

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Caracterização da variabilidade de genes relacionados à
fisiologia do sistema imune em equinos da raça Mangalarga**

Renato Alves Prioli

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Caracterização da variabilidade de genes relacionados à
fisiologia do sistema imune em equinos da raça Mangalarga**

Renato Alves Prioli

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Dias Silveira da Mota

Co-orientador: Dr. Rogério Abdallah Curi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL, SP

Fevereiro de 2010

Prioli, Renato Alves
P958c Caracterização da variabilidade de genes relacionados à fisiologia
do sistema imune em equinos da raça mangalarga. / Renato Alves
Prioli. -- Jaboticabal, 2010
xi, 57 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002
Orientador: Marcílio Dias Silveira da Mota
Banca examinadora: Humberto Tonhati, Lenira El Faro Zadra.
Bibliografia

1. Equinos Mangalarga. 2. SNP's-equinos. 3. Equinos-sistema
Imune I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

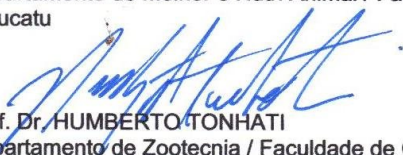
TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNE EM EQUINOS DA RAÇA MANGALARGA.

AUTOR: RENATO ALVES PRIOLI
ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCÍLIO DIAS SILVEIRA DA MOTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCÍLIO DIAS SILVEIRA DA MOTA
Departamento de Melhor e Nutri Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dra. LENIRA EL FARO ZADRA
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 08 de fevereiro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATO ALVES PRIOLI – Nascido em Campinas, no dia 30 de Janeiro de 1984. Concluiu o ensino fundamental em 1998 e o ensino médio em 2001. Em 2002 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, graduando-se em fevereiro de 2007. Em março de 2008 iniciou o curso de mestrado no programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da UNESP-Jaboticabal, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus que me deu a vida e as oportunidades durante ela.

A minha família, que me deu suporte em todos os sentidos durante a minha trajetória de vida.

Aos meus amigos de infância e adolescência que ainda me acompanham, porém sem nomeá-los para não correr o risco de esquecer ninguém.

Aos meus amigos da universidade que compartilharam comigo cinco anos inesquecíveis e fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus pais e minha tia Laudenir pelo apoio profissional.

Aos amigos de laboratório com os quais eu aprendi muito.

Ao meu orientador Marcílio e meu co-orientador Rogério que me mostraram novos caminhos e permitiram um crescimento profissional muito maior do que eu poderia imaginar.

Aos meus amigos de Jaboticabal que me acolheram quando eu saí de casa. Em especial ao Guido e ao Haroldo que quebraram muitos galhos pra mim na pós-graduação.

Sem a menor dúvida, não posso deixar de fora a FAMÍLIA SANTA CERVA de Botucatu. Uma república onde criei laços e aprendi muito sobre a vida e a convivência. UMA DAS MELHORES FASES DA VIDA!!!

Meus amigos de botuca também não ficam de fora!!!

Não pode faltar a Fabiana... a Fabí... que trouxe pra minha vida o que eu precisava, na hora que eu precisava.

A FAPESP e a FUNDUNESP pelo apoio financeiro concedido.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Raça Mangalarga.....	1
1.1. Origem e situação atual da raça Mangalarga	1
1.2. Melhoramento genético de equinos Mangalarga.....	3
1.3. Marcadores moleculares.....	4
2. Sistema Imune.....	9
2.1. Receptores de membrana TLR4 e CD14.....	9
2.2. Cadeia Pesada da Imunoglobulina E.....	12
3. Análise estatística.....	14
3.1. Conceitos e Parâmetros Genético-Populacionais.....	14
3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	14
3.3. Índice de Fixação.....	16
3.4. Diversidade genética.....	17
3.4.1. Índice de diversidade de Shannon (H').....	17
3.4.2. Diversidade gênica de Nei (H).....	19
3.5. Teste de Neutralidade Seletiva.....	21
4. Objetivos.....	23
5. REFERÊNCIAS.....	24
CAPITULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNE EM EQÜINOS DA RAÇA MANGALARGA	
.....	33
1. RESUMO.....	33
2. Introdução.....	34
3. Material e métodos.....	36
3.1. Animais e coleta de sangue.....	36

	Página
3.2. Extração do DNA e genotipagem	36
3.3. Análise estatística dos dados.....	39
4. Resultados	40
5. Discussão.....	42
5.1. Polimorfismo do <i>CD14</i>	42
5.2. Polimorfismo do <i>TLR4</i>	44
5.3. Polimorfismo do <i>Cε</i>	46
6. Conclusões.....	47
7. Agradecimentos	48
8. Referências	48

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, troca de aminoácido na sequência da proteína e região gênica de localização dos polimorfismos.
..... 52

Tabela – 2. Frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14*, AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* e AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* em amostra representativa da população de equinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo..... 53

Tabela – 3. Teste *F* de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson^a e significância de Slatkin para os sítios polimórficos dos genes *TLR4* e *Cε* em amostra representativa da população de equinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.
..... 53

Figura – 1. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 3% do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *Acil*, N o controle negativo de amplificação, L o padrão de peso molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *Acil* (259 pb) e CC o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Acil*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.
..... 54

Figura – 2. Eletroferograma parcial do sequenciamento direto de produtos de PCR de 259 pares de bases do gene *CD14* de dois equinos da raça Mangalarga estudados no presente trabalho. A região em destaque evidência o sítio de localização do SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino e mostra que ambos os indivíduos apresentaram a mesma sequência na região, ou seja, uma citosina (C) na posição 1900, considerando a deposição AY731081 como referência.
..... 55

Figura – 3. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *BssSI*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *BssSI* (2172 pb) e GG, AG e AA indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *BssSI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.
..... 57

Figura – 4. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *Eco47I*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *Eco47I* (1601 pb) e TT, CT e CC indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Eco47I*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.
..... 58

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNE EM EQUINOS DA RAÇA MANGALARGA.

RESUMO - Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem do SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino por PCR-RFLP, bem como a caracterização em equinos da raça Mangalarga deste e de outros dois polimorfismos, o AY_005808: c.1530A>G do *TLR4* e o AX_463789: g.133T>C do *Cε*, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características relacionadas à fisiologia do sistema imune 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 do SNP AY_731081: g.1900T>C do gene *CD14* equino. Entretanto, tal polimorfismo provavelmente não ocorre em equinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador na raça. Os parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* e o AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* demonstraram a possibilidade de realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao sistema imune na raça Mangalarga.

Palavras chave: *CD14*, *Cε*, DNA, cavalos, polimorfismos, *TLR4*

CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY ASSOCIATED TO THE PHYSIOLOGY OF THE IMMUNE SYSTEM IN EQUINE MANGALARGA BREED.

SUMMARY - The objective of this work was to contribute to the molecular characterization of the equine Mangalarga, aiming at future studies on the association of DNA polymorphisms and traits associated with the immune system physiology of this equine breed. An alternative PCR-RFLP genotyping method was developed for the SNP AY_731081:g.1900T>C, in the gene *CD14*. Furthermore, this SNP plus the AY_005808: c.1530A>G, in the gene *TLR4*, and the AX_463789: g.133T>C, in the gene *Cε*, were used to analyze 151 Mangalarga individuals. The analyzed horses are representative of the São Paulo State population and consisted of male and female animals of several ages. The PCR-RFLP method has been demonstrated to be suitable for equine genotyping using the SNP AY_731081: g.1900T>C of the gene *CD14*. However, this polymorphism is apparently absent in the Mangalarga breed. The population genetic data obtained for the polymorphisms AY_005808:c.1530A>G, of the gene *TLR4*, and the AX_463789:g.133T>C, in the gene *Cε*, indicated the feasibility of these SNPs for further studies aiming at the association of molecular markers with traits related to the immune system of the Mangalarga horse breed.

Keywords: *CD14*, *Cε*, DNA, horse, polymorphisms, *TLR4*

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Raça Mangalarga

1.1. Origem e situação atual da raça Mangalarga

A partir do século XVI colonizadores portugueses introduziram no Brasil algumas raças de cavalos entre as quais, as formadoras da raça Mangalarga. No início do século XIX D. João VI trouxe ao Brasil cavalos da Real Coudelaria de Alter do Chão e, a partir desses animais, membros da família Junqueira começaram a selecionar animais que viriam a fundar a raça Mangalarga (ALMEIDA PRADO, 2008). Ainda nessa época houve a introdução da raça no estado de São Paulo vinda do sul de Minas Gerais e durante cerca de um século os criadores selecionavam seus animais de acordo com critérios próprios. Essa seleção visou aperfeiçoar características ligadas a funcionalidade, destacando o andamento marchado (SIMÕES, 1983).

