fenótipo observável de seus associados.

O efeito associativo pode ser considerado como sendo um efeito ambiental, porém gerado pelos companheiros de um indivíduo em foco, mas estes dois tipos de efeitos ambientais diferem fundamentalmente já que o efeito gerado pelos indivíduos é definido em parte por componentes genéticos, e por isso herdáveis (Bijma e Muir, 2006). O modelo com efeito materno, onde a associação é entre mãe e cria e o indivíduo em foco é a cria, é um caso especial bem conhecido da equação anterior (Bijma *et al.*, 2007a)

Esses efeitos fenotípicos, direto e associativo, ao serem decompostos em função de valores genéticos (A) e ambientais (E) resultaria em:

$$P_i = A_{D,i} + E_{D,i} + \sum_{j \neq i} A_{S,j} + \sum_{j \neq i} E_{S,j}$$

em que $A_{D,i}$ (DBV, *direct breeding value*) é o valor genético direto de um indivíduo i , $E_{D,i}$ o efeito ambiental direto que atua sobre o indivíduo, $A_{S,j}$ (SBV, *associative breeding value*) o valor genético associativo e $E_{S,j}$ é um efeito não genético associativo. O efeito fenotípico associativo $P_{S,j}$, por ser um fenótipo, implica em existir efeitos genéticos e não genéticos. A consideração destes efeitos não genéticos tem importantes implicações para a análise estatística dos dados (Bijma *et al.*, 2007b).

A soma dos valores de DBV e SBV resulta em um valor genético total (TBV). Este valor, por depender do tamanho do grupo, indica que, ao contrário do valor genético clássico, a contribuição de um indivíduo para a resposta à seleção depende não apenas de seu genótipo, mas também do tamanho do grupo entre seus filhos (Bijma e Muir, 2006). Segundo Van Vleck e Cassady (2005) a variância genética total, incluída em um registro de um animal i com n competidores, dependerá do número de competidores e da matriz de parentesco entre os animais criados em grupo (Van Vleck e Cassady, 2005; Arango *et al.*, 2006)

O melhoramento genético de características afetadas tanto pelo genótipo do indivíduo quanto pelos genótipos dos membros do grupo ao qual ele pertence, requer um conhecimento não apenas da variação herdável usual da característica,

mas também da variação herdável dos efeitos de interação. Dessa maneira, a seleção feita para essas características deveria atingir ambos os efeitos diretos e associativos. (Bijma e Muir, 2006).

Com exceção dos efeitos de leitegada e de efeito materno, a teoria genética quantitativa clássica considera apenas efeitos independentes, não levando em conta os efeitos associativos que ocorrem entre os organismos, o que resulta em efeitos correlacionados entre os indivíduos que estão interagindo, e que não são considerados nas análises (Falconer, 1987).

A maioria das metodologias de seleção atuais de plantas e animais foi desenvolvida baseada em teorias que tem geralmente ignorado as interações competitivas entre os indivíduos, especificamente os impactos dos genes de um indivíduo nas performances de outros indivíduos (Muir, 2005).

Os primeiros trabalhos teóricos considerando a interação competitiva entre os animais foram desenvolvidos por Griffing em 1967 (Griffing, 1967). No entanto esses trabalhos foram ignorados, primeiramente devido talvez ao fato da inabilidade de estimar os parâmetros associados com o modelo, derivações teóricas difíceis e não intuitivas, e resultados que não podiam ser generalizados para estruturas de grupos arbitrários, graus de parentesco e níveis de seleção (Bijma *et al.*, 2007a, Bijma *et al.*, 2007b).

Usando um modelo expandido, para grupos aleatórios de tamanho n , Griffing (1967) mostrou que na presença de genótipos interativos, a resposta à seleção é:

$$\Delta \mu \cong \left(\frac{i}{\sigma} \right) \left(\sigma_D^2 + (n-1)\sigma_{D,S} \right)$$

em que n é o tamanho do grupo, σ é o desvio padrão fenotípico, i é o diferencial de seleção padronizado, σ_D^2 é a variância genética aditiva dos efeitos diretos e $\sigma_{D,S}$ é a covariância genética aditiva entre os efeitos diretos e associativos. Se a covariância entre os efeitos diretos e associativos é negativa, como ocorreria com a competição por um recurso limitado, então a seleção baseada no desempenho individual pode ter um efeito reverso na média, ou seja, a seleção positiva irá reduzir ao invés de elevar

a média. Isso acontece devido ao fato que um gene que tenha uma vantagem direta positiva para o indivíduo possa ter um efeito associativo negativo nos dados dos outros membros do grupo.

Em contraste, se o grupo for definido como uma unidade de seleção, então para grupos de tamanho n ,

$$\Delta\mu \cong \left(\frac{1}{n}\right)\left(\frac{i_{gr}}{\sigma_{gr}}\right)(\sigma_D^2 + 2(n-1)\sigma_{D,S} + (n-1)^2\sigma_S^2)$$

em que o subscrito gr indica que i e σ estão relacionados com a média do grupo (e não do indivíduo) e σ^2 é a variância genética aditiva para efeitos associativos. Nesse caso $\Delta\mu$ é sempre positiva. Dessa maneira, transferindo a seleção de dados individuais para a média do grupo garante que a média da população não irá decrescer. À medida que o tamanho do grupo aumenta, os efeitos associativos terão um papel dominante cada vez maior na determinação das respostas à seleção, o que implica em dizer que até mesmo para condições de pouca competição, uma resposta negativa à seleção individual pode ocorrer. Esse resultado foi demonstrado experimentalmente por Muir (1996) usando aves, em que a interação do genótipo do animal com o tamanho de grupo ocorreu entre gaiolas com um e nove pássaros, mas não entre gaiolas com um e quatro pássaros, com a densidade de animais mantida constante.

Bijma *et al.* (2007a) desenvolveu uma metodologia para prever a resposta a seleção considerando diferentes níveis de interação entre os indivíduos, o que foi definido como seleção multinível, estabelecidos por um critério de seleção dado pela equação:

$$C_i = P_i + g \sum_{j \neq i}^n P_j,$$

em que C_i é o valor do critério de seleção do indivíduo i , $\sum_{j \neq i}^n P_j$ é a soma dos valores das características dos membros do grupo, P_i é o valor da característica observado no indivíduo i e g representa o grau que a seleção irá considerar as informações dos

companheiros de grupo. Ou seja, o valor de g definirá em que nível o efeito associativo será considerado. Para um valor de $g = 0$ representa um seleção baseado na informação individual P_i , resultando em seleção entre indivíduos sem dar importância ao desempenho do grupo. Um valor de $g = 1$ representa a seleção baseada na soma dos valores das características de todos os membros do grupo, incluindo o indivíduo i . Quando $g = \frac{1}{n-1}$ a seleção é feita baseada no desvio do valor da característica individual do valor médio da característica nos companheiros de grupo.

Considerando que o valor genético total de um indivíduo (TBV) será composto pelo valor genético direto (DBV), que atuará diretamente no fenótipo do indivíduo, e pelo valor genético associativo (SBV), que atuará no fenótipo dos n companheiros de baia do indivíduo, ter-se-á:

$$TBV_i = DBV_i + (n-1)SBV_i$$

A resposta à seleção, para qualquer nível multinível pode ser predita por meio da equação:

$$\Delta \bar{P} = \left\{ g[(n-1)r + 1] \sigma_{TBV}^2 + (1-g) \sigma_{P, TBV} \right\} \frac{\Gamma}{\sigma_C}$$

sendo g o nível de seleção multinível, n o número de animais, r a relação genética aditiva de parentesco, $\sigma_{P, TBV}$ é a covariância entre o fenótipo de um indivíduo e seu TBV, σ_{TBV}^2 é a variância do TBV na população, Γ é a intensidade de seleção, σ_C é o desvio padrão do critério de seleção, sendo $\frac{\Gamma}{\sigma_C}$ equivalente ao gradiente de seleção.

Assim, para dado valor de g , n e r , a resposta à seleção dependerá da variação total herdável (σ_{TBV}^2) e da covariância entre o TBV e o fenótipo do animal ($\sigma_{P, TBV}$). Esses dois valores por sua vez, dependem da estrutura de (co)variâncias entre o DBV e o SBV de um animal,

$$\sigma_{TBV}^2 = \sigma_D^2 + 2(n-1)\sigma_{D,S} + (n-1)^2\sigma_S^2$$

e

$$\sigma_{P,TBV} = \sigma_D^2 + (n-1)(1+r)\sigma_{D,S} + r(n-1)^2\sigma_S^2.$$

O σ_D^2 equivale à variação herdável considerada na teoria clássica e o termo σ_S^2 à variação herdável presente no ambiente social. Covariâncias $\sigma_{D,S}$ negativas entre DBV e SBV diminuem a variação total herdável. Indivíduos com uma $\sigma_{D,S}$ negativa e com um DBV positivo têm um efeito negativo na média fenotípica dos seus companheiros de baia, indicando um estado social de competição no grupo.

2.3 - SELEÇÃO DE GRUPOS

A seleção de grupos é uma maneira eficiente de selecionar alelos que não apresentem efeitos associativos indesejados na população. Usando aves de postura, Muir (1996) comparou famílias de machos alojadas em grupo, selecionadas ou rejeitadas baseado na produção do grupo, com aves controles não selecionadas e criadas em gaiolas individuais. O autor relatou que após seis gerações, a percentagem de mortalidade anual da linha selecionada (KGB – *kinder, gentler bird*) decresceu de 68%, na segunda geração, para 8,8% na 6ª geração, que foi similar à linha controle não selecionada em gaiolas individuais (9,1%).

