

# Caracterização da variabilidade de genes relacionados à fertilidade de machos e ao temperamento em equinos da raça brasileira Mangalarga

## Characterization of the variability of genes related to male fertility and temperament in Brazilian Mangalarga horses

Lidia Carolina Meira Arneiro<sup>1\*</sup>; Rogério Abdallah Curi<sup>2</sup>;  
Josineudson Augusto II Vasconcelos Silva<sup>2</sup>; Marcílio Dias Silveira da Mota<sup>2</sup>

### Resumo

Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia de genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs AJ\_315378:c.110A>G e AB\_264325:c.771G>C dos genes *CRISPI* e *HTRIA* equino, respectivamente, bem como a caracterização em equinos da raça Mangalarga destes e de outro polimorfismo, o AB\_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4*, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características de interesse na raça. Para tanto, foram utilizados 151 animais Mangalarga, de ambos os sexos e de idades variadas, representativos da população do estado de São Paulo. O método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem dos SNPs AJ\_315378:c.110A>G do *CRISPI* e AB\_264325:c.771G>C do *HTRIA*. Entretanto, o polimorfismo do *CRISPI* provavelmente não ocorre em equinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação do marcador com características relacionadas à fertilidade de machos. As estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AB\_264325:c.771G>C do *HTRIA* e o AB\_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* na amostra de animais estudados desencorajam a realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao temperamento.

**Palavras-chave:** Cavalos, *CRISPI*, *HTRIA*, polimorfismos, *SLC6A4*

### Abstract

The aims of the present study were to propose a PCR-RFLP genotyping method for the AJ\_315378:c.110A>G and AB\_264325:c.771G>C SNPs in the equine *CRISPI* and *HTRIA* genes, respectively, as well as to characterize these and another polymorphism, AB\_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* gene, in order to provide a basis for future studies investigating the association between DNA markers and traits of interest in this breed. For this, 151 Mangalarga horses of both sexes, representatives of the population of the State of São Paulo, Brazil, were used. PCR-RFLP was found to be adequate for the genotyping of the SNPs AJ\_315378:c.110A>G of the *CRISPI* and AB\_264325:c.771G>C of the *HTRIA*. However, the polymorphism of the *CRISPI* probably does not occur in Mangalarga horses, a fact impairing association studies of this marker with traits related to male fertility. The estimative of the population genetic parameters obtained for the polymorphisms AB\_264325:c.771G>C of the *HTRIA* and AB\_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* in the studied sample discourage the conduct of research addressed the association between markers and traits related to temperament.

**Key words:** *CRISPI*, horses, *HTRIA*, polymorphisms, *SLC6A4*

<sup>1</sup> Discente do Deptº de Genética e Melhoramento Animal, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP. E-mail: lidiacarol@ibest.com.br

<sup>2</sup> Profs. do Deptº de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP. E-mail: rogcuri@fmvz.unesp.br; jaugusto@fmvz.unesp.br; mdsмота@fmvz.unesp.br

\* Autor para correspondência

## Introdução

O melhoramento genético de eqüinos da raça Mangalarga tem se baseado na estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos apenas de características contidas nas tabelas de pontuação – conformação e andamento, avaliadas subjetivamente, e de desenvolvimento, mensuradas na ocasião do registro (MOTA; GIANNONI, 1994, MOTA; ALMEIDA PRADO, 2005, MOTA; ALMEIDA PRADO; MADUREIRA, 2006). Pouco se conhece acerca de caracteres reprodutivos e de temperamento dos animais, fundamentais em qualquer sistema de criação animal.