No fim do século XIX e início do século XX houve tendência nacional na equideocultura de valorizar as raças nativas com objetivo de preservar suas características, evitando o cruzamento com raças estrangeiras. Nesse movimento surgiram as primeiras associações de criadores de raças nacionais, entre elas a Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga em 1934. (ALMEIDA PRADO, 2008).

Entre as décadas de 1940 e 1970 houve consolidação e expansão da raça, atingindo patamar econômico nunca visto anteriormente. Nesta época, houve corrente de criadores visando mudar o perfil da raça deixando de lado características funcionais e valorizando a morfologia dos animais.

A partir da década de 1990 a raça começou a trilhar caminho mais claro em vários aspectos. Houve aumento da preocupação dos técnicos e criadores com aspectos de andamento e funcionais como um todo (ALMEIDA PRADO, 2008).

Atualmente a raça encontra-se subdividada em, basicamente, duas linhas. A primeira, envolvendo criadores que dão maior importância a aspectos morfológicos dos animais e a outra cuja preocupação é obter cavalos com boa funcionalidade, em especial o andamento.

1.2. Melhoramento genético de equinos Mangalarga

O melhoramento genético da raça Mangalarga tem se baseado em uma síntese subjetiva de informações genealógicas e de tabelas de pontos atribuídos no momento do registro definitivo dos animais (a partir dos três anos de idade) (MOTA E GIANNONI, 1994). Nessas tabelas, o cavalo é comparado com um tipo padrão estabelecido pela ABCCRM, no qual os pesos (número de pontos) são máximos (animal ideal da raça – 100 pontos). Este julgamento envolve avaliações estáticas, dinâmicas e comportamentais, sendo que os equinos com pontuação mais elevada são considerados superiores (MOTA E GIANNONI, 1994).

Normalmente as pesquisas têm focado a 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 E GIANNONI, 1994, ALMEIDA PRADO, 2005, MOTA E ALMEIDA PRADO, 2005, MOTA et al. 2006).

Do total de animais registrados até dezembro de 2003 na ABCCRM (aproximadamente 170 mil), 88% mostraram-se endogâmicos (média de 5,4%), indicando que a utilização deste método de acasalamento é amplamente difundida pelos criadores (ALMEIDA PRADO, 2005). Além disso, até aquela data, a raça Mangalarga abrangia 4.944 criadores, os quais possuíam no mínimo um e no máximo 1.184 animais (média de 32). O número médio de progênies por garanhão e égua foi 23,8 e 4,4, respectivamente, sendo o intervalo médio de gerações da raça igual a 9,5 anos (MOTA et al., 2006).

1.3. Marcadores moleculares

Marcador molecular é toda e qualquer variação oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar que esses marcadores segregam-se de acordo com as leis mendelianas para características monogênicas, ou apresentam distribuições compatíveis com as esperadas para características poligênicas, um marcador molecular é também definido como marcador genético (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Do ponto de vista molecular ocorrem três tipos principais de variações ou polimorfismos na molécula de DNA: o número de sequências núcleo nas regiões repetitivas; as inserções e deleções (InDels) e as alterações de uma única base (“Single Nucleotide Polymorphisms” - SNPs).

Os polimorfismos ocorrem tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam em substituição de aminoácido na sequência protéica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora polimorfismos sinonímicos não alterem a sequência protéica, podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro, e, conseqüentemente afetar a quantidade de proteína produzida. A quantidade de proteína produzida também pode ser afetada quando ocorrem alterações nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro (5' UTR e 3' UTR). Além disso, polimorfismos gênicos podem promover processamentos alternativos, geração ou supressão de códons de terminação, alteração nos códons de iniciação da tradução e alterações no padrão de expressão de genes quando a troca de bases ocorre em sequências promotoras (GUIMARÃES E COSTA, 2002). Polimorfismos localizados em sequências intrônicas ganharam maior importância em função de achados recentes que demonstraram essas regiões como codificadoras de pequenos RNAs com função determinante na regulação da expressão gênica (NAKAYA et al., 2007).

Entre as vantagens atribuídas aos marcadores moleculares destacam-se o alto polimorfismo, o fato de não sofrerem influência do meio ambiente, de serem em geral codominantes, de poderem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo, e caracterizá-lo a partir de células ou tecidos (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma das maiores contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Essa técnica foi desenvolvida em meados da década de oitenta (MULLIS E FALOONA, 1987), mas sua importância só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação da PCR em diagnósticos de doenças (SAIKI et al., 1985). A técnica consiste na multiplicação *in vitro* de fragmentos de DNA de interesse, catalisada por uma DNA polimerase termoestável, a fim de que se tenha material genético suficiente para se proceder determinadas análises. A quantidade de DNA molde necessária para a detecção do produto de amplificação pela técnica de PCR é mínima tornando possível a análise do DNA obtido de uma única célula.

Entre as várias classes de marcadores moleculares, estão os SSRs (*Single Sequences Repeats*) ou microssatélites e os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Marcadores microssatélites são pequenas sequências, geralmente não codificadoras, de 1 a 6 pares de bases, repetidas em *tandem* (em sequência) e, normalmente em número menor que 100 repetições. A detecção de polimorfismos de microssatélites se dá por amplificação por PCR de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos em função do número variável de elementos repetitivos. Esses marcadores apresentam alto polimorfismo, codominância, facilidade de detecção por PCR, facilidade de determinação dos alelos e genótipos, ocorrendo com grande frequência e ampla distribuição ao longo de todo o genoma da maioria dos organismos eucariotos.

Os marcadores de DNA conhecidos por RFLPs foram inicialmente aplicados na detecção de mutações no material genético de vírus e, posteriormente, em outros organismos (BOTSTEIN et al., 1980). O termo RFLP pode ser traduzido como polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por restrição da fita de DNA. Esta fragmentação ou corte é obtida por meio do uso de enzimas de restrição (KELLY E SMITH, 1970). Estas enzimas possuem sítios específicos de clivagem, de modo que um

rearranjo da fita de DNA, por inserção, deleção ou mutações pontuais pode eliminar ou criar um novo sítio de restrição, modificando o tamanho dos fragmentos obtidos pela clivagem do DNA (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). A detecção dos fragmentos resultantes da digestão do DNA pode ser visualizada, após a separação por eletroforese, por meio da sua transferência e imobilização em uma membrana de “nylon”, técnica conhecida por “Southern Blot”, e hibridização com sondas de DNA homólogas ao DNA imobilizado. Uma vez que os RFLPs possuem ampla distribuição no genoma e codominância, esta categoria de marcadores genéticos abriu perspectiva relevante no estudo do genoma, contribuindo imensamente para o desenvolvimento dos mapas genômicos (BOTSTEIN et al., 1980), renovando o interesse no uso de marcadores genéticos em estudos de localização de QTLs ou “Quantitative Trait Loci” e, conseqüentemente, na Seleção Assistida por Marcadores - MAS (WELLER et al., 1990; WOMACK et al., 1992).

Muitos dos polimorfismos descritos pelo método de “Southern Blot” têm sido transformados em marcadores baseados em PCR. Para a análise de RFLP por meio de PCR, a PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), as extremidades da sonda que revelou o polimorfismo são sequenciadas e essas sequências são utilizadas para a síntese de “primers” complementares. Com o crescente desenvolvimento dos projetos de sequenciamento do genoma das principais espécies animais e vegetais, os “primers” podem também ser desenvolvidos a partir de sequências publicadas, selecionando-se aquelas que delimitam polimorfismos descritos (REGITANO, 1996). Esses “primers” são utilizados para amplificar a região que contém os sítios polimórficos de restrição. Os fragmentos produzidos pela digestão dos produtos de amplificação podem ser então analisados em gel de agarose (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998) ou em gel de poliacrilamida. A PCR-RFLP tem sido aplicada no diagnóstico de doenças hereditárias em humanos (SAIKI et al., 1985) e em animais, bem como na verificação de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de características de interesse econômico (COUTINHO E REGITANO, 1995).