Craig e Muir (1996) compararam as linhas selecionadas e controle com uma linhagem comercial, DXL, na geração sete, usando gaiolas individuais ou que alojavam 12 aves e sob condições de manejo igual ao das gerações anteriores, com a exceção de que as aves que morriam eram substituídas por aves da mesma linhagem. O desempenho foi avaliado de 20 a 58 semanas de idade. Em gaiolas individuais, o desempenho em termos de ovos por ave alojada, ovos por ave por dia, peso do ovo e massa do ovo foram significativamente maiores para a linhagem DXL do que para KGB, que por sua vez foi maior que para a linha controle. Mortalidade foi zero para todas as três linhagens. No entanto, para gaiolas com 12 aves alojadas, um

ordenamento reverso foi observado para desempenho, com a linha KGB superior a DXL para o número total de ovos por ave alojada, massa do ovo, e ovos por ave por dia. A diferença mais marcante foi para a mortalidade. A linha DXL teve uma mortalidade de 89% às 58 semanas de idade, comparada com a linha KGB com 20% e a controle com 54% de mortalidade. A linhagem DXL resultou de seleção contínua para melhoramento da produtividade baseada no desempenho individual das aves. Essas comparações demonstram que a seleção contínua em produtividade individual irá melhorar a produtividade quando as competições interativas estiverem ausentes, como em gaiolas individuais, mas podem ter uma resposta negativa à seleção quando em grupo.

2.4 - GENES CANDIDATOS ASSOCIATIVOS

Genes candidatos para uma determinada característica são genes seqüenciados, de ação biológica conhecida, que estão envolvidos com características de desenvolvimento ou de fisiologia e alvos dos estudos de marcadores. Estes genes podem ser estruturais ou pertencerem a uma via regulatória ou bioquímica que afetam a expressão das características. A teoria do gene candidato afirma que uma proporção significativa do QTL que afeta a variação da característica em uma população compreende genes candidatos associados com aquela característica (Rothschild e Soller, 1997).

Genes candidatos associativos seriam genes de ação fisiológica conhecida e que estariam envolvidos na determinação do comportamento social dos animais e, conseqüentemente, em vias regulatórias que afetam a expressão de características em companheiros de grupo.

O comportamento social se torna ainda mais complicado quando visto de um âmbito fisiológico. Este abrange múltiplos estímulos sensoriais externos com sinais internos e o fato de os indivíduos desenvolverem aprendizado em situações repetidas. A resposta ao estresse não está apenas relacionada à natureza e

intensidade do estímulo, mas também às tendências individuais das respostas, ou temperamento, determinadas por fatores genéticos e experiências anteriores.

Estes estímulos geram uma resposta comportamental por alterar a atividade de duas redes complexas e dinâmicas, uma é a interação entre genes e produtos expressos por esses genes, e outra é composta de neurônios interconectados (Bono, 2003). Esclarecimentos sobre essas redes devem ser obtidos por estudos combinando diferentes linhas de pesquisa, envolvendo genética, biologia molecular, farmacologia, neuroanatomia, neurofisiologia, com dados quantitativos obtidos de observações comportamentais. O estudo do comportamento pode ser feito por meio da alteração ou inibição da atividade de produtos de alguns genes, principalmente neuropeptídios e receptores destes neuropeptídios. O nematóide *C. Elegans*, por ter um sistema nervoso composto de apenas 302 neurônios se tornou um modelo atrativo para estudar a base genética e neural do comportamento. Neste nematóide foi encontrada uma mutação no locus do gene *npr-1* (receptor de neuropeptídio) que anula a produção de NPR-1 e faz com que linhagens com comportamento solitário passem a se comportar de maneira agregada com outros nematóides da mesma espécie (Bono, 2003). O *npr-1* codifica um receptor de neuropeptídio similar ao receptor de neuropeptídio Y (NPY). Em mamíferos, o NPY e o receptor de NPY possuem papel fisiológico que inclui a regulação do consumo de ração, ansiedade e sensação de dor (Baraban *et al.*, 1997).

Assim como o exemplo do gene *npr-1*, existem outros exemplos fisiológicos que são controlados por genes polimórficos e que possam estar levando a ocorrência de efeitos associativos em um grupo de animais. O principal acontecimento da resposta adaptativa ao estresse é a ativação de dois sistemas neuroendócrinos principais: o eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal (HPA), levando a secreção de corticosteróides pela glândula adrenal (principalmente o glucorticóide cortisol, o hormônio do estresse), e o sistema simpaticoadrenal levando a liberação de catecolaminas (Désautés *et al.*, 1997).

2.4.1 - O eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal

O eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, HPA, é um conjunto complexo de interações diretas e de *feedback* entre o hipotálamo, a glândula pituitária, localizada abaixo do hipotálamo e as glândulas adrenais, órgãos cônicos localizados no rim. A interação entre estes órgãos constitui o eixo HPA, a principal parte do sistema neuroendócrino que controla as reações ao estresse e regula muitos processos, incluindo digestão, sistema imune, animação e armazenamento ou liberação de energia.

Grandes diferenças na atividade do eixo HPA foram observadas dentro de raças (Geverink *et al.*, 2006) e também entre raças (Désautés *et al.*, 1997). Vários mecanismos moleculares foram identificados para explicar a variação genética da atividade do eixo HPA. A sensibilidade do cortex adrenal ao ACTH (hormônio liberado pela glândula pituitária que estimula a produção de cortisol) pode ser usado como um fenótipo para avaliar essa variação, e foi encontrada uma herdabilidade de 0,26 em suínos (Hennessy *et al.*, 1988, citado por Désautés *et al.*, 1999).

O uso de novas técnicas como *microarray* permitirá ampliar o conhecimento das vias afetadas pelos hormônios glucorticóides liberados como resultado da ativação do eixo HPA.

Vários neurotransmissores são importantes na regulação do eixo HPA, especialmente dopamina, serotonina e noraepinefrina (noradrenalina), que serão relatados posteriormente.

2.4.2 - Cortisol

O hormônio secretado pelo eixo HPA que tem recebido maior atenção com relação ao estatus social é o glucorticoide conhecido como o hormônio do estresse, o

cortisol. Uma elevada taxa de cortisol pode afetar a habilidade de competição dos animais. Trutas com níveis de cortisol elevado antes de ocorrer a interação social tendem a se tornar subordinadas e o tratamento com cortisol mostrou conter o efeito de tamanho avantajado na determinação de dominância entre pares de trutas (Sloman *et al.*, 2000).

O cortisol não apenas tem o potencial de influenciar o sucesso de indivíduos durante encontros sociais, mas após o estabelecimento da hierarquia, uma elevação dos níveis de cortisol no plasma é uma característica associada com o status social de subordinação (Overli *et al.*, 1999; Sloman *et al.*, 2000). As implicações da concentração de cortisol elevada cronicamente em animais subordinados são amplamente verificadas.

Os glucorticóides se ligam no citosol ao receptor de glucorticóides, ativado por um ligante. Após o hormônio se ligar ao receptor, a nova molécula formada se transfere para o núcleo da célula, onde se liga aos elementos de resposta ao glucorticoide na região promotora de genes alvos, resultando na regulação da expressão gênica, em um processo chamado transativação.

Os glucorticóides podem levar a qualidades de carne indesejáveis, semelhante ao gene do Halotano, já que ativa o catabolismo do glicogênio e eleva a produção de lactato (Foury *et al.*, 2005).

Désautés *et al.* (2002) numa tentativa de identificar as bases moleculares de diferentes respostas neuroendócrinas ao estresse, por varredura de QTL, utilizando cruzamentos divergentes entre Large White e Meishan, constatou que a evidência mais forte para a existência de QTL foi para os níveis de cortisol, já que a raça Meishan possui maiores níveis de cortisol quando comparados com raças ocidentais.

Désautés *et al.* (2002) encontraram evidência de QTL no cromossomo 7 de suíno afetando os níveis de cortisol. O QTL explica, respectivamente 7,7% e 20,7% da variância fenotípica do nível basal de cortisol e do nível de cortisol após os animais serem expostos a uma situação estressante. Os alelos do Meishan são

associados a níveis mais elevados de cortisol e são parcialmente dominantes (para níveis de cortisol após o desafio) sobre os alelos do Large White.

Essas diferenças neuroendócrinas podem ter importante consequência funcional já que os glucorticóides influenciam as vias metabólicas, o sistema imune e numerosas funções cerebrais (Dallman *et al.*, 1993). Como exemplo, o cortisol aumenta o catabolismo de proteínas em tecidos periféricos, a síntese de glicose no fígado e a deposição de gordura. Dessa maneira, pode ter um impacto negativo no crescimento e na deposição de proteínas, como observado em suínos da raça Meishan.

2.4.3 - Globulina de ligação de corticosteróides (CBG)

A globulina de ligação de corticosteróides é o carreador específico de cortisol no plasma. Existem evidências que a CBG influencia tanto a concentração de cortisol quanto a composição de carcaça (Geverink *et al.*, 2006).

Para características de gordura, um QTL foi encontrado no cromossomo 7 de suínos, na região SLA - *swine leukocyte antigens* (Milan *et al.*, 2002). Um QTL próximo apresentou associação com os níveis basais e pós-estresse de cortisol (Désautés *et al.*, 2002), com peso do lombo, e associação sugestiva com conteúdo de carcaça magra (Milan *et al.*, 2002). O gene *Cbg*, que codifica CBG está mapeado no mesmo loco do pico para este QTL.

Efeitos da capacidade máxima de ligação do CBG foram encontrados em fêmeas Meishan x Large White, onde indivíduos com maiores capacidades de ligação estavam associados à maior perda por gotejamento (Geverink, 2006).

Por meio de mapeamento genético comparativo foi constatado que o gene codificando CBG, localizado no cromossomo 7 de suínos e que apresenta influência no nível de cortisol, foi também mapeado neste mesmo loco em diferentes espécies, de maneira que o gene *Cbg* é uma posição de interesse e um gene candidato funcional. Outros mecanismos como a eficiência ou afinidade dos receptores de

corticosteróides, reconhecidos por agregar variação genética em experimentos animais, devem também ser explorados em animais domésticos (Mormede *et al.*, 2002).