Características reprodutivas têm se mostrado difíceis de selecionar a partir de métodos quantitativos em todas as espécies, especialmente em eqüinos, devido suas estimativas relativamente baixas de herdabilidade e dificuldades na avaliação dos dados (TAVEIRA; MOTA, 2007). Apesar disso, a fertilidade de machos é característica econômica de larga importância devido ao aumento do uso da técnica de inseminação artificial na indústria de reprodutores de elevado valor genético. A CRISP1 (*cysteine-rich secretory protein 1*) é membro da família de proteínas CRISP, a qual é caracterizada pela presença de 16 resíduos de cisteína na região C-terminal. As proteínas CRISP são expressas no trato genital masculino e estão supostamente relacionadas ao processo de fusão entre espermatozóide e óvulo, o que torna seus respectivos genes codificadores, entre os quais o *CRISP1* (*cysteine-rich secretory protein 1 gene* – também conhecido como *AEGL1*), mapeado no cromossomo eqüino 20, candidatos para a característica fertilidade de machos (GIESE et al., 2002).

Definido como o conjunto de características comportamentais estáveis ao longo do tempo e entre situações, o temperamento geral é qualidade fundamental no cavalo de sela. Animais com bom temperamento são obedientes, fáceis de treinar, calmos e confiáveis (EVANS, 1996). De acordo com Murphy et al. (2008), a literatura

científica recente vem explicando os importantes papéis dos receptores e do transportador de serotonina nas funções que esta desempenha como neurotransmissor e neuromodulador nos processos neuroquímicos, fisiológicos, farmacológicos e comportamentais. Em espécies como a humana e a canina, genes do grupo de receptores de serotonina (HTR), localizado no cromossomo eqüino 21, entre os quais o *HTR1A* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A gene*), vêm se mostrando envolvidos em disfunções emocionais. Em eqüinos, estes genes são de especial interesse devido à suposta relação entre seus produtos protéicos e distúrbios gastrointestinais decorrentes de alterações no sistema nervoso central e periférico, uma das principais causas de morte, levando a perdas econômicas consideráveis dentro de sistemas de produção (MOMOZAWA et al., 2007). Por sua vez, o gene *SLC6A4* (*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 gene*), mapeado no cromossomo eqüino 11, codificador do transportador de serotonina, é forte candidato a influenciar características de temperamento em animais ao atuar no controle da reabsorção da serotonina nas fendas sinápticas (MOMOZAWA et al., 2006).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia de genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs AJ\_315378:c.110A>G e AB\_264325:c.771G>C dos genes *CRISP1* e *HTR1A* eqüino, respectivamente, bem como a caracterização em eqüinos da raça Mangalarga destes e de outro polimorfismo, o AB\_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4*, a fim de que se tenha o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características relacionadas à fertilidade de machos e de temperamento na raça.

## Material e Métodos

### *Animais e coleta de sangue*

Foram utilizados 151 cavalos da raça Mangalarga registrados na Associação Brasileira dos Criadores

de Cavalos da Raça Mangalarga (ABCCRM), de ambos os sexos e de idades variadas, representativas da população do Estado de São Paulo/Brasil. Amostras de cinco mL de sangue total de cada indivíduo foram colhidas por venopunção da jugular esquerda utilizando tubos a vácuo com EDTA.

#### *Extração do DNA e genotipagem*

Após a remoção das hemácias das amostras de sangue, a extração de DNA dos leucócitos foi realizada pelo método não fenólico, utilizando digestão com proteinase K e precipitação com NaCl e álcool.

A genotipagem dos polimorfismos AJ\_315378:c.110A>G do gene *CRISPI*, AB\_264325:c.771G>C do *HTRIA* e AB\_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* foram realizadas por meio da técnica de PCR-RFLP. Os *primers* necessários à amplificação das regiões gênicas de interesse, as enzimas de restrição utilizadas na detecção dos polimorfismos, bem como outras informações de relevância encontram-se apresentados na Tabela 1.

Na análise do SNP AJ\_315378:c.110A>G do *CRISPI*, fragmento de 910 pares de bases contendo seqüência do exon 3 foi amplificado de acordo com Giese et al. (2002). A análise *in silico* do mapa de restrição da região amplificada, realizada por meio do programa *online* Webcutter 2.0, mostrou a possibilidade de genotipagem do polimorfismo utilizando a endonuclease *BseNI*. Neste sentido, os amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 12µL de produto de PCR e 5U da enzima *BseNI* (Fermentas, EUA). As misturas para digestão foram incubadas em termociclador a 65 °C por 14 horas.