A despeito da técnica de PCR-RFLP ser de fácil e rápida execução após padronização e passível de ser realizada em laboratórios de genética molecular

dotados de estrutura básica, ela só pode ser aplicada nos casos em que os polimorfismos de interesse, SNPs ou InDels, estejam localizados nos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição já isoladas e comercializadas. Dessa forma, a aplicação da técnica se torna restrita sendo, muitas vezes, necessária a utilização de metodologias alternativas de genotipagem entre as quais a PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism), as PCRs alelo específicas e o sequenciamento direto de produtos de PCR. A metodologia de sequenciamento direto de produtos de PCR, considerado *padrão ouro* na detecção de alterações na sequência do DNA, difere do sequenciamento de plasmídeos em relação ao molde e oligo iniciador utilizados. Neste método, o DNA molde é o produto de PCR e o oligo iniciador é um dos mesmos, *forward* ou *reverse*, utilizados na reação de amplificação.

Com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA com rapidez e custos relativamente baixos, o acesso ao DNA alcançou um patamar mais informativo, com possibilidades mais amplas para estudos da quantificação e distribuição da variabilidade genética. Em análises intraespecíficas, de comparações de populações ou indivíduos, tem sido possível obter, simultaneamente, informações sobre dezenas, ou mesmo centenas, de polimorfismos nucleotídeos do tipo “Single Nucleotide Polymorphisms” – SNPs. Cada sítio polimórfico pode ser tratado como um loco da genética tradicional e, conseqüentemente, podem ser aplicados procedimentos de análises semelhantes para a obtenção de informações sobre parâmetros genético-populacionais.

Marcadores moleculares permitem que os genótipos dos indivíduos sejam determinados em muitos locos para várias espécies diferentes (O’ BRIEN E GRAVES, 1991), possibilitando que parâmetros populacionais como freqüências alélicas e genotípicas sejam estimadas. Estas informações permitem a comparação de freqüências entre populações e revelam diferenças em suas composições genéticas que podem contribuir para variações fenotípicas (MOODY *et al.*, 1996). Quando o acasalamento entre os indivíduos da população ocorre ao acaso, a probabilidade de que um indivíduo encontre um parceiro de um dado genótipo é igual à freqüência relativa daquele genótipo na população. O acasalamento ao acaso, com respeito às combinações genotípicas, equivale à combinação aleatória dos gametas produzidos

pela população (CROW E KIMURA, 1970). Nessa situação, existe uma relação simples entre as frequências alélicas e genotípicas, constante ao longo das gerações. Essa relação foi demonstrada independentemente por Hardy e Weinberg, em 1908, e é conhecida como Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dessa forma, o fato de que os polimorfismos de DNA não se encontrarem em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma determinada população, pode ser indicativo de que os mesmos estiveram sujeitos a seleção ou deriva genética ao longo das gerações.

Entretanto, para a identificação das regiões do DNA responsáveis por características de interesse, geralmente, recorre-se a algumas estratégias diferentes, como a localização de QTLs ou “Quantitative Trait Loci” pela análise de regiões microssatélites do maior número possível de indivíduos de grandes famílias, originárias de acasalamentos direcionados (HALEY, 1995). Porém, a aplicação dessa ferramenta esbarra na dificuldade de se constituir famílias para o estudo e no elevado custo para a manutenção dos animais, principalmente em espécies cujo intervalo entre gerações é grande. Além disso, após a identificação de QTLs ainda há um longo caminho a percorrer até a descoberta dos genes diretamente implicados com o fenótipo.

Uma metodologia alternativa para minimizar esses problemas é a busca de genes candidatos principais, onde o objetivo é estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características em questão, na tentativa de pesquisar variações de genes específicos entre indivíduos que apresentam fenótipos diferentes (WOMACK, 1993). A estratégia do gene candidato tem como maior vantagem o fato de não ser obrigatória a genotipagem de um grande número de indivíduos de grandes famílias originados de acasalamentos direcionados, uma vez que, a princípio, espera-se que o polimorfismo estudado seja determinante direto de variação fenotípica.

2. Sistema Imune

2.1. Receptores de membrana TLR4 e CD14

Com o rápido avanço da Bioquímica, da Biologia Molecular e da Genômica Comparativa, fatores moleculares envolvidos na fisiologia de características de interesse, entre as quais a resposta imune, o desenvolvimento muscular e a fertilidade, se tornaram conhecidos ao longo dos últimos anos.

O gene *CD14*, codificador de um receptor de lipopolissacarídeos (LPS), apresenta papel crucial no reconhecimento celular de LPS bacterianos (KITCHENS, 2000; LANDMANN et al., 2000). O mecanismo de reconhecimento de LPS também envolve moléculas do tipo TLR (*toll-like receptor*) (FUJIHARA et al., 2003), entre elas a codificada pelo gene *TLR4* (*toll-like receptor 4*). Abordagens genômicas têm sido utilizadas no estudo do papel das moléculas CD14 e TLR no mecanismo imune de humanos (TAKEUCHI & AKIRA, 2002; VERCELLI, 2002). Em cavalos, a molécula CD14 foi relacionada com doenças nas quais lipopolissacarídeos estavam implicados, como endotoxemia associada à cólica (JANICKE et al., 2003; KIKU et al., 2003).

O LPS é uma endotoxina que atua como antígeno fraco, não específico, pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar mecanismos intracelulares ligados a processos inflamatórios. Durante a ativação desses mecanismos ocorre a formação de cininas que atuam como mediador do processo inflamatório, ativador de basófilos, mastócitos e células endoteliais. Outro processo induzido pelo LPS é a secreção de citocininas espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas e prostaglandinas pelos macrófagos. A resposta inflamatória pode ser induzida mesmo com pequenas quantidades dessa endotoxina (RIETSCHEL et al., 1994, citados por FOCK, 2005).

JIANG et al. (2005) descrevem a estrutura dos LPS como um lipopolissacarídeo central (lipídeo A) e o O-polissacarídeo de tamanho variável (geralmente com mais de 50 monossacarídeos). A morfologia das colônias das bactérias indica o estado da O-

glicosilação (lisa ou rugosa). LPS com cadeias longas de O-polissacarídeos forma colônias de bactérias lisas enquanto aqueles com cadeias mais curtas apresentam colônias rugosas.

O LPS deve se ligar à célula por meio da ligação do complexo LPS-LBP (lipopolissacarídeo – proteína ligante de lipopolissacarídeo) ao CD14 para que haja a ativação celular (WRIGHT et al., 1990). Os monócitos, macrófagos e, em menor proporção, os granulócitos, possuem receptores de superfície CD14, provendo capacidade de se ligarem ao complexo formado pelas proteínas carregadoras e a endotoxina, além de receptores para endotoxina livre (ZIEGLER-HEITBROCK E ULEVITCH, 1993, citados por FOCK, 2005).

O receptor CD14 é encontrado na forma solúvel (sCD14) (BAZIL et al., 1989) e também ligado à membrana (mCD14) (WRIGHT et al., 1990). O sCD14 é encontrado no plasma, entretanto as células que o secretam não foram ainda claramente identificadas (TOBIAS et al., 1999). O CD14 tem afinidade pelo LPS-LPB circulante, formando então o complexo LPS-LBP-CD14. (WRIGHT et al., 1990).

O TLR4 foi descrito como um receptor essencial (ANTAL-SZALMAS et al., 2000, citados por FOCK, 2005) juntamente com a molécula MD-2 para a ativação celular desencadeada pelo LPS (SHIMAZU et al., 1999; AKASHI et al., 2000, citados por FOCK 2005). Dessa maneira o CD14, TLR4 e MD-2 formam um complexo receptor do LPS (MIYAKE, 2003; BEUTLER, 2003, citados por FOCK, 2005).

As proteínas do grupo *Toll-like receptor* (TLR) são decisivas no reconhecimento de componentes moleculares de patógenos e na ativação da resposta imune inata e, como decorrência, desencadeiam a resposta imune adaptativa (ADEREM E ULEVITCH, 2000). As proteínas TLR são codificadas por um grupo ancestral de genes encontrados tanto em invertebrados quanto em vertebrados (TAKEDA et al., 2003). Os genes da família TLR dos mamíferos atuam na linha de frente no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como bactérias, vírus, protozoários e fungos (VASSELON & DETMERS, 2002; KAISHO & AKIRA, 2006).

Os padrões moleculares das maiores classes de patógenos são reconhecidas por dez TLRs de mamíferos (MENZIES E INGHAM, 2006; De SCHEPPER, 2008). Os TLRs reconhecem desde ácidos nucleicos até LPS. TLR2 e TLR4 reconhecem componentes

da célula bacteriana e são críticos na resposta imune contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (UNDERHILL et al., 1999).