2.4.4 - Catecolaminas

Como foi dito anteriormente, além do eixo HPA, outro sistema é ativado pela resposta ao estresse, o sistema simpaticoadrenal, leva a liberação de catecolaminas.

Catecolaminas são hormônios liberados pelas glândulas adrenais em situações de estresse, como estresse fisiológico e baixos níveis de açúcar no sangue. As catecolaminas geram uma mudança fisiológica no organismo que prepara o corpo para uma atividade física (luta ou fuga em encontros). Alguns efeitos típicos são o aumento na taxa cardíaca, na pressão arterial e em níveis de glucose no sangue (Dale *et al.*, 2008).

As mais abundantes catecolaminas são epinefrina (adrenalina), noraepinefrina (noradrenalina) e dopamina, as quais são produzidos de fenilalanina e tirosina.

A dopamina é a primeira catecolamina a ser sintetizada e é comumente associada com eventos de aprendizagem. Noraepinefrina e epinafrina são derivadas de futuras modificações da dopamina na via de síntese de catecolaminas (Dale *et al.*, 2008).

Altos níveis de catecolamina no sangue são associados com situações de estresse, que pode ser induzido por reações fisiológicas desencadeadas por ambientes estressantes.

A principal enzima responsável pela degradação das catecolaminas é a monoamina oxidase (MAO). Uma deficiência na MAO pode ser responsável por uma considerável elevação da quantidade desses neurotransmissores na circulação (Sabol *et al.*, 1998).

Além da deficiência na MAO, polimorfismos nos genes que codificam as enzimas que participam da via de síntese de catecolaminas também podem gerar variabilidade nos níveis de catecolamina na população.

2.4.5 - Monoamina oxidase – MAO

As monoaminas são aminoácidos aromáticos, neurotransmissores que contêm um grupo amino ligado a um anel aromático. MAO são enzimas que catalizam a oxidação destas monoaminas. Elas são encontradas ligadas na membrana externa de mitocôndrias na maioria dos tipos de células.

Polimorfismos na região promotora, que geram uma baixa atividade de expressão da MAO foi apontado como um dos responsáveis por comportamento anti-social. O mecanismo sugerido para o efeito da baixa atividade da MAO é uma queda na capacidade de degradar rapidamente noraepinefrina, um neurotransmissor simpático envolvido no aumento da fúria com que os animais reagem em situações de estresse (Sabol *et al.*, 1998).

2.4.6 - Serotonina

No sistema nervoso central, a serotonina tem um importante papel como um neurotransmissor na modulação da raiva, agressão, temperatura corporal, ânimo, sono, apetite e no metabolismo. Níveis de serotonina no cérebro apresentam associações com a agressividade (Lesch *et al.*, 1996).

A serotonina tem amplas atividades no cérebro, e variações genéticas nos receptores de serotonina e transportadores de serotonina implicam em disfunções neurológicas.

Neurotransmissores, como a serotonina, não são proteínas, e não fariam parte do dogma central da genética, DNA - RNA – proteína, mas proteínas tem um papel importante na síntese, absorção ou degradação de neurotransmissores. A serotonina

é sintetizada a partir de um aminoácido, o triptofano, em um processo que é realizado em duas etapas, a primeira pela ação da enzima triptofano hidroxilase (Tph) e a segunda pela ação de enzimas que descarboxilem aminoácidos aromáticos (Caspi *et al.*, 2003). Como a TPH é uma enzima específica, ao contrário da enzima que regula a segunda etapa, ela é a proteína limitante na síntese de serotonina, podendo assim ser considerado um gene candidato na expressão da agressividade. Já a degradação da serotonina é realizada por duas enzimas específicas, MAO A e MAO B e a ação da serotonina depende também de proteínas transportadoras específicas e receptores de serotonina. Um problema surgiu quando Walther (2003), estudando a síntese de serotonina por meio de *knockout* do gene *Tph* em camundongos, viu que os níveis de serotonina no sangue estavam ausentes, mas que praticamente não havia se alterado nas estruturas cerebrais. Assim foi descoberto que a síntese de serotonina é realizada por dois genes, sendo que um deles é expresso na glândula pituitária e um segundo gene que é expresso no tecido cerebral, sendo chamados de Tph 1 e Tph 2.

2.5 - QTL DE EFEITOS ASSOCIATIVOS

O QTL de efeito associativo é uma região do genoma de um animal que, juntamente com os efeitos ambientais e a interação genótipo x ambiente, definirá o comportamento que o animal terá dependendo do ambiente social em que ele vive, contribuindo dessa maneira com a formação deste ambiente social.

O principal problema no estudo destes QTL é como o comportamento é definido e quantificado em experimentos envolvendo QTL associativo. Existem três razões para que isso aconteça. A primeira é que, apesar do mesmo nome ser usado para determinar uma característica em diferentes estudos, a definição dela é diferente em cada estudo. A segunda razão é que a idade dos animais que estão sendo usados no estudo pode ser diferente. Características comportamentais mensuradas em animais jovens e adultos podem ser influenciadas por tipos

motivacionais diferenciados, o que significaria que seriam características diferentes. A terceira razão é que a comparação de características comportamentais entre espécies pode ser muito difícil, como comparar o comportamento de galinhas com o de camundongos (Candland e Nagy, 1969, citado por Jensen *et al.*, 2008)

Porém, características comportamentais podem ser tratadas da mesma maneira que qualquer outra característica fenotípica, desde que existam linhas divergentes disponíveis. Em bovinos e suínos não existem muitos trabalhos com detecção de QTL para características comportamentais, embora em galinhas o número de trabalhos seja maior.

Comportamento amedrontado indica uma situação de estresse e pode ser registrado avaliando locomoção, defecação, vocalização e atividade exploratória. Normalmente animais amedrontados se movimentam menos, defecam mais frequentemente e não possuem atividade exploratória. Buitenhuis *et al.* (2004) mostraram que diferentes QTLs foram encontrados em diferentes idades, indicando que o mecanismo genético por trás do comportamento amedrontado é diferente entre jovens e adultos. Beaumont *et al.* (2005) estudaram o comportamento de aves testando os animais em um ambiente desafiador em codornas, que pode ser usado como um modelo paralelo para o comportamento em galinhas, mas até o momento poucos QTLs foram identificados por essa metodologia.

A alteração dos níveis de glicose antes e após uma situação estressante pode ser usado como uma característica fenotípica para o estudo de QTL comportamental, já que o aumento da quantidade de glicose é desencadeada pelas catecolaminas liberadas em resposta ao estresse.

Em estudo de mapeamento genético, Désautés (2002) encontrou um QTL no cromossomo 8 de suínos que explica 7% da variância fenotípica de glicemia após o estresse. Uma situação semelhante ocorre no cromossoma 1, onde outro QTL significativo explica 6 % dessa variância. Outros dois QTLs afetando a glicemia após o estresse foram encontrados nos cromossomos 3 e 5. Alelos da raça Meishan foram associados com altos valores de glicose antes do desafio no cromossoma 3 e

níveis baixos de glicose antes e após o desafio no cromossoma 5. No mesmo trabalho os autores localizaram um QTL com nível sugestivo no cromossomo 17 em suínos que explicava 12 % da variância fenotípica dos níveis de ACTH (hormônio liberado pela glândula pituitária que estimula a produção de cortisol) após uma situação estressante, sendo que a raça Meishan apresentou os menores níveis de ACTH. O autor constatou que um QTL para locomoção foi encontrado em uma região próxima ao QTL para níveis de ACTH mensurado após o desafio, indicando que o teste com ambiente desafiador é realmente uma maneira de se medir o nível de amedrontamento dos animais.

Buitenhuis *et al.* (2004) realizaram estudo de QTL para comportamento de bicar as penas dos companheiros em duas linhas comerciais de Leghorn, diferenciando na propensão por esse comportamento, em aves jovens e adultas. O QTL detectado foi diferente dependendo da idade. Também foi realizado um estudo para saber a predisponibilidade genética para sofrer a depenagem e QTLs diferentes para diferentes idades também foram encontrados.

3 - MATERIAL E METODOS

Os dados foram gerados por simulação, considerando que o gene associativo agia de duas maneiras: influenciando na predisposição do animal a se envolver em disputas por uma melhor posição na ordem hierárquica, tendo um efeito gerado pela agressividade entre os animais; e outra considerando as vantagens dos animais em posições mais elevadas nesta ordem, por terem acesso diferenciado aos recursos.

Dois grandes conjuntos de simulações foram realizados, um considerando o gene associativo agindo das duas maneiras e outro agindo apenas pelas vantagens do acesso diferenciado aos recursos.

Dentro desses dois grandes conjuntos de simulação foram considerados diferentes níveis de efeitos para um *major gene* direto, com efeito direto sobre o fenótipo do animal, e diferentes níveis de efeitos para um *major gene* associativo, com efeitos sobre o fenótipo dos companheiros de grupo. O gene associativo agia como um efeito epistático entre genes de diferentes indivíduos, diminuindo a expressão do *major gene* direto nos companheiros de grupo.

3.1 - SIMULAÇÃO

Os dados utilizados foram simulados usando o programa Genesys (Euclides, 1996), escrito na linguagem Fortran e que é capaz de simular genomas, efeitos de genes e populações com diferentes parâmetros.

A espécie escolhida para ser estudada foi o suíno. Suínos possuem diversas formas de interação que os tornam interessantes no estudo dos princípios comportamentais. Além dos conflitos que ocorrem na fase neonatal durante a amamentação, uma competição dentro de leitegada que persiste durante toda a lactação, e da competição pós desmama, quando os animais vão para a recria, eles possuem características de defenderem seus recursos, várias formas de agressão e um rico repertório de comunicação vocal.

Com a escolha da espécie já definida, a simulação foi feita em quatro etapas: a simulação do genoma da espécie, a simulação da população inicial, a simulação dos efeitos dos genótipos e então a simulação dos dados usando as informações simuladas.