Após análise *in silico* do mapa de restrição da seqüência que contém o polimorfismo AB\_264325:c.771G>C do gene *HTRIA* equino, realizada com o Webcutter 2.0, constatou-se a possibilidade de sua genotipagem por meio da endonuclease *AluI*. Fragmento de 432 pares de bases da região codificante do gene foi amplificado utilizando par de *primers* confeccionados com auxílio do programa Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A averiguação da qualidade dos óligos em relação à formação de *hairpins*, dímeros e dímeros cruzados foi realizada utilizando o programa NetPrimer *online*. A confirmação de que cada seqüência iniciadora era única para o gene alvo na espécie de interesse foi realizada utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI. Cada PCR, com volume final de 25 µL, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,24 µM de cada *primer*, 1,6mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,24 mM de cada dNTP e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Após desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, a amplificação foi realizada em 36 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 54 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi conduzida a 72 °C por 5 minutos. Alíquotas de 10mL de produtos de amplificação foram digeridas com 4 U da enzima *AluI* (New England Biolabs, EUA) a 37 °C por 16 horas.

Em relação à análise do polimorfismo AB\_098561:c.1470G>A do *SLC6A4*, fragmento de 359 pares de bases da região codificante do gene foi amplificado e digerido com a enzima de restrição *HhaI* (New England Biolabs, EUA), como em Momozawa et al. (2006).

**Tabela 1.** Genes candidatos, sequência dos “primers” forward (F) e reverse (R) utilizados na amplificação das regiões de interesse, temperatura de anelamento dos “primers” (TA) na reação de PCR, enzimas de restrição utilizadas na detecção dos polimorfismos, número de acesso das sequências dos genes de interesse no GenBank, troca de nucleotídeos na sequência do DNA e troca de aminoácido na sequência da proteína.

Gene	Sequência dos “primers” 5’-3’	TA (°C)	Enzima (fabricante)	Número GenBank	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido
<i>CRISPI</i>	F – CCC CAA TCA CAG AAT ATC C R – TCA GCT AGC CTA GAA TCT G	52	<i>Bse</i> NI (Fermentas, USA)	AJ315378	c.110A>G	E37G (não conservativa)
<i>HTRIA</i>	F – CTT TCT ACA TCC CGC TGC TG R – TCT TCA CCG TCT TCC TTT CG	54	<i>Alu</i> I (New England Biolabs, USA)	AB264325	c.771G>C	E257D (conservativa)
<i>SLC6A4</i>	F – CTA TGT GGT GAA GCT GCT GG R – GCT TCC TCC TGT CTC CAC TG	60	<i>Hha</i> I (New England Biolabs, USA)	AB098561	c.1470G>A	não ocorre

Fonte: Elaboração dos autores.

Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA dos genes *CRISPI*, *HTRIA* e *SLC6A4* foram separados em géis de agarose a 2, 2 e 3%, respectivamente. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. A visualização das bandas foi realizada por meio de coloração com brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

#### Análise dos Dados

Utilizando o programa PopGene 1.32 (YEH; YANG; BOYLE, 1999) foram calculados as frequências alélicas e genótípicas e o equilíbrio de Hardy Weinberg para cada um dos sítios polimórficos analisados. A neutralidade seletiva foi avaliada segundo o teste do parâmetro *F* de Ewens-Watterson, com os programas Popgene 1.32 e PyPop (LANCASTER et al., 2007). As análises realizadas pelo programa Popgene 1.32 estabeleceram intervalo de confiança para *F*. O programa PyPop verificou a significância do desvio normalizado entre *F* esperado e *F* observado por meio do teste exato de Slatkin (SLATKIN, 1996).