Em revisão de literatura, GODOWSKI (2005) destacou que a resposta intracelular à presença do LPS no organismo pode variar de acordo com o complexo de reconhecimento extracelular. Mesmo na ausência do receptor CD14 na membrana celular, o complexo TLR4-MD2 consegue reconhecer o LPS na forma rugosa. Esse reconhecimento ativa exclusivamente o complexo de reações que dependem da proteína intracelular MyD88, levando a produção de importantes citocininas pró inflamatórias incluindo TNF- α (Fator de necrose tumoral - α). Na presença do CD14 o complexo de reconhecimento do LPS pode ativar também uma via independente de MyD88 resultando na expressão de Interferon- β , um importante agente no combate a vírus, bactérias e células de tumores.

Desregulações na sinalização TLR's têm sido relacionadas ao aparecimento de diversas doenças, e SNP's identificados nos TLR's tem sido relacionados a essas condições (SANTINI et al., 2008). Mutações no gene TLR4 em camundongos resistentes ao LPS impedem que o receptor sinalize de forma efetiva as células desses animais. (POLTORAK et al., 1998, citado por FOCK, 2005).

MOURA et al. (2008) associaram o SNP A896G SNP (ID: rs 4986790) do gene do receptor TLR4 a infecção por *Helicobacter pylori* em humanos, enquanto SANTINI et al. (2008) relacionaram o polimorfismo C1196T (SNP ID: rs 4986791) do mesmo gene ao câncer gástrico. Por meio de sequenciamento WERNERS et al. (2006) demonstraram a presença de 10 SNP's no gene TLR4 equino dos quais quatro resultam em mutações na sequência de aminoácidos do receptor. Os autores defendem que uma maior compreensão dos efeitos dos polimorfismos genéticos possivelmente envolvidos na resposta do sistema imune inato, poderia explicar de forma mais clara a resposta individual ao LPS, conseqüentemente aos patógenos.

Do mesmo modo alguns SNP's do gene do receptor CD14 foram estudados na tentativa de relacioná-los a doenças. FARIA et al. (2009) buscaram relacionar o polimorfismo C159T à gravidade da doença pulmonar na fibrose cística em humanos. Os autores relataram que o genótipo TT não afeta a gravidade da doença, mas parece ser fator de risco para o quadro pulmonar. VIRTÁ et al. (2008) demonstraram que o

mesmo polimorfismo é significativamente relacionado ao nível de Imunoglobulina E no soro de crianças infectadas por *Helicobacter pylori*.

2.2. Cadeia Pesada da Imunoglobulina E

As imunoglobulinas (Ig) desempenham papel fundamental no reconhecimento de corpos estranhos. São divididas em nove classes que apresentam diferenças em suas estruturas e funções. O arranjo das Ig's consiste em quatro cadeias protéicas, sendo duas leves e duas pesadas. As cadeias pesadas são ligadas entre si e cada uma delas é ligada a uma cadeia leve em uma das extremidades. As cadeias são divididas em domínios variáveis (V), que conferem especificidade às Ig's e, em domínios constantes (C). Cadeias leves apresentam um domínio constante do tipo κ ou λ e uma cadeia variável. As cadeias pesadas apresentam, além do domínio variável, três ou quatro domínios constantes. Imunoglobulinas do tipo G, A e D apresentam em sua cadeia pesada três domínios constantes do tipo γ , α e δ respectivamente, ao passo que as do tipo M e E quatro domínios constantes do tipo μ e ϵ , respectivamente (GOLDSBY et al., 2002).

Os anticorpos IgE (imunoglobulina E) são potentes mediadores das reações de hipersensibilidade imediata e responsáveis pelo reconhecimento dos alérgenos e a comunicação aos mastócitos e basófilos. Por meio desse processo, a histamina e outras substâncias que mediam a reação alérgica são liberadas no organismo (GOLDSBY et al., 2002). Sua interação com as células se dá por meio do reconhecimento das regiões constantes da cadeia pesada pelos receptores específicos $Fc\epsilon RI$, além dos receptores de baixa afinidade $Fc\epsilon RII/CD23$ (GOULD et al., 2003). Dessa maneira a cadeia pesada atua como âncora quando faz a ligação na superfície celular.

Seus níveis séricos foram associados a reações alérgicas específicas (CURIK et al., 2003). Doenças respiratórias, eczemas, febre, sensibilidade a comidas são reações bastante comuns mediadas pela IgE em mucosas e pele. Na corrente sanguínea os

basófilos interagem com as moléculas de IgE causando anafilaxia sistemática, um efeito raro porém mais perigoso que os demais. (GOULD et al., 2003).

As diferentes imunoglobulinas compartilham alguns genes de suas estruturas, porém algumas regiões são específicas para cada uma. A molécula IgE equina, codificada em parte pelo gene $C\epsilon$, é similar às imunoglobulinas de outras espécies (NAVARRO et al., 1995). O gene $C\epsilon$ equino apresenta quatro exons, cada um responsável pela codificação de um domínio da região constante da cadeia pesada da IgE (WAGNER, 2005).

Estudos demonstraram que alterações no gene codificador da cadeia pesada da IgE podem alterar sua função. Segundo PAN et al. (1996) polimorfismos no gene $C\epsilon$ em humanos podem afetar a expressão de IgE funcional no caso de urticária crônica. WAGNER et al. (2001) detectaram alguns polimorfismos no gene $C\epsilon$ equino e sugeriram que diferentes alótipos podem influenciar as funções da IgE nas ligações com os receptores $Fc\epsilon$ e, conseqüentemente, na resposta do sistema imune.

3. Análise estatística

3.1. Conceitos e Parâmetros Genético-Populacionais

A descrição da variabilidade genética entre e dentro de populações necessita de medidas da quantificação, distribuição e da manutenção da variabilidade genética.

As principais medidas utilizadas em trabalhos com marcadores moleculares são a proporção de locos polimórficos, número de alelos, o índice de fixação (F) e a diversidade genética.

Em seguida, serão apresentados os conceitos e parâmetros genético-populacionais que serão utilizados neste trabalho.

3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A reprodução sexuada cruzada é comum entre as espécies de vertebrados, incluindo espécie *Equus caballus*. Esse padrão de reprodução permite previsões teóricas sobre a dinâmica dos alelos e genótipos nas populações e nas famílias. É comum que previsões teóricas não concordem com o que é encontrado em populações reais, sejam elas naturais ou sob acasalamentos controlados. Também, frequentemente os modelos teóricos não incorporam todas as variáveis envolvidas no processo de sucessão de gerações. Ainda assim, os modelos teóricos são úteis, pois as discrepâncias podem oferecer pistas sobre os principais fatores que estão influenciando as propriedades genéticas de determinada população ou de grupo de populações (NEI, 1987; HARTL E CLARK, 2006).

O primeiro e mais simples modelo sobre o comportamento dos genes nas populações foi proposto em 1908, independentemente, por Hardy e Weinberg. Esse modelo é conhecido como lei de Hardy-Weinberg e é aplicável a populações grandes de espécies de reprodução sexuada cruzada. As premissas são acasalamentos ao

acaso e exclusão de fatores que alteram as frequências gênicas, como seleção, migração, deriva e mutação. Como consequência, as frequências genóticas serão determinadas pelas frequências gênicas e, ambas, permanecerão constantes geração após geração, indefinidamente. O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a constância de frequências gênicas e genóticas na população ao longo das gerações.

A relação entre as frequências gênicas e frequências genóticas é descrita matematicamente pela lei de Hardy-Weinberg. Adotando-se a nomenclatura de Nei (1987) e considerando uma espécie diplóide e um loco com dois alelos, A_1 e A_2 e supondo uma população constituída por n indivíduos, os números dos genótipos possíveis A_1A_1 , A_1A_2 e A_2A_2 serão, respectivamente, n_{11} , n_{12} e n_{22} . Desde que $n_{11} + n_{12} + n_{22} = n$, as frequências genóticas referentes a A_1A_1 , A_1A_2 e A_2A_2 ficam definidas, respectivamente, como:

$$X_{11} = \frac{n_{11}}{n}, \quad X_{12} = \frac{n_{12}}{n} \quad \text{e} \quad X_{22} = \frac{n_{22}}{n}.$$

A frequência gênica de A_1 é obtida por

$$x_1 = \frac{2n_{11} + n_{12}}{2n} = X_{11} + \frac{X_{12}}{2}$$

De forma semelhante, a frequência gênica de A_2 é dada por

$$x_2 = \frac{2n_{22} + n_{12}}{2n} = X_{22} + \frac{X_{12}}{2} = 1 - x_1$$

Sob as premissas de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas podem ser previstas a partir das frequências gênicas, pela expansão de um binômio $(x_1 + x_2)^2$, como segue:

$$X_{11} = x_1^2, \quad X_{12} = 2x_1x_2 \quad \text{e} \quad X_{22} = x_2^2$$

3.3. Índice de Fixação

Uma medida populacional relacionada com acasalamentos não casuais, que não estão de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, foi desenvolvida por S. Wright e pode ser positiva ou negativa (WRIGHT; 1978). Esse parâmetro genético-populacional é denominado *índice de fixação* simbolizado por F quando se trata de uma única população. Em análises de populações estruturadas em subpopulações, essa medida é simbolizada por F_{IS} .