3.1.1 - Simulação do genoma

A simulação do genoma foi feita considerando 200 QTL espalhados por 20 cromossomos, compreendendo um genoma de 2.471 cM. Dois destes QTL foram transformados em dois *major genes*. Um deles, o *major gene* A (com dois alelos, A e a), foi simulado tendo efeito direto sobre a característica simulada. O outro, o *major gene* B (também com dois alelos, B e b) foi simulado tendo efeito associativo sobre o *major gene* A em companheiros da mesma baia. Este efeito será detalhado posteriormente, mas basicamente o gene B irá influenciar a expressão do gene A dos animais pertencentes ao mesmo grupo.

Foram simulados os dados de uma característica com média 300 e herdabilidade de 0,30, sem efeito de sexo, com os efeitos aditivos dos QTL simulados seguindo distribuição normal e as frequências iniciais dos locos quantitativos simuladas com distribuição uniforme e valor inicial médio de 0,50. Os efeitos ambientais não controláveis foram simulados seguindo distribuição normal.

3.1.2 - Simulação da População

Para a simulação da população, primeiramente foi simulada uma população base constituída por 500 machos e 500 fêmeas, a partir do genoma simulado anteriormente. Esta simulação envolveu a união aleatória de gametas obtidos da simulação dos genomas e não existe nenhum parentesco entre os animais da população base.

A partir desta população foram selecionados e cruzados ao acaso 20 machos e 337 fêmeas. Dos filhos gerados destes cruzamentos, foram escolhidos animais ao acaso formando 11 classes de grupos, com 10 animais em cada grupo e estabelecendo-se 34 repetições para cada classe de grupo, formando uma população de 3740 indivíduos. As classes foram compostas por diferentes números de animais portadores do alelo dominante para o gene associativo em cada grupo, variando de zero indivíduo B_ a 10 indivíduos B_.

3.1.3 - Simulação dos efeitos do *major gene* direto

A mesma simulação (mesmos animais com os mesmos genótipos) foi repetida considerando em cada simulação um efeito diferente para o *major gene* direto. Os diferentes efeitos do *major gene* direto contribuíram com 1%, 3% e 5% do valor médio do fenótipo, quando expressos de maneira otimizada.

Considerando a simulação de dados fenotípicos com média 300, os indivíduos AA e Aa (dominância completa) tiveram um acréscimo de 3, 9 e 15 unidades no valor dos seus respectivos fenótipos para cada nível de efeito do *major gene* direto (1%, 3% e 5%), que serão somadas com as contribuições aditivas dos outros 198 QTL, enquanto que animais homozigotos recessivos terão um acréscimo de zero a essa soma.

3.1.4 - Simulação dos efeitos do *major gene* associativo

A simulação dos efeitos associativos merece um cuidado especial devido à complexidade e dinamismo deste efeito. Foi simulado um *major gene* associativo (gene B) que influencia a expressão do *major gene* citado anteriormente (gene A), nos animais companheiros de grupo.

O efeito associativo foi dividido em dois componentes, baseados na natureza do efeito. O primeiro componente é o efeito associativo que ocorre antes do estabelecimento de uma ordem hierárquica, fase pré-hierárquica, que é originado das agressões entre os animais até que a ordem hierárquica seja estabelecida. Essas agressões geram desperdício de energia, injúria nos animais, estresse, queda do sistema imune e acabam por influenciar a expressão do *major gene* com controle sobre valores fenotípicos da característica produtiva simulada. O segundo componente é o efeito associativo gerado após a ordem hierárquica ter sido estabelecida, fase pós-hierárquica, e o efeito ocorre devido ao acesso diferenciado entre os animais aos recursos.

Devido à complexidade que envolve a interação entre os animais, alguns pressupostos foram considerados para que fosse possível realizar a simulação:

- 1) os animais não possuem preferência por interagir mais com um animal do que com outro, as interações entre os animais ocorrem na mesma proporção. É fato que isto não é o que realmente acontece, já que quanto mais distantes na ordem hierárquica menor será a interação entre dois indivíduos. Para minimizar as consequências deste pressuposto e realizar uma simulação mais aproximada do real, foi considerado que o efeito da interação entre indivíduos portadores do alelo dominante (B_{-}) é diferenciado da interação entre estes indivíduos e animais homozigotos recessivos (bb);
- 2) o *major gene* associativo tem efeito apenas sobre o *major gene* com efeito direto, e sobre nenhum outro gene que possua um controle sobre a característica avaliada;
- 3) o *major gene* associativo é o único gene com efeito associativo simulado;
- 4) apesar do efeito associativo ser acumulativo à medida que o número de animais portadores do alelo B aumenta no grupo, o *major gene* de efeito direto nunca tem sua expressão 100% reduzida para o efeito associativo pós-hierárquico e, à medida que o número de animais agressivos em um grupo aumenta, o efeito prejudicial de cada indivíduo B_{-} vai diminuindo, de maneira que o efeito total de indivíduos B_{-} no grupo não assume uma função linear;
- 5) animais homozigotos recessivos para o gene associativo não participam de disputas por ordem hierárquicas, nem com indivíduos portadores do alelo dominante, nem com indivíduos homozigotos recessivos e; animais com genótipos iguais têm o mesmo acesso aos recursos entre eles. Embora esta última suposição seja arriscada de assumir, ela foi necessária para facilitar a simulação. É considerado na simulação que todo recurso consumido em excesso por indivíduos B_{-} são subtraídos dos recursos acessados pelos

indivíduos bb (que os dividem igualitariamente). No caso do grupo ser formado apenas por indivíduos B_, todos tem o mesmo acesso aos recursos, e o efeito associativo é apenas devido à agressividade entre os animais.

A partir destas pressuposições foram estabelecidos os efeitos que o *major gene* associativo teria sobre o *major gene* de efeito direto. Como esse efeito varia dependendo da composição de indivíduos B_ e bb nos grupos, foram criadas 11 classes de grupos, gerando 11 ambientes sociais diferentes, com grupos compostos de nenhum animal B_ até grupos com 100% dos animais com genótipo B_, sendo as classes definidas pelo percentual de animais B_ no grupo.

Para o efeito associativo pré-hierárquico, foi assumido que a presença de um animal B_ gerou diminuição de 8% na expressão do *major gene* com efeito direto (A) de outro animal B_ (ressaltando a pressuposição de que animais B_ não disputam hierarquia com animais bb), sendo que este valor arbitrário de 8% foi multiplicado pelo número de companheiros portadores do alelo dominante, e que animais homozigotos recessivos (bb) não têm a expressão do gene A prejudicada pelo o efeito pré-hierárquico (ressaltando o pressuposto de que animais recessivos não entram em conflitos por disputas hierárquicas).

Para o efeito associativo pós-hierárquico foram assumidos quatro níveis de efeito do *major gene* associativo sobre a expressão do *major gene* de efeito direto. Assumiu-se que a presença de um animal B_ no grupo causou, para cada um dos níveis, uma diminuição de 5%, 10%, 20% ou 30% no valor que o *major gene* com efeito direto acrescentaria ao valor fenotípico dos companheiros de baixa homozigotos recessivos bb (ressaltando o pressuposto de que animais com genótipos iguais têm o mesmo acesso aos recursos), sendo que à medida que o número de indivíduos B_ no grupo aumenta, o valor dessas porcentagens assume uma função produtória e não somatória (para mais de um animal B_ no grupo, o efeito associativo ocorre por acúmulo de produtos, ao invés do acúmulo de somas como no

caso do efeito pré-hierárquico), assegurando a pressuposição de que o *major gene* de efeito direto nunca tenha sua expressão 100% reduzida.

Na Tabela 1 são representas as percentagens de expressão do *major gene* de efeito direto (A) nos animais portadores dos genótipos associativos B₋ (para o efeito associativo pré-hierárquico) e bb (para os quatro níveis de efeito pós-hierárquico), segundo o número de animais portadores do alelo B compondo cada grupo, usados para simulação dos dados.

Tabela 1- Porcentagem de expressão do *major gene* direto A, para as diferentes classes de grupo, considerando os efeitos associativos pré-hierárquico (efeito associativo sobre indivíduos BB/Bb) e os quatro níveis simulados de efeitos pós-hierárquicos (efeito associativo sobre indivíduos bb).

Grupo	Composição do grupo	Efeito associativo pré-hierárquico em indivíduos BB/Bb	Efeito associativo pós-hierárquico em indivíduos bb considerando diferentes níveis			
			5%	10%	20%	30%
1	0 B ₋ e 10 bb	.	100%	100%	100,0%	100,0%
2	1 B ₋ e 9 bb	100%	95,0%	90%	80,0%	70,0%
3	2 B ₋ e 8 bb	92%	90,2%	81%	64,0%	49,0%
4	3 B ₋ e 7 bb	84%	85,7%	73%	51,2%	34,3%
5	4 B ₋ e 6 bb	76%	81,4%	66%	40,9%	24,0%
6	5 B ₋ e 5 bb	68%	77,3%	59%	32,8%	16,8%
7	6 B ₋ e 4 bb	60%	73,4%	54%	26,2%	11,7%
8	7 B ₋ e 3 bb	52%	69,7%	48%	20,9%	8,2%
9	8 B ₋ e 2 bb	44%	66,2%	43%	16,7%	5,7%
10	9 B ₋ e 1 bb	36%	62,9%	39%	13,4%	3,9%
11	10 B ₋ e 0 bb	28%	.	.	.	.

Com base na divisão dos efeitos associativos em efeitos pré e pós-hierárquicos, dois tipos de ação do gene associativo foram simulados: um em que o gene associativo apenas atua no estágio pós-hierárquico, devido à distribuição diferenciada dos recursos, e outro em que o gene associativo teve tanto efeito pré como pós-hierárquico, porém se comportando de maneira diferente em cada um dos efeitos. A simulação apenas com efeito pós-hierárquico simulou uma situação em que os animais portadores de alelos associativos dominantes não são agressivos, mas

acabam por gerar vantagens no acesso aos recursos sem que seja necessário o envolvimento de disputas.