## Resultados e Discussão

### Polimorfismo do *CRISPI*

Giese et al. (2002) analisaram por meio de seqüenciamento direto de produtos de PCR a ocorrência de diversidade no gene *CRISPI* de eqüinos em 16 cavalos de nove raças (Hanoveriana, Haflingo, Shire-Horse, Knabstrupper, Shagya Árabe, Pôneis, Pôneis Shetland, Irish Tinker e Lusitano) e encontraram vários polimorfismos, incluindo o AJ\_315378:c.110A>G, estudado no presente trabalho, o qual apresenta potencial para provocar alterações fenotípicas por acarretar modificação não conservativa na seqüência de aminoácidos da

cadeia polipeptídica. Este sítio polimórfico está localizado no éxon 3 e é responsável pela troca de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 37 (Glu37Gli) da proteína CRISP1.

Em relação ao referido polimorfismo, apenas o alelo A foi identificado na amostra de animais estudados (Tabela 2). O genótipo AA foi caracterizado pela presença de três fragmentos de

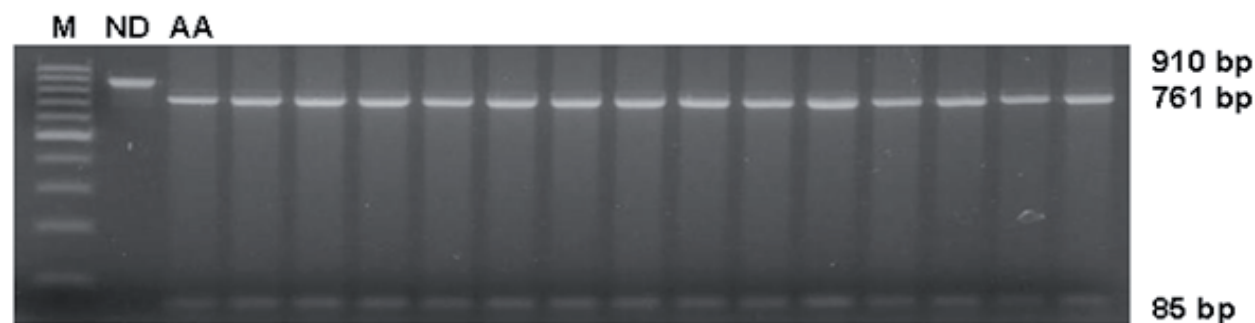
761, 85, 64 pb, sendo que a visualização do fragmento menor não foi possível na condição de eletroforese realizada (Figura 1). Com base no mapa de restrição do fragmento amplificado, o genótipo GG seria caracterizado pela presença de quatro bandas com 552, 209, 85 e 64 pb, e o heterozigoto (AG) pela presença de cinco fragmentos, correspondentes à combinação dos padrões dos homozigotos.

**Tabela 2.** Frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos AJ\_315378:c.110A>G do gene *CRISP1*, AB\_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* e AB\_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* em amostra representativa da população de equínos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.

Polimorfismo	Frequência alélica		Frequência genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
AJ_315378:c.110A>G ( <i>CRISP1</i> )	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00
AB_264325:c.771G>C ( <i>HTR1A</i> )	0,02	0,98	0,00	0,03	0,97
AB_098561:c.1470G>A ( <i>SLC6A4</i> )	0,08	0,92	0,00	0,16	0,84

Fonte: Elaboração dos autores.

**Figura 1.** Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AJ\_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* equino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *Bse*NI (910 pb) e AA o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Bse*NI. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.



Fonte: Elaboração dos autores.

Não foram encontrados na literatura relatos de frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo AJ\_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* em equínos Mangalarga. Em equínos da raça Hanoveriana, Hamann et al. (2007) encontraram

frequências de 0,99 para o alelo A e 0,01 para o G. Os resultados aqui apresentados demonstraram a provável ausência do polimorfismo do gene *CRISP1* em equínos Mangalarga. Entre as possíveis explicações para o fato tem-se que a população

fundadora da raça poderia ser homozigota para este loco em particular, ou que a fixação do alelo A possa ter ocorrido posteriormente em razão de seleção indireta. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da rara ocorrência do alelo G na raça, o que poderia ser confirmado com amostragens mais amplas.