Na verdade, o que se mede é o déficit de heterozigotos na população, quando comparada com o esperado se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se houver menos heterozigotos do que o esperado, o déficit é positivo. Ao contrário, se o heterozigoto é encontrado em proporção maior do que o esperado, o déficit é negativo, isto é, há excesso de heterozigotos. Caso a proporção de heterozigotos esteja de acordo com o esperado, o índice de fixação (F ou F_{IS}) não será diferente de zero. Essa é a base para o teste de significância do índice estimado (LI E HORVITZ, 1953, citados por NEI, 1987).

Utilizando a nomenclatura de NEI (1987), explicitada anteriormente, na análise de n indivíduos de uma única população a estimativa do índice de fixação é dada por:

$$\hat{F} = \frac{4n_{11}n_{22} - n_{12}^2}{(2n_{11} + n_{12})(2n_{22} + n_{12})}.$$

A hipótese da nulidade $H_0: F = 0$ é verificada pelo teste qui-quadrado, dada:

$$\chi_{(1)}^2 = nF^2,$$

com um grau de liberdade. Se a hipótese H_0 não for rejeitada, a população será considerada em equilíbrio, sem deficiência ou excesso de heterozigotos conforme o esperado por Hardy-Weinberg. A rejeição de H_0 indicará que há pelo menos um fator

influenciando as frequências genótípicas, promovendo, para o loco em consideração, mais cruzamentos entre semelhantes do que seria esperado.

3.4. Diversidade genética

A quantificação da dispersão dos dados nas escalas intervalar ou de razões pode usar como referência a média ou a mediana. Na escala nominal, por outro lado, esse referencial não existe. Utiliza-se, então, o conceito de *diversidade*, isto é, a distribuição das observações entre as categorias que compõem o conjunto de dados. A diversidade é uma medida da *incerteza* envolvendo uma predição (ZAR, 1984). A incerteza aumenta com a diversidade. Por exemplo, a diversidade pode ser usada para descrever uma população quanto à composição alélica de um loco. Se um alelo for retirado ao acaso do conjunto de alelos desse loco na população, a diversidade refletirá o grau de incerteza quanto à sua identidade. As duas medidas da variação genética intrapopulacional mais utilizadas atualmente são o *índice de diversidade de Shannon* e a *diversidade gênica de Nei*. Os dois índices são medidas da diversidade gênica, no sentido de que medem a variação alélica na população (VENCOVSKY *et al.*, 2007).

3.4.1. Índice de diversidade de Shannon (H)

Na década de 1940, Shannon desenvolveu, com base na teoria da informação, medida conhecida como *índice de diversidade* de Shannon ou de Shannon-Weaver (ZAR, 1984). Em genética, o índice de Shannon tem sido empregado como medida da diversidade gênica (alélica) intrapopulacional, principalmente depois da popularização dos marcadores moleculares baseados em DNA. A expressão de Shannon é dada por

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$$

onde, k é o número de categorias e p_i é a proporção encontrada na categoria i . Traduzindo para uma população e um loco, k seria o *número* de alelos encontrados na população e p_i a frequência do alelo i . Essa expressão pode ser modificada algebricamente para:

$$H' = \frac{n \ln n - \sum_{i=1}^k n_i \ln n_i}{n},$$

onde n é o tamanho da amostra, ou quantidade total de genes estudada, e n_i é o número observado do alelo i .

O número de categorias e a distribuição dos dados pelas categorias influenciam a magnitude do índice H' . No contexto genético, a diversidade será afetada pelo número de alelos e pela *equitabilidade* dos alelos, isto é, pelo grau de homogeneidade das frequências alélicas na população

O índice de diversidade de Shannon pode ser determinado para muitos locos, como é comum em trabalhos com marcadores moleculares. O que se obtém é uma média dos índices calculados para cada um dos locos. Considerando-se m locos, o índice de Shannon seria obtido pela fórmula

$$\bar{H}' = \frac{1}{m} \sum_1^m \frac{n \ln n - \sum_{i=1}^k n_i \ln n_i}{n}.$$

3.4.2. Diversidade gênica de Nei (H)

NEI (1978) desenvolveu o conceito de *diversidade gênica*, o qual tem sido útil na análise da variação genética intrapopulacional de todos os tipos de organismos. A diversidade gênica pode ser aplicada a qualquer organismo, independentemente do grau de ploidia e do sistema reprodutivo. Entretanto, a fundamentação utilizada pode gerar confusão com outra medida da genética de populações, conhecida como *heterozigosidade*.

Então, antes de tratar da diversidade de Nei, é conveniente descrever o significado de heterozigosidade. É claro que a heterozigose e a homozigose em locos gênicos, isto é, a ocorrência de genótipos heterozigotos e homozigotos nas populações nas famílias são atributos de espécies diplóides. Os conceitos de homozigose e heterozigose não têm sentido para organismos haplóides e não são aplicáveis a poliplóides.

Assim, considerando-se uma população de espécie diplóide, com acasalamentos aleatórios e apenas um loco, a *heterozigosidade* esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg é dada por:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2,$$

onde m é o número de alelos e x_i é a frequência do i -ésimo alelo. Portanto, a heterozigosidade corresponde ao complemento aritmético da homozigozidade esperada no equilíbrio, obtida como a soma de quadrados das frequências alélicas ($\sum x_i^2$). Quando dois ou mais locos são considerados, a média de todos os loci é a *heterozigosidade média* (H), que só corresponderá à proporção real de heterozigotos se as frequências genotípicas, dos locos estudados, estiverem em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população

Em organismos diplóides, duas interpretações podem ser dadas para a quantidade H . Em termos populacionais representa a média das proporções de genótipos heterozigotos por loco, de todos os loci estudados na população de acasalamentos aleatórios. Individualmente, significa a proporção locos do indivíduo que são esperados com genótipos heterozigotos.

NEI (1978) apenas utilizou a idéia de heterozigosidade para estabelecer uma medida que não depende do equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem mesmo do grau de ploidia do organismo. Para não causar confusão com a heterozigosidade, Nei denominou essa quantidade de *diversidade gênica*. Para determinado loco não são considerados genótipos, mas apenas os alelos presentes na população, como se os genótipos fossem desmembrados para formar um conjunto de alelos isolados, considerando-se a probabilidade de serem iguais dois alelos retirados aleatoriamente da população, ou seja, do conjunto de alelos. O complemento aritmético dessa quantidade é uma medida da variabilidade genética, a *diversidade gênica* de Nei. A fórmula é a mesma mostrada anteriormente para o cálculo da heterozigosidade esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg, como proporção de genótipos heterozigotos.

No caso particular de dois alelos por loco, o limite superior para H é 0,5, sendo que com mais de dois pode ser mais elevado. Além do número, as frequências dos alelos também influenciam o resultado. Quanto maior a uniformidade das frequências alélicas, maior o valor de H , de modo que, com dois alelos, $H=0,5$ só é obtido com alelos igualmente frequentes na população. Por isso, H também é uma medida da equitabilidade, ou homogeneidade das frequências alélicas.

Estritamente, a *diversidade gênica* não corresponde à proporção de heterozigotos na população, o que não teria sentido em organismos haplóides, por exemplo. Como a diversidade gênica está desacoplada de equilíbrio e ploidia, no máximo poderia ser considerada equivalente a uma heterozigosidade virtual. Ainda assim, a diversidade gênica de Nei tem interpretação genética explícita: corresponde à soma das frequências de todos os heterozigotos possíveis na população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mesmo que sejam apenas heterozigotos virtuais (NEI, 1987).