Já a simulação com efeitos pré e pós-hierárquicos considerou que este gene está relacionado com a agressividade do animal, sendo o alelo dominante correlacionado com uma maior agressividade e insatisfação de pertencer a níveis inferiores na ordem hierárquica.

Portanto, dentro do mesmo grupo, o efeito do *major gene* associativo sobre o *major gene* com efeito direto dependeu do genótipo do *major gene* associativo, do número de animais portadores do alelo B e do tipo de ação do gene associativo (pré e pós-hierárquico ou apenas pós-hierárquico).

Além das simulações considerando os efeitos associativos, dados também foram feitas simulações considerando apenas os três níveis de efeitos do *major gene* direto, sem os efeitos associativos. Esta situação representa as granjas núcleo, onde os animais são testados em gaiolas individuais.

3.2 – ANÁLISES DOS DADOS

Os cenários sugeridos de ocorrerem em estudos de identificação de *major genes* foram avaliados considerando tanto o *major gene* direto como o *major gene* de efeito associativo como tendo efeito direto sobre o fenótipo dos indivíduos, simulando a maneira como os dados seriam comumente analisados na tentativa de identificação de *major genes*.

O cenário I, sobre a possibilidade de genes associativos diminuírem o poder de detecção de um *major gene* com efeito direto, foi avaliado com base na seguinte hipótese de nulidade:

$$H_0: \mu_{AA} = \mu_{Aa} = \mu_{aa}.$$

O cenário II, sobre a possibilidade de *major genes* associativos serem identificados como *major genes* para efeitos diretos, foi avaliado com base na seguinte hipótese de nulidade:

$$H_0: \mu_{B_1} = \mu_{B_2}$$

Os testes de média para a identificação dos *major genes* foram feitos por análise de variância, com as diferenças entre as médias descritas pelo teste SNK, Student-Newman-Keuls, ao nível de significância de 1%.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estatísticas descritivas dos dados genotípicos e fenotípicos, para todas as combinações de níveis de efeitos dos *major genes* simulados, como as médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos e os coeficientes de variação, são apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

De maneira geral as médias das simulações aumentaram à medida que o efeito do *major gene* direto aumentava, mas dentro de um nível de efeito direto médias diminuíram a medida que os níveis de efeitos associativos aumentavam.

Todas as simulações feitas possuíam o efeito residual com distribuição normal com média zero e variância de 71,133. Nos dados simulados sem os efeitos dos dois *major genes* direto e associativo a variância genética aditiva gerada pelos 198 QTL foi igual a 25,755.

Tabela 2- Valores das médias fenotípicas para as diferentes combinações de níveis de efeitos dos *major genes* (MG) e seus respectivos desvios-padrão (DP), valores mínimos, máximos e coeficientes de variação (CV).

Níveis de Efeito do MG Direto	Níveis de Efeito do MG Associativo	Média	DP	Mínimos	Máximos	CV%
1%	5%	298,928	9,864	267,480	332,680	3,290
	10%	298,812	9,857	267,480	332,680	1,730
	20%	298,620	9,850	267,180	332,680	3,299
	30%	298,489	9,848	266,880	332,680	3,299
3%	5%	302,073	10,315	269,120	338,680	3,415
	10%	301,699	10,246	269,120	338,680	3,396
	20%	301,123	10,196	269,120	338,680	3,386
	30%	300,729	10,189	269,082	338,680	3,388
5%	5%	305,209	11,173	269,120	344,680	3,661
	10%	304,585	10,994	269,120	344,680	3,610
	20%	303,626	10,868	269,120	344,680	3,579
	30%	302,970	10,853	269,120	344,680	3,582

Tabela 3 - Valores das médias genotípicas para as diferentes combinações de níveis de efeitos dos *major genes* (MG), e seus respectivos desvios-padrão (DP), valores mínimos, máximos e coeficientes de variação (CV).

Níveis de Efeito do MG Direto	Níveis de Efeito do MG Associativo	Média	DP	Mínimo	Máximo	CV%
1%	5%	298,882	5,183	280,660	318,480	1,734
	10%	298,766	5,170	280,660	318,480	1,730
	20%	298,574	5,157	280,660	318,480	1,727
	30%	298,443	5,153	280,660	318,480	1,727
3%	5%	302,027	6,014	280,660	320,860	1,991
	10%	301,653	5,894	280,660	320,410	1,954
	20%	301,077	5,806	280,660	319,510	1,928
	30%	300,683	5,791	280,660	318,610	1,926
5%	5%	305,163	7,402	280,660	326,560	2,426
	10%	304,539	7,130	280,660	325,810	2,341
	20%	303,580	6,931	280,660	324,310	2,283
	30%	302,924	6,905	280,660	322,81	2,279

Nas Tabelas 4 e 5 são exibidos os valores aproximados das variâncias fenotípicas e genéticas aditivas para as simulações feitas considerando efeitos associativos pré e pós-hierárquicos (Tabela 4) ou considerando apenas efeito pós-hierárquico (Tabela 5).

Tabela 4 – Valores das variâncias fenotípicas e genéticas aditivas para as diferentes combinações de efeitos dos *major genes*, e suas respectivas herdabilidades, em simulações considerando os efeitos associativos pré e pós-hierárquicos.

MGD*	1%					3%					5%				
MGA**	0 ***	5	10	20	30	0 ***	5	10	20	30	0 ***	5	10	20	30
σ_F^2	97,77	97,29	97,15	97,03	96,99	110,82	106,41	104,97	103,96	103,81	137,27	124,83	120,87	118,12	117,79
σ_A^2	27,09	26,87	26,73	26,60	26,55	39,80	36,17	34,74	33,71	33,53	65,92	54,79	50,83	48,04	47,68
h^2	0,27	0,28	0,28	0,27	0,27	0,36	0,34	0,33	0,32	0,32	0,48	0,44	0,42	0,41	0,40

* - Níveis de efeito do *major gene* direto;

** - Níveis de efeito do *major gene* associativo;

*** - Granja Núcleo (sem efeito associativo).

Tabela 5 – Valores das variâncias fenotípicas e genéticas aditivas para as diferentes combinações de efeitos dos *major genes*, e suas respectivas herdabilidades, em simulações considerando o efeito associativo pós-hierárquico.

MGD*	1%					3%					5%				
MGD**	0 ***	5	10	20	30	0 ***	5	10	20	30	0 ***	5	10	20	30
σ_F^2	97,77	97,62	97,59	97,68	97,78	110,82	109,45	109,22	110,06	111,17	137,27	133,46	132,84	135,23	138,41
σ_A^2	27,09	26,94	26,91	26,98	27,08	39,80	38,44	38,21	39,03	40,12	65,92	62,12	61,50	63,85	67,00
h^2	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,36	0,35	0,35	0,35	0,36	0,48	0,47	0,46	0,47	0,48

* - Níveis de efeito do *major gene* direto;

** - Níveis de efeito do *major gene* associativo;

*** - Granja Núcleo (sem efeito associativo).

Quando os dados foram analisados incluindo o efeito do *major gene* direto mas considerando os efeitos associativos iguais a zero (granjas núcleo), as variâncias genéticas aditivas assumiram valores entre 27,089 e 65,918, dependendo do nível do efeito do *major gene* direto, sendo este *major gene* responsável por 4,92% a 60,93% da variância genética aditiva.

A herdabilidade da característica, sem considerar os efeitos dos dois *major genes*, foi de 0,26, herdabilidade esta gerada pelos 198 QTL simulados. Com o efeito do *major gene* direto os valores foram 0,28, 0,36 e 0,48 para os níveis 1%, 3% e 5%, respectivamente.

Quando foram incluídos os efeitos associativos, considerando a simulação apenas com efeitos associativos pós-hierárquicos (Tabela 5), as herdabilidades assumiram um valor constante dentro dos níveis de efeito do *major gene* direto, independentemente do nível do efeito associativo. Este valor constante provavelmente ocorreu porque o efeito associativo apenas é acometido sobre indivíduos bb, e a medida que o número de animais B_ aumenta no grupo, menor é o número de indivíduos bb que sofrem diminuição da expressão do *major gene* direto A, não causando mudanças elevadas na variância genética aditiva da população. Porém quando a simulação considerou efeitos pré e pós-hierárquicos (Tabela 4), com o efeito associativo sobre todos os indivíduos, os valores tenderam a decrescer à medida que o efeito do *major gene* associativo aumentava, com exceção para o efeito de nível de 1% do *major gene* direto (Figura 1).

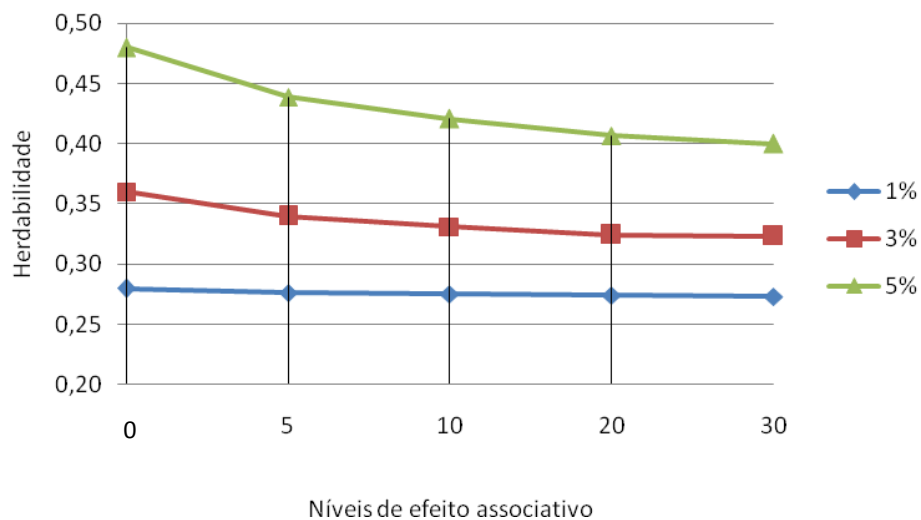


Figura 1 – Distribuição dos valores das herdabilidades obtidas com simulações considerando efeitos pré e pós-hierárquicos, para os três diferentes níveis de efeito genético variando cinco níveis de efeito associativo, considerando nas granjas núcleo a ausência do efeito.