Embora a provável inexistência do SNP na Mangalarga não permita estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça, o método de PCR-RFLP mostrou-se eficaz, de baixo custo e apropriado para laboratórios dotados de estrutura básica em equipamentos e reagentes, o que permitirá a expansão da análise desse polimorfismo nas raças em que ocorra. Entretanto, para a realização de estudos de associação com o *CRISP1* na Mangalarga, faz-se necessário o estudo da segregação de outros polimorfismos já descritos para o gene ou a busca por novos na sequência de DNA da raça. Apesar de gene candidato para a característica fertilidade de machos, não foram encontrados na literatura resultados de estudos de associação entre polimorfismos do gene *CRISP1* e aspectos reprodutivos em equinos. Em Hamann et al. (2007) a verificação de associação entre o polimorfismo AJ\_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* e a fertilidade de garanhões da raça Hanoveriana não foi possível em virtude da extremamente baixa frequência do alelo G. Por outro lado, outros genes da mesma família foram recentemente estudados com relação às suas associações com fertilidade em equinos e em humanos. Hamann et al. (2007) identificaram SNP não sinônimo no gene *CRISP3*, com efeito significativo sobre a fertilidade de garanhões. Em humanos, Jamsai et al. (2008) identificaram três SNPs não sinônimos no gene *CRISP2*. Embora nenhum dos polimorfismos identificados tenha mostrado associação significativa com infertilidade, estudos funcionais sugerem que o polimorfismo responsável pela troca de aminoácidos na posição 196 possa comprometer a função protéica.

### *Polimorfismo do HTR1A*

Na busca por polimorfismos no gene *HTR1A* equino, Momozawa et al. (2007) seqüenciaram o cDNA proveniente do cérebro de 10 cavalos Puro Sangue Inglês não relacionados geneticamente e encontraram duas trocas não sinônimas de nucleotídeos com algum potencial de provocar alterações fenotípicas, entre as quais a conservativa AB\_264325:c.771G>C, aqui estudada. Este polimorfismo do *HTR1A* pode apresentar importância fisiológica em relação às características de comportamento ao ser responsável pela troca de um ácido glutâmico por ácido aspártico na posição 257 (Glu257Asp) da sequência presumida de aminoácidos da cadeia polipeptídica do receptor de serotonina de equinos.

Para o polimorfismo supracitado, foram encontrados os alelos C e G na amostra de animais estudados. O alelo G, quase fixado, prevaleceu sobre o C. Desta forma, o genótipo GG apresentou alta frequência em relação ao genótipo heterozigoto. O genótipo CC não foi observado (Tabela 2). O genótipo GG foi caracterizado pela presença de dois fragmentos com 268 e 164 pb. Por sua vez, o genótipo heterozigoto CG foi caracterizado pela presença de três fragmentos com 432, 268, 164 pb (Figura 2). De acordo com o mapa de restrição, o genótipo CC, não identificado no conjunto de animais analisado, seria caracterizado pela presença de um fragmento contendo 432 pb. Da mesma forma que para o polimorfismo do *CRISP1*, o método de PCR-RFLP apresentou-se apropriado para a genotipagem do SNP AB\_264325:c.771G>C do *HTR1A*, o que permitirá a expansão da análise desse polimorfismo em cavalos.

Não foram encontrados relatos de frequências alélicas e genotípicas para o SNP AB\_264325:c.771G>C do *HTR1A* em equinos. A alta frequência do alelo G deixa evidente o pequeno potencial de aplicação deste marcador em estudos de associação. Isto se deve ao fato de que caso o alelo G fosse favorável para características

de temperamento, já estaria muito perto de estar fixado. Se, por outro lado, o alelo C trouxesse alguma vantagem, provavelmente se encontraria em frequência mais elevada devido à seleção indireta. O teste do Qui-quadrado envolvendo as frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a população estudada de Mangalarga encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco que contém o polimorfismo do gene *HTR1A*, uma vez que, a 5% de significância, o valor do Qui-quadrado calculado (0,034) foi menor que o tabelado (3,84). O teste de

significância de Slatkin para a neutralidade seletiva de Ewens-Watterson aplicado ao polimorfismo do gene *HTR1A* foi não significativo ( $p = 0,666$ ) (Tabela 3), demonstrando que não há indicativo de acasalamentos preferenciais ou de seleção em favor de um dos alelos. Neste sentido, as estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para o SNP AB\_264325:c.771G>C do *HTR1A* na amostra estudada de Mangalarga desestimulam a sua aplicação em estudos de associação com características de importância na raça.