3.5. Teste de Neutralidade Seletiva

A neutralidade seletiva de alelos em um loco pode ser verificada por diferentes metodologias. Uma das mais comuns na literatura é o teste de neutralidade de Ewens-Watterson, baseado no modelo mutacional conhecido em inglês por “infinite allele model” (IAM), ou *modelo com número infinito de alelos*. Esse modelo admite que cada evento mutacional é único, produzindo um alelo diferente dos que já existem na população. Embora seja uma perspectiva simplificada da mutação gênica, é útil para comparações com frequências alélicas observadas (EWENS, 1972; WATTERSON, 1978; FUERST, 1977).

A idéia básica é comparar os dados observados sobre o número de alelos de um loco com o que seria esperado somente da pressão de mutação, ou seja, o aporte de alelos na população sem a interferência de fator diferente da mutação. Isto quer dizer que os alelos são, em princípio, *seletivamente neutros*.

Como as populações reais são finitas, pode haver perdas de alelos por deriva genética. O balanço entre mutação e deriva genética pode ser expresso pela proporção de homozigotos, pela soma de quadrados das frequências alélicas, ou pelo índice de fixação. O modelo IAM admite que os homozigotos são autozigotos, em um genótipo homozigoto, as duas cópias do alelo têm origem em um único evento mutacional anterior. Então, para n alelos na população, tem-se:

$$\hat{F} = \sum p_i^2 = p_1^2 + p_2^2 + \dots + p_n^2 = \frac{1}{4N\mu + 1}.$$

onde, \hat{F} é o índice de fixação e N é o tamanho da população e μ é a taxa de mutação de alelos neutros (KIMURA, 1983, citado por HARTL E CLARK, 2006; NEI, 1973, 1987; WRIGHT, 1969, 1978).

WATTERSON (1978) mostrou que o índice de fixação F , definido como soma de quadrados das frequências alélicas, pode ser usado para teste estatístico. Primeiramente, determina-se a configuração esperada de frequências alélicas de k

alelos e amostra de tamanho n . Depois, por processo de amostragem com modelo IAM, amostras são geradas aleatoriamente, e com os valores de F das amostras aleatórias define-se intervalo de confiança para o F esperado. Se o valor de F observado estiver dentro do intervalo de confiança, será considerado em concordância com o esperado na condição de seletividade neutra.

Se a hipótese nula de evolução neutra for rejeitada, a comparação da homozigosidade observada e a homozigosidade esperada indicará o tipo de seleção que, possivelmente, está presente. Homozigosidade observada maior do que homozigosidade esperada ($H_o > H_e$) sugere seleção direcional atuando sobre os alelos do loco. Por outro lado, a homozigosidade observada for menor do que a homozigosidade esperada ($H_o < H_e$) constitui indicativo de seleção balanceada (SLATKIN, 1994, 1996).

4. Objetivos

Diante do exposto, este trabalho terá como objetivos:

- (1) Padronizar metodologia alternativa de análise por PCR-RFLP para os polimorfismos do gene *CD14* de modo que possam ser realizados em laboratórios de Genética Molecular dotados de estrutura básica e tenham custos de genotipagem mais baixos, permitindo a maior difusão na utilização desses polimorfismos em trabalhos científicos e, futuramente, em programas de seleção e melhoramento genético de equinos.

- (2) Caracterizar, por meio da estimação das frequências alélicas e genotípicas, o polimorfismo de DNA de genes relacionados à fisiologia do sistema imune (*CD14*, *TLR4*, *Cε*) equino da raça brasileira Mangalarga, e, a partir disso, determinar seu potencial de aplicação em estudos de associação entre marcadores moleculares e características de interesse econômico na raça.

5. REFERÊNCIAS

ABCCRM – Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga. **Ficha de registro dos animais** - CD – Rom, Dezembro de 2003.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune responses. **Nature**, v. 406, p. 782-87, 2000.

AKASHI, S. et al. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4 – MD-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 268, p. 172-77, 2000.

ALMEIDA PRADO, R. S. 2005. **Parâmetros populacionais em cavalos da raça Mangalarga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ALMEIDA PRADO, R. S. **Raízes Mangalarga**. São Paulo, SP: Empresa das Artes, 2008. p. 13-28, ISBN 978-85-89138-90-1.

ANTAL-SZALMAS, P. et al. Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes. **Cytometry**, v. 41, p. 279-88, 2000.

BAZIL, V. et al. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. **Mol Immunol.**, v.7, p.657-62, 1989.

BEUTLER, B. Science review: Key inflammatory and stress pathways in critical illness – the central role of the Toll-like receptors. **Critical Care**, v. 7, p. 39-46, 2003.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 195-205.

CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper International Edition, 1970. 591p.

CURIK, I. et al. Association between the MHC gene region and variation of serum IgE levels against specific mould allergens in the horse. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 35 (S1), p. 177, 2003.

DE SCHEPPER, S. et al. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of Escherichia coli mastitis in dairy cattle. **Vet. Res.**, v.39, p. 1-5. 2008.

EWENS, W. J. The sampling theory of selectively neutral alleles. **Theor. Pop. Biol.** v. 3, p. 87-112. 1972.

FARIA, E. J. et al. Associação entre os polimorfismos dos genes MBL2, TGF- β 1 e CD14 com a gravidade da doença pulmonar na fibrose cística. **J. bras. pneumol.** [online]. V..35, n. 4, p. 334-42, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.

FOCK, R. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarideo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NF κ B**. 2005. 177p.. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

FUERST, P. A.; CHAKRABORTY, R.; NEI, M. Statistical studies on protein polymorphism in natural populations i. distribution of single locus heterozygosity. **Genetics** , v.86, p. 455-83, 1977.

FUJIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: role of the receptor complex. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 100, p.171-194. 2003.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunologia**. 4^a ed. Revinter, 2002, p.83-102.

GOULD, H. J. et al. THE BIOLOGY OF IGE AND THE BASIS OF ALLERGIC DISEASE. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 579-628, 2003.

GUIMARÃES, P.E.M.; COSTA, M.C.R. SNPs: Surtis diferenças de um código. **Biociência**, n. 26, p. 24-27 2002.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. 2006. **Principles of Population Genetics**. 4th ed. Sanderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2006, 517p, ISBN: 9780878933068.

JANICKE, H.; TAYLOR, P.M.; BRYANT, C.E. Lipopolysaccharide and interferon gamma activate nuclear factor kappa B and induce cyclo-oxygenase-2 in equine vascular smooth muscle cells. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 2, p. 133-140, 2003.

JIANG, Z. et al. CD14 is required for MyD88-Independent LPS signaling. **Nature Immunology**, v. 6, n. 6, p. 565-70, 2005.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, n. 5, p. 979-87, 2006.

KELLY, T.J.; SMITH, H.O. A restriction enzyme from haemophilus influenzae. II. Base sequence of the recognition site. **Journal of Molecular Biology**, v.51, p. 393-409, 1970.

KIKU, Y.; et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 8, p. 857-863. 2003.

KIMURA, M. **The Neutral Teory of Molecular Evolution**. Cambridge University Press, Cambridge, 1983.

KITCHENS, R. L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. **Chemical Immunology**, v. 74, p. 61-82. 2000.

LANDMANN, R.; MULLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 1, p. 295-304, 2000.

LI, C. C.; HORVITZ, D.G. .Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American journal of human genetics**, v. 5, p. 107-117, 1953.

MENZIES, M.; INGHAM, A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.109, p.23-30. 2006.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4 – MD-2: unique roles for MD-2. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 119-28, 2003.

MOODY, D. E. et al. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S. Estudo genético da pontuação total em equinos 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**, v. 55, p. 207-210, 2006.

MOTA, M. D. S.; GIANNONI, M. A. . Efeitos genéticos e de ambiente sobre alguns caracteres de locomoção e desenvolvimento em equinos da raça Mangalarga. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 89, n. 512, p. 191-196, 1994.

MOURA, S. B. et al. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection in children with and without duodenal ulcer. **Microbes and Infection** , v.10, p. 1477-83, 2008.

MULLIS, K. B.; FALOONA F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAKAYA, H. L. et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. **Genome Biology**, v. 8, R43, 2007.

NAVARRO, P. et al. The complete cDNA and deduced amino acid sequence of equine IgE. **Molecular Immunology**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 1995.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987, 512 p.

O'BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 58, p. 1124-1151, 1991.

PAN, K-Y. et al. Polymorphism of IgE gene in chronic urticaria. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, p. 90-95, 1996.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085-88, 1998.

REGITANO, L. C. A. **Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim**. 1996. 132p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RIETSCHER, E. T. et al. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function. **Faseb J.**, v. 8, p. 217-25, 1994.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science** , v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANTINI, D. et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 360-64, 2008.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. . **Exp. Med.**, v. 189, p. 1777-82, 1999.