Esta situação deve-se ao fato que o efeito associativo simulado gera uma diminuição na otimização da expressão do *major gene* direto, o que leva a uma subestimativa da variância genética e conseqüentemente redução da herdabilidade.

Porém, se os efeitos associativos fossem levados em consideração no modelo, os efeitos dos genes associativos seriam uma fonte a mais de genes a serem selecionados, o que tenderia a aumentar o valor da herdabilidade da característica (Bijma *et al.*, 2007b).

Essas diferentes estimações dos componentes de variâncias levam a diferentes predições do valor genético dos animais quando criados em granjas núcleo ou quando criados em granjas comerciais.

4.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS MAJOR GENES

4.1.1 - Identificação de *major gene* considerando o cenário I

As análises, tanto da simulação considerando o efeito do gene associativo atuando na fase pré e pós-hierárquica como da simulação considerando apenas os efeitos associativos atuando na fase pós-hierárquica, mostraram que, independentemente do nível do efeito do *major gene* direto e do nível do efeito do *major gene* associativo, todos os resultados indicaram efeito significativo do *major gene* direto A sobre o fenótipo, a 1% de significância, pelo teste SNK (Tabelas 6 e 7).

Como se pode notar nas Tabelas 6 e 7, a análise feita com 3740 indivíduos possui um número grande de graus de liberdade do resíduo, o bastante para reduzir o valor do quadrado médio do resíduo a valores que dificilmente tornariam o valor do F calculado menor que F tabelado, caso a fonte de variação realmente estivesse influenciando a característica, como neste o caso.

Um fator que está sendo determinante para a significância dos resultados é a contribuição que o *major gene* direto, sem o efeito associativo, está tendo para a variância genética: 4,9% para o nível de 1%; 35,29 para o nível de 3% e 60,9% para o nível de 5% de efeito. Dessa maneira, mesmo na presença de efeitos associativos, o *major gene* direto é responsável por uma considerável porcentagem da variância genética, o que torna sua identificação mais provável.

Tabela 6 – Análise de variância do *major gene* direto, para as diferentes combinações de efeitos dos genes simulados, considerando efeitos associativos pré e pós-hierárquicos.

Níveis de Efeito do MG ^a Direto	Níveis de Efeito do MG ^a Associativo	FV	GL	QM	F	Pr > F
1%	5%	Gen. MGD ^b	2	1250,683	12,960	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,492		
	10%	Gen. MGD ^b	2	1043,677	10,810	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,516		
	20%	Gen. MGD ^b	2	762,128	7,890	0,0004**
		Residuo	3726	96,580		
	30%	Gen. MGD ^b	2	594,885	6,160	0,0021**
		Residuo	3726	96,622		
3%	5%	Gen. MGD ^b	2	12589,730	129,630	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,122		
	10%	Gen. MGD ^b	2	10615,718	109,320	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,106		
	20%	Gen. MGD ^b	2	7911,617	81,250	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,378		
	30%	Gen. MGD ^b	2	6289,825	64,420	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,643		
5%	5%	Gen. MGD ^b	2	35742,193	362,67	< 0,0001**
		Residuo	3726	98,5532		
	10%	Gen. MGD ^b	2	30197,1715	306,95	< 0,0001**
		Residuo	3726	98,3787		
	20%	Gen. MGD ^b	2	22593,8049	228,31	< 0,0001**
		Residuo	3726	98,9628		
	30%	Gen. MGD ^b	2	18021,4874	180,87	< 0,0001**
		Residuo	3726	99,6404		

^a – *major gene*; ^b – genótipos do *major gene* direto.

A simulação considerando o nível de 1% de efeito direto, em que a porcentagem de contribuição na variância foi de 4 a 4,9% da variância genética, dependendo dos níveis de efeito associativo, pode ser considerada a simulação mais aproximada das situações reais. Porém mesmo para esta situação o efeito associativo não foi capaz de mascarar a identificação do *major gene* direto.

Tabela 7 – Análise de variância do *major gene* direto, para as diferentes combinações de efeitos dos genes simulados, considerando efeitos associativos pós-hierárquicos.

Níveis de Efeito do MG ^a Direto	Níveis de Efeito do MG ^a Associativo	FV	GL	QM	F	Pr > F
1%	5%	Gen. MGD ^b	2	2400,183	24,860	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,556		
	10%	Gen. MGD ^b	2	2110,517	21,840	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,639		
	20%	Gen. MGD ^b	2	1700,960	17,580	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,782		
	30%	Gen. MGD ^b	2	1446,090	14,930	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,868		
3%	5%	Gen. MGD ^b	2	23449,462	242,120	< 0,0001**
		Residuo	3726	96,852		
	10%	Gen. MGD ^b	2	20725,386	212,860	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,364		
	20%	Gen. MGD ^b	2	16869,215	171,530	< 0,0001**
		Residuo	3726	98,348		
	30%	Gen. MGD ^b	2	14458,777	146,030	< 0,0001**
		Residuo	3726	99,009		
5%	5%	Gen. MGD ^b	2	66190,389	680,050	< 0,0001**
		Residuo	3726	97,332		
	10%	Gen. MGD ^b	2	58561,865	593,780	< 0,0001**
		Residuo	3726	98,626		
	20%	Gen. MGD ^b	2	47755,745	471,960	< 0,0001**
		Residuo	3726	101,186		
	30%	Gen. MGD ^b	2	40995,306	398,150	< 0,0001**
		Residuo	3726	102,964		

^a – *major gene*; ^b – genótipos do *major gene* direto.

No entanto, deve-se lembrar que foi simulado o efeito de apenas um gene associativo atuando sobre o *major gene* direto e ressaltar que a expressão de um gene provavelmente seja controlado por vários genes de efeito associativo. Como na simulação foi considerado apenas o efeito associativo do *major gene* e não foi considerado o *background* genético associativo que compõe a população, pode ocorrer que mais de um gene associativo atuando sobre o mesmo *major gene* direto seja capaz de mascarar a identificação deste *major gene*.

Considerando então uma situação real em que o mecanismo de funcionamento entre o gene associativo e o gene com efeito direto se aproxima de uma das situações simuladas, pode-se afirmar que a identificação de *major genes* diretos não será mascarada pelo efeito associativo, desde que eles tenham efeito que

contribuam para o valor fenotípico com ao menos 1% da média do fenótipo da população.

4.1.2 - Identificação do *major gene* considerando o cenário II

Os resultados da análise do *major gene* associativo, para possível identificação como um *major gene* de efeito direto, apresentaram uma variação dependendo dos níveis dos efeitos e de como funciona o mecanismo de ação do *major gene* associativo (Tabelas 8 e 9). Porém na maioria das análises o resultado foi significativo pelo teste SNK a 1% de probabilidade, confundindo o gene associativo com um *major gene* de efeito direto.

Nas simulações com efeitos associativos pré e pós-hierárquicos (Tabela 8), não foram encontrados resultados significativos para o teste de média entre indivíduos B₋ e bb nas simulações feitas considerando o nível do *major gene* direto com efeito de 1%. Isto é explicável já que quanto menor o efeito do *major gene* direto A, menor será o efeito associativo sobre este gene A nos indivíduos B₋ e bb, pois a magnitude deste efeito associativo é dependente do efeito do gene direto A. Porém, na simulação considerando apenas o efeito associativo pós-hierárquico (Tabela 9), o gene associativo foi identificado como um *major gene* de efeito direto até mesmo quando o nível do *major gene* direto foi de 1%, para o nível de 30% de efeito associativo.

Tabela 8 – Análise de variância do *major gene* associativo, para as diferentes combinações de efeitos dos genes simulados, considerando efeitos associativos pré e pós-hierárquicos.

Níveis de Efeito do MG ^a Direto	Níveis de Efeito do MG ^a Associativo	FV	GL	QM	F	Pr > F
1%	5%	Gen. MGA ^b	1	252,681	2,620	0,1057 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,492		
	10%	Gen. MGA ^b	1	45,485	0,470	0,49 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,516		
	20%	Gen. MGA ^b	1	38,698	0,400	0,52 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,580		
	30%	Gen. MGA ^b	1	194,573	2,010	0,15 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,622		
3%	5%	Gen. MGA ^b	1	691,057	7,120	0,0077 **
		Residuo	3726	97,122		
	10%	Gen. MGA ^b	1	1,362	0,010	0,9 n.s. ^c
		Residuo	3726	97,106		
	20%	Gen. MGA ^b	1	1604,984	16,480	< 0,0001 **
		Residuo	3726	97,378		
	30%	Gen. MGA ^b	1	4000,142	40,970	< 0,0001 **
		Residuo	3726	97,643		
5%	5%	Gen. MGA ^b	1	1345,421	13,65	0,0002 **
		Residuo	3726	98,5532		
	10%	Gen. MGA ^b	1	82,4191	0,84	0,36 n.s. ^c
		Residuo	3726	98,3787		
	20%	Gen. MGA ^b	1	5455,49105	55,13	< 0,0001 **
		Residuo	3726	98,9628		
	30%	Gen. MGA ^b	1	12666,2439	127,12	< 0,0001 **
		Residuo	3726	99,6404		

^a – *major gene*; ^b – genótipos do *major gene* associativo; ^c – não significativo.