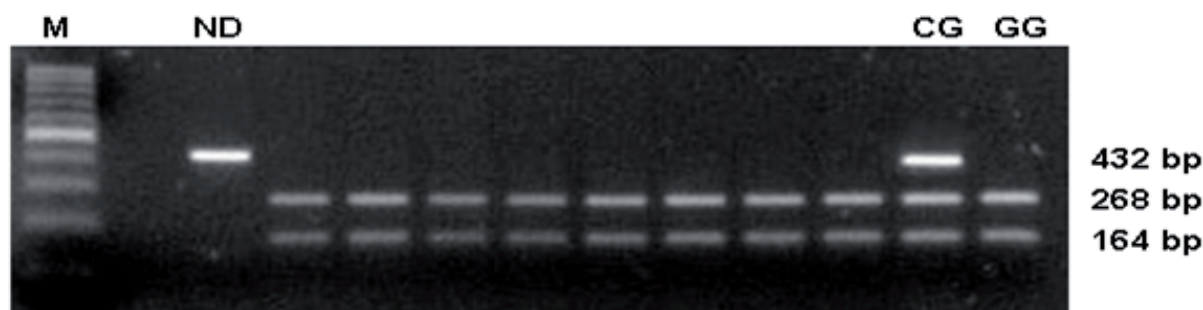
**Tabela 3.** Teste F de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e significância de Slatkin para os sítios polimórficos dos genes *HTR1A* e *SLC6A4* em amostra representativa da população de equínos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.

Polimorfismo	N	Nº alelos	Interv. Conf. de F		F obs.	F esp.	Fnd <sup>b</sup>	P
			Inf.	Sup.				
AB_264325:c.771G>C ( <i>HTR1A</i> )	302	2	0,500	0,993	0,967	0,841 ±0,167	0,754	0,666
AB_098561:c.1470G>A ( <i>SLC6A4</i> )	302	2	0,500	0,993	0,848	0,841 ±0,167	0,039	0,386

<sup>a</sup> Intervalo de *F* com 95% de confiança, obtido com 1.000.000 de simulações. <sup>b</sup> Desvio normalizado entre *F* observado e *F* esperado.

Fonte: Elaboração dos autores.

**Figura 2.** Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AB\_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* equino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *AluI* (432 pb) e CG e GG os genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *AluI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.



Fonte: Elaboração dos autores.

Não foram encontrados na literatura resultados de estudos de associação entre características comportamentais e polimorfismos do gene *HTR1A* em eqüinos, entretanto em cães e em humanos, pesquisas com este gene e outros da família foram há pouco realizados. Van den Berg et al. (2008) analisaram o efeito de polimorfismos dos genes *HTR1A*, *HTR1B* e *HTR2A*, entre outros, em relação ao comportamento agressivo em cães da raça Golden Retriever, não observando qualquer efeito significativo. Em revisão bibliográfica, realizada por Drago, Ronchi e Serretti (2008), foram encontrados 27 SNPs associados ao gene *HTR1A* humano, sendo alguns destes causadores de trocas sinônimas e não sinônimas. Estas variações têm sido estudadas em transtornos psiquiátricos, todavia ainda sem resultados definitivos (DRAGO; RONCHI; SERRETTI, 2008).

#### *Polimorfismo do SLC6A4*

Em eqüinos, Momozawa et al. (2006) determinaram a seqüência e a localização cromossômica do gene *SLC6A4* e identificaram quatro SNPs, incluindo o AB\_098561:c.1470G>A, analisado no presente trabalho, entre as seqüências de cDNA de uma dezena de cavalos Puro Sangue Inglês não relacionados geneticamente. Embora este polimorfismo esteja localizado em região gênica codificante, não é responsável por alteração de aminoácidos na cadeia peptídica. Mesmo assim, pode ser responsável por alterações fenotípicas, uma vez que tem a possibilidade de modificar a estrutura secundária do RNA mensageiro e conseqüentemente a expressão gênica. Por outro lado, pode estar em desequilíbrio de ligação com a variação funcional.