SIMÕES, F. **Mangalarga e o cavalo de sela brasileiro**. São Paulo: Editora dos criadores LTDA., 3ª edição, 254p, 1983.

SLATKIN, M. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. **Genet. Res.**, v. 64, p. 71-74, 1994.

SLATKIN, M. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. **Genet. Res.**, v. 68, p. 259-260, 1996.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.** v.21, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. **Microbes and Infection**, 4, 887, 2002.

UNDERHILL, D. M. et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p 14459-14463, 1999.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infec. Immunity**, v. 70, p. 1033-1041, 2002.

VENCOVSKY, R.; NASS, L.L.; CORDEIRO, C.M.T.; FERREIRA, M.A.J.S. **Amostragem em Recursos Genéticos Vegetais**. In: Nass, L.L. (Editor Técnico) Recursos Genéticos Vegetais. Editora Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. pp 232-280.

VERCELLI, D. The functional genomics of CD14 and its role in IgE responses: an integrated view. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 14-51, 2002.

VIRTA, M. et al. Interaction between CD14 – 159C>T polymorphism and Helicobacter pylori is associated with serum total immunoglobulin E. **Epidemiology of Allergic Disease**, v.38, p.1929-34, 2008.

WAGNER, B. et al. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphisms of the equine Cε gene. **Vet. Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 193-202, 2001.

WATTERSON, G. A. The homozygosity test of neutrality. **Genetics**, v.88, p. 405-417, 1978.

WELLER, J. I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, p. 2525-2537, 1990.

WERNERS, A. H. et al. Genotyping of Toll-Like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse : An investigation into the influence of genetic polymorphisms on the LPS induced TNF-α response in equine blood. **Vet. Immunology and Immunopathology**, v.111, p.165-73, 2006.

WOMACK, J. E. et al. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3360-3370, 1992.

WOMACK, J. E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1199- 1203, 1993.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations. Vol. 2.** Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, Chicago, 1969.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations: Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations.** Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, Chicago, 1978.

WRIGHT, S. D. CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. **Science**, v. 249, p. 1431-33, 1990.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** 2 ed. Englewood Cliffs : Prentice-Hall, 1984. 718p.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. e ULEVITCH, R. J. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. **Immunol. Today**, v. 14, p. 121-25, 1993.

CAPITULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO SISTEMA IMUNE EM EQUINOS DA RAÇA MANGALARGA

1. RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem do SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino por PCR-RFLP, bem como a caracterização em equinos da raça Mangalarga deste e de outros dois polimorfismos, o AY_005808: c.1530A>G do *TLR4* e o AX_463789: g.133T>C do *Cε*, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características relacionadas à fisiologia do sistema imune 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 do SNP AY_731081: g.1900T>C do gene *CD14* equino. Entretanto, tal polimorfismo provavelmente não ocorre em equinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador na raça. Os parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* e o AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* demonstraram a possibilidade de realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao sistema imune na raça Mangalarga.

Palavras chave: *CD14*, *Cε*, DNA, cavalos, polimorfismos, *TLR4*

2. Introdução

Dificuldades inerentes à espécie equina, entre as quais os baixos índices reprodutivos, os altos intervalos de geração e parto, o baixo número de progênies por parição e o período de gestação relativamente longo, têm sido alguns dos contratempos encontrados quando se pesquisa na área de melhoramento genético utilizando princípios de genética quantitativa.

Particularmente na raça Mangalarga, a de maior intensidade de uso nas diferentes regiões do País (MARIANTE *et al.*, 2003), o fato dos animais apresentarem uso bastante variado (trabalho em fazendas de bovinos, cavalgadas, enduro, equoterapia, turismo equestre e exposições) leva os criadores à busca por características bastante distintas, dificultando a implantação de programas de melhoramento genético que englobem todos os seguimentos. Neste sentido, pesquisas objetivando a caracterização da variabilidade de genes relacionados a características de interesse zootécnico são o primeiro passo em direção à seleção assistida por marcadores, a qual auxiliaria os criadores em suas tomadas de decisão acerca de quais animais encaminhar para a reprodução.

De acordo com VAN EENENNAAM *et al.* (2007), as distribuições alélicas são tão importantes quanto o tamanho da amostra na detecção dos efeitos de polimorfismos gênicos sobre características de interesse. Isto decorre do fato de que nos estudos de associação o número de indivíduos dos grupos a serem comparados, ou seja, de genótipos diferentes, está relacionado às frequências alélicas. Além disto, a ocorrência do alelo favorável de um polimorfismo em uma população tem relação inversa com o seu potencial de incremento em programas de melhoramento.

O sistema imune, de vital importância nos animais, confere proteção diante de patógenos estranhos, incluindo bactérias, vírus, parasitas e toxinas. Em cavalos, distúrbios neste sistema normalmente resultam em fadiga, infecções frequentes, perdas de apetite e peso (MARVIN E HAISMAN, 2008), levando à perdas econômicas consideráveis dentro do sistema de produção. O gene *CD14*, codificador de um receptor de lipopolissacarídeos, apresenta papel crucial no reconhecimento celular de

lipopolissacarídeos bacterianos (KITCHENS, 2000; LANDMANN *et al.*, 2000). O mecanismo de reconhecimento de lipopolissacarídeos também envolve moléculas do tipo TLR (*toll-like receptor*) (FUJIHARA *et al.*, 2003), entre elas a codificada pelo gene *TLR4* (*toll-like receptor 4*). A imunoglobulina E (IgE) equina, codificada em parte pelo gene *Cε*, é similar às imunoglobulinas de outras espécies (NAVARRO *et al.*, 1995) e seus níveis séricos foram associados a reações alérgicas específicas (CURIK *et al.*, 2003).

VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005) identificaram dez SNPs em quatro genes relacionados a resposta imune em equinos, *CD14*, *TLR4*, *Cε* e *FcεR1 alpha*, e desenvolveram técnicas de genotipagem com utilidade em estudos de associação entre polimorfismos gênicos e os fenótipos de interesse. Entre estes polimorfismos, destacam-se três alterações não sinônimas: uma no *CD14* (AY_731081:g.1900T>C), genotipada por meio de sequenciamento direto de produtos de PCR; uma no *TLR4* [AY_005808:c.1530A>G, identificada como A1636G:AY005808 por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005)] e outra no *Cε* (AX_463789:g.133T>C), ambas genotipadas por PCR-RFLP. Entretanto, a prévia investigação *in silico* da sequência que contém o polimorfismo do *CD14* demonstrou que, de forma inédita, este também poderia ser genotipado por meio da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Acil*.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem do SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino por PCR-RFLP, bem como a caracterização em equinos da raça brasileira Mangalarga, deste e de outros dois polimorfismos, o AY_005808:c.1530A>G do *TLR4* e o AX_463789:g.133T>C do *Cε*, a fim promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores e características de interesse na raça.

3. Material e métodos

3.1. 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, oriundos de seis fazendas localizadas no Estado de São Paulo. Amostras de cinco mL de sangue total de cada indivíduo foram colhidas por venipunctura da jugular esquerda utilizando tubos a vácuo com EDTA. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado ao anticoagulante e mantido sob refrigeração em gelo. Na sequência, as amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.2. Extração do DNA e genotipagem

Os processos de extração do DNA e genotipagem foram realizados nas estruturas do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP.

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 (SAMBROOCK, 1989). Ao final do procedimento, o DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1% e diluído para a concentração de trabalho de 10 ng/uL.

A genotipagem dos polimorfismos AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14*, AY_005808:c.1530A>G do *TLR4* e o AX_463789:g.133T>C do *Cε* foi realizada 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 estão apresentados na Tabela 1(pág. 52).

Na análise do SNP AY_731081:g.1900T>C do *CD14*, um fragmento de 259 pares de bases contendo sequência do exon 2 do gene foi amplificado utilizando par de “primers” confeccionados com auxílio do programa “primer” 3 (ROZEN E 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 (Netprimer: Premier Biosoft International). A confirmação de que cada sequência iniciadora era única para o gene alvo na espécie de interesse foi realizada utilizando a ferramenta “primer”-BLAST do NCBI. Cada reação, com volume final de 25 µL, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,24 µM de cada “primer”, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 1,2 mM de MgCl₂; 0,32 mM de cada dNTP e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Após desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, a amplificação foi realizada por meio de 36 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 7 µL de produto de PCR e 10 U da enzima de restrição *AcI* (New England Biolabs, EUA) a 37 °C por 16 horas.