Também não foram encontrados efeitos significativos nos dados das simulações com efeitos pré e pós-hierárquicos para níveis de efeitos associativos de 10%, com o efeito do *major gene* direto igual a 3% e 5% (Tabela 8), porém o mesmo não foi observado nas simulações com apenas efeitos pós-hierárquicos (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise de variância do *major gene* associativo, para as diferentes combinações de efeitos dos genes simulados, considerando efeitos associativos pós-hierárquicos.

Níveis de Efeito do MG ^a Direto	Níveis de Efeito do MG ^a Associativo	FV	GL	QM	F	Pr > F
1%	5%	Gen. MGA ^b	1	1,736	0,020	0,8933 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,556		
	10%	Gen. MGA ^b	1	109,609	1,130	0,2869 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,639		
	20%	Gen. MGA ^b	1	549,174	5,670	0,0173 n.s. ^c
		Residuo	3726	96,782		
	30%	Gen. MGA ^b	1	971,108	10,030	0,0016 **
		Residuo	3726	96,868		
3%	5%	Gen. MGA ^b	1	642,777	6,640	0,01 **
		Residuo	3726	96,852		
	10%	Gen. MGA ^b	1	2788,699	28,640	< 0,0001 **
		Residuo	3726	97,364		
	20%	Gen. MGA ^b	1	8409,488	85,510	< 0,0001 **
		Residuo	3726	98,348		
	30%	Gen. MGA ^b	1	13199,180	133,310	< 0,0001 **
		Residuo	3726	99,009		
5%	5%	Gen. MGA ^b	1	2439,211	25,060	< 0,0001 **
		Residuo	3726	97,332		
	10%	Gen. MGA ^b	1	9052,923	91,790	< 0,0001 **
		Residuo	3726	98,626		
	20%	Gen. MGA ^b	1	25591,061	252,910	< 0,0001 **
		Residuo	3726	101,186		
	30%	Gen. MGA ^b	1	39447,029	383,110	< 0,0001 **
		Residuo	3726	102,964		

^a – *major gene*; ^b – genótipos do *major gene* associativo; ^c – não significativo.

Um fator que pode estar contribuindo para os resultados significativos dos testes de médias, comparando as médias fenotípicas correspondentes aos diferentes genótipos de efeito associativo, é o número de animais B₋ e bb sofrendo efeito associativo quando agrupados com um número cada vez maior de indivíduos agressivos nas simulações pré e pós-hierárquicas. À medida que se aumenta o número de animais portadores do alelo B em um grupo, o número de animais bb diminui proporcionalmente (Tabela 1). Dessa maneira, o aumento do efeito associativo, definido pelo número de animais B₋ no grupo, afeta uma quantidade cada vez menor de indivíduos bb, sendo que o valor máximo deste efeito associativo, no grupo 10, dentro de cada um dos quatro níveis de efeito associativo considerados, afeta apenas um animal bb.

Já para o efeito associativo que animais B₋ exercem sobre outros animais B₋ (efeito associativo pré-hierárquico), à medida que se aumenta o efeito devido ao aumento do número de animais portadores de B no grupo, aumenta também o número de animais (B₋) que têm o efeito do seu gene A diminuído, ao contrário do que ocorre com o efeito associativo sobre animais bb. Dessa maneira, o efeito associativo que animais B₋ exercem sobre outros animais B₋, que foi considerado de 8% multiplicado pelo número de animais portadores do alelo B no grupo, quando vistos como um valor médio ponderado pelo número de animais sofrendo esse efeito, assume um valor de 38,69%.

Esse fato apenas ocorre devido ao pressuposto de que animais portadores do alelo B nunca seriam privados do acesso aos recursos, que animais homozigotos recessivos para o gene associativo não se envolvem em conflitos durante as disputas hierárquicas e que animais com genótipos iguais não possuem acesso aos recursos de maneira diferenciada.

Na Tabela 10 estão descritas as médias ponderadas do efeito associativo que o alelo B causa sobre o *major gene* A em animais companheiros de grupo portadores e não portadores do alelo B.

Tabela 10 – Efeito associativo médio ponderado (%) das simulações representado pela diminuição em porcentagem do valor que o *major gene* A irá acrescentar na média fenotípica em indivíduos B₋ e bb.

	Efeito Associativo			
	5%	10%	20%	30%
B ₋	38,69	38,69	38,69	38,69
bb	13,64	24,63	41,56	53,14

Percebe-se que o efeito associativo pré-hierárquico sobre animais B₋ possui apenas um nível, sendo que os quatro níveis de efeito associativo testados estão relacionados apenas com o efeito associativo pós-hierárquico, que ocorre sobre os animais portadores do genótipo homozigoto recessivo. Isto representa a idéia de que um mesmo gene associativo pode ter intensidades e comportamentos diferentes

quando relacionado com as consequências geradas pelo acesso diferenciado aos recursos entre os animais ou quando relacionados à disputa por estes recursos.

Essas diferentes maneiras de simular o mecanismo de ação de genes de efeito associativo, como os efeitos gerados pela agressividade ou pelo acesso diferenciado aos recursos, fazem com que a diferença média do valor fenotípico entre indivíduos portadores e não portadores do alelo B varie conforme os níveis dos efeitos associativos variam. No exemplo simulado com efeitos pré e pós-hierárquicos, considerando o nível de 5% do efeito associativo pós-hierárquico (Tabela 1), pode-se notar que animais bb, mesmo ocupando posições inferiores na ordem hierárquica, possuem uma maior expressão do *major gene* direto quando comparados com animais B₋ (exceto para as classes de grupo 2 e 3). Isto os leva a terem um melhor desempenho, pois o efeito associativo gerado pela distribuição diferenciada de recursos não é tão prejudicial quanto o efeito associativo gerado pelas disputas por ordens hierárquicas superiores.

As simulações com efeitos pré e pós-hierárquicos mostraram que, em situações em que o mesmo gene possui diferentes efeitos devido à agressividade ou ao acesso diferenciado aos recursos, diferentes genótipos seriam selecionados dependendo dos níveis de efeito associativo gerados por agressividade e por acesso aos recursos. No exemplo simulado pode-se observar que, considerando os níveis de efeito do gene direto maiores que 3%, se fossem selecionados genótipos do *major gene* associativo como sendo de efeito direto, seriam selecionados animais bb (não agressivos) quando o nível do efeito associativo fosse de 5%, devido ao efeito associativo médio ser menor em indivíduos bb do que em indivíduos B₋ para este nível de efeito associativo, e animais B₋ (agressivos) quando o nível efeito associativo for superior a 20% (Tabela 10).

Essa inversão explica o motivo do *major gene* associativo não ter sido identificado como um *major gene* direto para o nível de efeito associativo pós-hierárquico igual a 10% em simulações considerando os efeitos pré e pós-hierárquicos (Tabela 8).

Para qualquer nível de efeito do *major gene* direto os resultados considerando o nível de 10% de efeito associativo não foram significativos para identificar o *major gene* associativo como sendo um *major gene* direto (Tabela 8). Ou seja, em casos em que tanto os animais portadores do alelo para agressividade como os animais não agressivos sofreram um efeito associativo médio semelhante sobre seus genes de efeito direto, o gene associativo não foi identificado como *major gene* de efeito direto.

Já nas simulações em que apenas o efeito pós-hierárquico foi considerado (Tabela 9), os resultados para o nível de 10% de efeito associativo foram significativo para os níveis de 3% e 5% mas não foi significativo para o nível de efeito de 1% do *major gene* direto.

Portanto, existem dois fatores contribuindo para a identificação do *major gene* associativo como sendo um *major gene* direto: o efeito associativo proporcional sofrido entre indivíduos portadores de alelo com efeito associativo e indivíduos não portadores; e a magnitude do efeito do *major gene* direto que está sofrendo o efeito associativo, já que o efeito associativo está atrelado a este efeito.

Os resultados considerando o nível de 1% do *major gene* direto (o provável de ocorrer com maior frequência em situações reais) indicam que, nas condições em que os dados foram simulados, tanto o *major gene* direto seria identificado em análises como não ocorreria o confundimento de identificar um *major gene* associativo como sendo um *major gene* direto. Como neste nível de efeito o gene direto é responsável por 5 % da variância genética, outros níveis de efeitos de genes deveriam ser testados. Ao se assumir efeitos menores que este, ocorreria um aumento na chance do *major gene* associativo mascarar a identificação do *major gene* direto, contudo seria certo também que o *major gene* associativo não estaria sendo identificado como um *major gene* direto. Porém, ao se assumir efeitos maiores, o efeito associativo não seria capaz de interferir na análise de identificação do *major gene* direto, mas criaria a possibilidade de *major gene* associativo ser identificado como um *major gene* direto.

Um trabalho que suporta a ocorrência da hipótese de genes associativos serem confundidos com genes com efeito direto foi publicado por Désautés *et al.* (2002). Os pesquisadores mapearam um QTL sugestivo no cromossomo 18 para níveis de cortisol no sangue (o hormônio do estresse). Este QTL tem a mesma posição que um QTL relacionado com características de crescimento, mapeado por Bidanel *et al.* (2001), embora nenhum outro QTL associativo encontrado sobrepujasse outros QTL.

5 - CONCLUSÕES

Para as condições simuladas, o *major gene* de efeito associativo não é capaz de mascarar a identificação do *major gene* direto.

O *major gene* associativo é identificado como um *major gene* de efeito direto quando os efeitos do *major gene* direto são de grande magnitude.