Considerando-se o mencionado polimorfismo, foram detectados na amostra de animais estudados os alelos A e G. O alelo G apresentou freqüência extremamente alta em relação ao A. Como conseqüência, o genótipo GG também apresentou freqüência alta em relação ao genótipo heterozigoto. O genótipo AA não foi observado (Tabela 2).

Assim como descrito por Momozawa et al. (2006), o genótipo GG foi caracterizado pela presença de dois fragmentos com 302 e 57 pb. O genótipo heterozigoto AG foi caracterizado pela presença de três fragmentos de 359, 302 e 57 pb. O genótipo AA, não identificado na população estudada, seria caracterizado pela presença de fragmento único contendo 359 pb.

As freqüências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *SLC6A4* eqüino na amostra estudada estão muito próximas das encontradas por Momozawa et al. (2006) em cavalos da raça Puro Sangue Inglês (0,09 para o alelo A e 0,91 para o G). O teste do Qui-quadrado demonstrou que a população estudada de Mangalarga encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco que abriga o polimorfismo do gene *SLC6A4*, uma vez que, a 5% de significância, o valor do Qui-quadrado calculado (1,075) foi menor que o tabelado (3,84). O teste de significância de Slatkin para a neutralidade seletiva de Ewens-Watterson foi não significativo ( $p = 0,386$ ) para o polimorfismo do gene *SLC6A4* (Tabela 3), mostrando que não há indicativo de acasalamentos preferenciais ou de seleção em favor de um dos alelos. Neste sentido, ambos os testes apontaram para a não aplicabilidade do polimorfismo do gene *SLC6A4* em estudos de associação entre marcadores e características de interesse na Mangalarga. Estes resultados, assim como os obtidos para os outros dois SNPs analisados neste trabalho, demonstram a importância de estudos de caracterização de parâmetros genético-populacionais de polimorfismos em diferentes raças da espécie de interesse, previamente aos estudos de associação entre marcadores moleculares e características de importância, a fim de que não ocorra consumo de recursos sem proveito na medição de fenótipos que não poderão ser confrontados com variações específicas do DNA.

No único trabalho de associação realizado com o polimorfismo AB\_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* em eqüinos, Momozawa et al. (2006) não encontraram resultados positivos ao



analisarem o efeito de haplótipos formados pelos SNPs identificados no gene sobre a característica ansiedade na raça Puro Sangue Inglês. Em cães Golden Retriever, Van den Berg et al. (2008) não identificaram relação entre variantes do gene e agressividade. De forma diferente, variações no *SLC6A4* humano têm sido associadas à depressão, ansiedade, transtorno bipolar, suicídios, desordens alimentares e de abuso de substâncias, autismo, déficit de atenção/hiperatividade e desordens neurodegenerativas (MURPHY; LESCH, 2008).

## Conclusões

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que: (1) o método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem dos SNPs AJ\_315378:c.110A>G e AB\_264325:c.771G>C dos genes *CRISP1* e *HTR1A* eqüino, respectivamente. Entretanto, o polimorfismo do *CRISP1* provavelmente não ocorre em eqüinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador de DNA na raça; (2) as estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AB\_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* e AB\_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* na amostra de animais analisada desencorajam a realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao temperamento na raça estudada.

## Agradecimentos

À Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro concedido. Aos criadores, representados na pessoa de Raul Sampaio Almeida Prado, por disponibilizar dos animais para a pesquisa.

## Aprovação da comissão de ética

Os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira para o bem-estar animal (protocolo nº 111/2008 expedido pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu/SP – Brasil).