Outros estudos, considerando diferentes mecanismos de ação dos efeitos associativos, diferentes combinações de efeitos dos genes, interação diferenciada entre sexos e tamanhos de população semelhantes às que ocorrem em estudos de identificação de *major genes*, devem ser realizados para elucidar a importância dos efeitos associativos nestes estudos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANGO J., MISZTAL, I., TSURUTA, S., CULBERTSON, M., HERRING, W.
Estimation of variance components including competitive effects of large
White growing gilts. **J. Anim. Sci.** 83:1241-1246, 2005.
- ARANGO, J.; MISZTAL, I.; TSURATA, S.; CULBERTSON, M.;
HERRING, W.O.; LONG T. Competitive genetic effects in large white
growing gilts. In: *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied
to Livestock Production*, 2006, Belo Horizonte: Minas Gerais, Brazil, 2006.
- BARABAN SC, HOLLOPETER G, ERICKSON JC, SCHWARTZKROIN PA,
PALMITER RD. Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for
neuropeptide Y. **J Neurosci** 17: 8927–8936, 1997.
- BEAUMONT, C., ROUSSOT, O., FEVE, K., VIGNOLES, F., LEROUX, S.,
PITEL, F., FAURE, J.M., MILLS, A.D., GUEMENE, D., SELLIER, N.,
MIGNON-GRASTEAU, S., LE ROY, P., VIGNAL, A. A genome scan with
AFLP markers to detect fearfulness-related QTLs in Japanese quail. **Anim.
Genet.** 36: 401–407, 2005.
- BIJMA, P.; MUIR, W.M. Genetic analysis and improvement of traits affected by
behavioural or other interactions among individuals. In: *Proceedings of the 8th
World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 2006, Belo
Horizonte: Minas Gerais, Brazil, 2006.

- BIJMA, P.; MUIR, W.M.; VAN ARENDONK, J.A.M. Multilevel Selection 1: Quantitative Genetics of Inheritance and Response to Selection. **Genetics** 175: 277–288, 2007a.
- BIJMA, P., MUIR, W.M., ELLEN, E., WOLF, J.B. AND VAN ARENDONK, J.A.M. Multilevel Selection 2: Estimating the Genetic Parameters determining Inheritance and Response to Selection. **Genetics** 175: 289–299, 2007b.
- BONO, M. Molecular Approaches to Aggregation Behavior and Social Attachment. **Inc. J Neurobiol** 54: 78–92, 2003.
- BUITENHUIS, A.J., RODENBURG, T.B., SIWEK, M., CORNELISSEN, S.J.B., NIEUWLAND, M.G.B., CROOIJMANS, R.P.M.A., GROENEN, M.A.M., KOENE, P., BOVENHUIS, H., VAN DER POEL, J.J. Identification of QTLs involved in open-field behavior in young and adult laying hens. **Behav. Genet.** 34: 325–333, 2004.
- CASPI, A., SUGDEN, K., MOFFITT, T. E., TAYLOR, A., CRAIG, I. W., HARRINGTON, W., MCCLAY, J., MILL, J., MARTIN, J., BRAITHWAITE, A., POULTON, R. Influence of life stress on depression moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science** 301: 386–89, 2003.
- CAUTELLIER, L., ARNOULD, C., BOISSY, A., ORGEUR, P., PRUNIER, A., VEISSIER, I., SALAUN, M.C.M. Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period. **App. Ani. Behav. Sci.** 105: 102 – 114, 2007.

- CHASE, I.D., TOVEY, C., MURCH, P. Two's company, three's a crowd: differences in dominance relationships in isolated versus socially embedded pairs of fish. **Behaviour** 140: 1193–1217, 2003.
- CRAIG, J. V., MUIR W. M. Group selection for adaptation to multiple-hen cages: beak-related mortality, feathering and body weight responses. **Poult. Sci.** 75: 294–302, 1996.
- DALE, P., AUGUSTINE D.J., FITZPATRICK, D., HALL, W.C., LAMANTIA, A.S., MCNAMARA J.O., WHITE, L.E. *Neuroscience. 4th ed.* Sinauer Associates, 2008. pp. 137–8.
- DALLMAN, M. F., A. M. STRACK, S. F. AKANA, M. J. BRADBURY, E. S. HANSON, K. A. SCRIBNER, M. SMITH, Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. **Front. Neuroendocrinol.** 14: 303–347, 1993.
- DÉSAUTÉS, C., BIDANEL, J. P., MORME`DE P. Genetic study of behavioral and pituitary-adrenocortical reactivity in response to an environmental challenge in pigs. **Physiol. Behav.** 62: 337–345, 1997.
- DÉSAUTÉS, C., SARRIEAU, A., CARITEZ, J.C., MORME`DE, P. Behavior and pituitary-adrenal function in large white and Meishan pigs. **Domest. Anim. Endocrinol.** 16: 193–205, 1999.
- DÉSAUTÉS, C., BIDANELT, J.P., MILANT, D., IANNUCELLI, N., AMIGUES, Y., BOURGEOIS, F., CARITEZ, J.C., RENARD, C., CHEVALET, C., MORME`DE, P. Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for

- behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. **J. Anim. Sci.** 80: 2276–2285, 2002.
- EUCLYDES, R. F. **Uso do sistema para simulação Genesys na avaliação de métodos de seleção clássicos e associados a marcadores moleculares.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 150 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- FALCONER, D.S. *Introdução à genética quantitativa.* Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.
- FOURY, A., N. DEVILLERS, M. P. SANCHEZ, H. GRIFFON, P. LE ROY, AND P. MORME`DE. Stress hormones, carcass composition and meat quality in Large White × Duroc pigs. **Meat Sci.** 69: 703–707, 2005.
- GEVERINK, N., FOURY, A., PLASTOW, G.S., GIL, M., GISPERT, M., HORTOS, M., FONT I FURNOLS, M., GORT, G., MOISAN, M.P., MORME`DE, P. Cortisol-binding globulin and meat quality in five European lines of pigs. **J. Anim. Sci.**, 84: 804 – 811, 2006.
- GRIFFING, B. Selection in reference to biological groups. I. Individual and group selection applied to populations of unordered groups. **Aust. J. Biol. Sci.** 10: 127-139, 1967.
- GROSS, W.B., SIEGEL, H.S.. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Dis.** 27: 972 – 979, 1983.
- HAYNE, S.M., GONYOU, H.W. Effects of regrouping on the individual characteristics of pigs. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 82: 267–278, 2003.

- JENSEN, P. Fighting between unacquainted pigs: effects of age and individual reaction pattern. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 41: 37–52, 1994.
- JENSEN P., BUITENHUIS, B., KJAER, J., ZANELLA, A., MORME'DE P., PIZZARI, T. Genetics and genomics of animal behaviour and welfare - Challenges and possibilities. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 113: 383–403, 2008.
- LESCH, K.; BENDEL, D.; HEILS, A.; SABOL, S. Z.; GREENBERG, B. D.; PETRI, S.; CLEMENS, R.; MÜLLER, J. B.; HAMER, D. H.; MURPHY, D.L. Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. **Science** 274: 1527–31, 1996.
- MCGLONE, J.J., SALAK, J.L., LUMPKIN, E.A., NICOLSON, R.I., GIBSON, M., NORMAN, R.L. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leucocyte numbers. **J. Anim. Sci.** 71: 888 – 896, 1993.
- MILAN, D., J.-P. BIDANEL, N. IANNUCELLI, J. RIQUET, Y. AMIGUES, J. GRUAND, P. LE ROY, C. RENARD, AND C. CHEVALET. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. **Genet. Sel. Evol.** 34: 705–728, 2002.
- MOBERG, G.P., 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg G.P. & Mench, J.A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishind, 1-22.
- MORMEDE, P., COURVOISIER, H., RAMOS, A., MARISSAL-ARVY, N., OUSOVA, O., DÉSAUTÉS, C., DUCLOS, M., CHAOULOFF, F., MOISAN, M.P. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in

- behavioral and neuroendocrine stress responses. **Psychoneuroendocrinology** 27: 563–583, 2002.
- MUIR, W.M. Group selection for adaptation to multiple-hen cages: selection program and direct responses. **Poult. Sci.** 75: 447–458, 1996.
- MUIR, W.M. Incorporation of Competitive Effects in Forest Tree or Animal Breeding Programs. **Genetics** 170: 1247–1259, 2005.
- OTTEN, W., PUPPE, B., STABENOW, B., KANITZ, E., SCHOON, A.C., BRUSSOW, K.P., NURNBERG, G. Agonistic interactions and physiological reactions of top- and bottom-ranking pigs confronted with a familiar and an unfamiliar group: preliminary results. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 55: 79–90, 1997.
- OVERLI, O., HARRIS, C.A. & WINBERG, S. Effects of fights for social dominance, and the establishment of dominance-subordinate relationships, on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. **Brain Behav. Evol.** 54: 263–275, 1999.
- ROTHSCHILD, M. F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe-Newsletter for Agricultural Genomics.** v. 8, p. 13-20, 1997.
- RUIZ, A.A.W., GROOT, J., TE BRAKE, J.H.A., EKKEL, E.D., VAN DE BURG WAL, J.A., ERKENS, J.H.F, ENGEL, B., BUIST, W.G., BLOKHUIS, H.J., KOOLHAAS, J.M. Behavioural and physiological consequences of acute social defeat in growing gilts: effects of the social environment. **Appl. Ani. Behav. Sci.** 70: 201-225, 2001.

- SABOL S., HU S., HAMER D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. **Hum Genet** 103 (3): 273–279, 1998.
- SLOMAN, K.A., GILMOUR, K.M., TAYLOR, A.C., METCALFE, N.B. Physiological effects of dominance hierarchies within groups of brown trout, *Salmo trutta*, held under simulated natural conditions. **Fish Physiol.** 11: 11-20, 2000.
- SWAISGOOD, R.R. Current status and future directions of applied behavioral research for animal welfare and conservation. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 102: 139 – 162, 2007.
- STOOKEY, J.M., GONYOU, H.W. The effects of regrouping on behaviour and production parameters in finishing pigs. **J. Anim. Sci.** 72: 2804–2811, 1994.
- VAN VLECK, L.D.; CASSADY, J.P. Unexpected estimates of variance components with a true model containing genetic competition effects. **J. Anim. Sci.** 83: 68-74, 2005.
- WALTHER, D.J., PETER, J.U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H., AND BADER, M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science** 299: 76-85, 2003.