## Referências

- DRAGO, A.; RONCHI, D. D.; SERRETTI, A. 5-HT<sub>1A</sub> gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 701-721, 2008.
- EVANS, J. W. *Horses: a guide to selection, care and enjoyment*. 2. ed. São Francisco, EUA: WH Freeman and company, 1996. 797 p.
- GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUÉRIN, G.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. *Gene*, Amsterdam, v. 292, n. 1-2, p. 65-72, 2002.
- HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME, H.; MERTENS, U.; TÖPFER-PETERSEN, E.; DISTL, O.; LEEB, T. A polymorphism within the equine *CRISP3* gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics*, Oxford, v. 38, n. 3, p. 259-264, 2007.
- JAMSAI, D.; REILLY, A.; SMITH, S. J.; JAMSAI, D.; REILLY, A.; SMITH, S. J.; GIBBS, G. M.; BAKER, H. W. G.; MCLACHLAN, R. I.; KRETSER, D. M.; O'BRYAN, M. K. Polymorphisms in the human cysteine-rich secretory protein 2 (*CRISP2*) gene in Australian men. *Human Reproduction*, Oxford, v. 23, n. 9, p. 2151-2159, 2008.
- LANCASTER, A. K.; SINGLE, R. M.; SOLBERG, O. D.; NELSON, M. P.; THOMSON, G. PyPop update – a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 69, n. 1, p. 192-197, 2007.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; KIKUSUI, T.; HASEGAWA, T.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.; KUSUNOSE, R.; MORI,

- Y. Polimorphism identification, RH mapping, and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (*SLC6A4*) gene. *Journal of Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 619-621, 2006.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; KIKUSUI, T.; HASEGAWA, T.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.; KUSUNOSE, R.; MORI, Y. SNP detection and radiation hybrid mapping horses of nine candidate genes for temperament. *Animal Genetics*, Oxford, v. 38, n. 1, p. 81-91, 2007.
- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S. Estudo genético da pontuação total em eqüinos da raça Mangalarga. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 54, n. 205, p. 25-30, 2005.
- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S.; MADUREIRA, D. G. F. Estimativa de parâmetros genéticos para deslocamento em cavalos da raça Mangalarga. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 55, n. 210, p. 207-210, 2006.
- MOTA, M. D. S.; GIANNONI, M. A. Efeitos genéticos e de ambiente sobre alguns caracteres de locomoção e desenvolvimento em eqüinos da raça Mangalarga. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa, v. 89, n. 512, p. 191-196, 1994.
- MURPHY, D. L.; FOX, M. A.; TIMPANO, K. R.; MOYA, P. R.; REN-PATTERSON, R.; ANDREWS, A. M.; HOLMES, A.; LESCH, K. P.; WENDLAND, J. R. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to *SLC6A4*, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 55, n. 6, p. 932-960, 2008.
- MURPHY, D. L.; LESCH, K. P. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Neuroscience*, Oxford, v. 9, n. 2, p. 85-96, 2008.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, v. 132, n. 3, p. 365-386, 2000.
- SLATKIN, M. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genetic Research*, Cambridge, v. 68, n. 3, p. 259-260, 1996.
- TAVEIRA, R. Z.; MOTA, M. D. S. Genetic and quantitative evaluation of breeding traits in Thoroughbred mares. *Revista Electronica de Veterinaria*, Málaga, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2007.
- VAN DEN BERG, L.; VOS-LOOHUIS, M.; SCHILDER, M. B. H.; VAN OOST, B. A.; HAZEWINKEL, H. A. W.; WADE, C. M.; KARLSSON, E. K.; LINDBLAD-TOH, K.; LIINAMO, A. E.; LEEGWATER, P. A. J. Evaluation of the serotonergic genes *HTR1A*, *HTR1B*, *HTR2A*, and *SLC6A4* in aggressive behavior of golden retriever. *Behavior Genetics*, Nova York, v. 38, n. 1, p. 55-66, 2008.
- YEH, F. C., YANG, R. C., BOYLE, T. *Popgene version 1.32. Microsoft windows – based freeware for population genetic analysis*. Canada: University of Alberta, 1999.