Para análise do polimorfismo AY_005808:c.1530A>G do *TLR4*, um fragmento de 2.172 pares de bases contendo sequência do exon 3 do gene foi amplificado utilizando par de “primers” descrito por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). Em volume final de 25 µL, foram empregados 50 ng de DNA genômico, 0,24 µM de cada “primer”, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,32 mM de cada dNTP e 0,75U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). Seguida da desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, a amplificação foi conduzida em 40 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 64 °C por 40 segundos e 72 °C por 2 minutos. A extensão final ocorreu a 72 °C por 10 minutos. De forma semelhante à VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005), os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 12 µL de produto de PCR e 5 U da enzima de restrição *BssSI* (New England Biolabs, EUA) a 37 °C por 12 horas.

Na análise do SNP AX_463789:g.133T>C do C ϵ , um fragmento de 1.601 pares de bases contendo sequência do exon 1 do gene foi amplificado utilizando par de “primers” descrito por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). Cada reação, com volume final de 25 μ L, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,24 μ M de cada “primer”, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 1,6 mM de MgCl₂; 0,32 mM de cada dNTP e 0,75U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). Após desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, a amplificação foi realizada por meio de 44 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram digeridos a 37 °C por 12 horas em meio de reação contendo 12 μ L de produto de PCR e 3 U da enzima de restrição *Eco47I* (Fermentas, EUA), isoisômero da *Avall* utilizada por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005).

Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA do gene *CD14* foram separados em géis de agarose de alta resolução, a 3%. Para separação eletroforética dos fragmentos resultantes da digestão dos amplicons dos genes *TLR4* e C ϵ foram utilizados géis de agarose convencional a 3%. 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. A fotodocumentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi conduzida utilizando-se sistema digital. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Objetivando a confirmação da eficiência da genotipagem do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino por meio da técnica de PCR-RFLP, produtos de PCR de dez indivíduos da amostra foram submetidos a sequenciamento direto. Após purificação inicial com polietilenoglicol e quantificação em gel de agarose a 1%, os fragmentos previamente amplificados foram submetidos às reações de sequenciamento utilizado o conjunto de reagentes DYEnamic ET Dye Terminator Kit para sequenciador MegaBACE (GE Healthcare, UK), conforme instruções do fabricante. Quatro microlitros da mistura de reagentes do kit, 0,5 μ M do “primer” *forward* (F) utilizado na reação de amplificação, 18,2 ng de DNA amplificado e purificado (10% em

ng do tamanho do fragmento em pb) e volume de água ultra pura necessário para completar 10 μ L, foram submetidos a 30 ciclos de temperatura de 95 °C por 20 segundos e 60 °C por 1 minuto. Posteriormente, os produtos das reações de sequenciamento passaram por nova purificação com acetato de amônia 0,2 M e etanol 70% e foram sequenciados em equipamento automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare, UK).

3.3. Análise estatística dos dados

Utilizando o programa PopGene 1.32 (YEH *et al.*, 1999), foram calculados para a população estudada as frequências alélicas e genotípicas, as heterozigosidades observadas e esperadas e o Equilíbrio de Hardy Weinberg para cada um dos sítios polimórficos analisados. Com o mesmo programa foram obtidas estimativas da diversidade gênica de Shannon (Zar, 1984) e de Nei (NEI, 1978). O índice de fixação F (WRIGHT, 1978) foi estimado e testado, com Qui-quadrado, conforme procedimento apresentado por Nei (Nei, 1987). 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 feitas pelo programa Popgene 1.32 estabeleceram um intervalo de confiança para F e pelo programa PyPop verificou a significância do desvio normalizado entre F esperado e F obtido com o teste exato de Slatkin (SLATKIN, 1996).

4. Resultados

Na amostra de animais estudada apenas o alelo C do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino foi detectado. O genótipo CC foi caracterizado pela presença de três fragmentos de 116, 105 e 38 pb (pág. 54). De acordo com o mapa de restrição da sequência do fragmento amplificado, o genótipo TT seria caracterizado pela presença de dois fragmentos de 143 e 116 pb e os heterozigotos (CT) pela presença de quatro fragmentos, correspondentes à combinação dos dois padrões homozigotos.

O sequenciamento direto do fragmento amplificado do gene *CD14* de dez indivíduos da amostra confirmou os genótipos obtidos por meio da técnica de PCR-RFLP. Todos os indivíduos sequenciados apresentaram a mesma sequência na região estudada, ou seja, uma citosina (C) na posição 1900, considerando a deposição AY731081 como referência. A Figura 2 (pág. 55) mostra eletroferogramas obtidos de duas das dez amostras sequenciadas evidenciando a região do polimorfismo.

Em razão da não ocorrência do polimorfismo do *CD14* na amostra de animais estudada, não foi possível a estimação dos parâmetros genético-populacionais propostos no subitem análise estatística dos dados.

Nas Figuras 3 e 4 (págs. 56 e 57) encontram-se os padrões de bandas obtidos, após a eletroforese em gel de agarose, para o três genótipos dos polimorfismos *TLR4* e *Cε*, respectivamente.

Para o polimorfismo AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* equino, foram detectados os alelos A e G identificados anteriormente por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). O genótipo AA foi caracterizado pela presença de um fragmento de 2.172 pb. O genótipo GG apresentou fragmentos de 1.638 e 534 pb. Os heterozigotos (AG) foram caracterizados pela presença de três fragmentos de 2.172, 1.638 e 534 pb.

Em relação ao polimorfismo AX_463789:g.133T>C do *Cε*, foram detectados, os alelos C e T, descritos anteriormente por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). O genótipo CC foi caracterizado pela presença de fragmentos de 754, 310, 228, 214,

37, 35 e 23 pb, enquanto TT apresentou fragmentos de 623, 310, 228, 214, 131, 37, 35 e 23 pb. Os heterozigotos (CT) foram caracterizados pela presença de nove fragmentos, correspondentes à combinação dos dois padrões homozigotos. Entretanto, nas condições protocolares utilizadas no presente trabalho, não foi possível a visualização dos fragmentos com tamanho inferior a duzentos pares de bases.

Na Tabela 2 (pág. 53) estão apresentadas as frequências alélicas e genótípicas observadas para os três polimorfismos analisados. O alelo C do polimorfismo do gene *CD14* equino apresentou-se fixo na amostra de animais estudada. Dessa forma, apenas indivíduos de genótipo CC foram encontrados. Em relação ao polimorfismo do *TLR4*, o alelo G prevaleceu sobre o A e os genótipos AG e GG, com frequências próximas, prevaleceram sobre o AA. Os alelos C e T do polimorfismo do *Cε* apresentaram frequências muito próximas. O mesmo ocorreu com a distribuição dos genótipos, onde, apesar disto, observou-se pequena prevalência do genótipo heterozigoto sobre os homozigotos.

Para o SNP AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* equino a heterozigosidade observada (0,44) apresentou valor muito próximo a esperada (0,43). Em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o valor do Qui-quadrado calculado (0,029) foi menor que o tabelado (3,84), não apresentando significância a 5%. A diversidade gênica de Shannon foi 0,571, em um máximo de 0,693. A diversidade gênica de Nei foi 0,428, próxima ao máximo de 0,5. O índice de fixação *F* (-0,019) foi não significativo ($p = 0,06$).

Em relação ao polimorfismo AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* equino, a heterozigosidade observada (0,38) apresentou valor inferior à esperada (0,50). O valor do Qui-quadrado calculado (9,28) para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi significativo a 1%. A diversidade gênica de Shannon foi 0,6917, muito próxima do máximo de 0,693. A diversidade gênica de Nei de 0,497 encontra-se, praticamente, no limiar máximo. O índice de fixação *F*, com valor 0,244, foi significativo a 5%.

Os resultados obtidos para os testes de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e significância de Slatkin para os polimorfismos dos genes *TLR4* e *Cε* encontram-se na Tabela 3 (pág. 53). Para o SNP do *TLR4*, o resultado foi não significativo ($p = 0,126$), ao passo que, para o polimorfismo do *Cε* observou-se significância estatística a 5 % ($p = 0,016$).

5. Discussão

5.1. Polimorfismo do *CD14*

Na condição de codificador de receptor de lipopolissacarídeos (LPS), o gene *CD14* se relaciona ao reconhecimento de LPS de bactérias (KITCHENS, 2000; LANDMANN *et al.*, 2000). O LPS é uma endotoxina que atua como antígeno fraco, não específico, pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar mecanismos intracelulares ligados a processos inflamatórios (RIESTSCHEL *et al.*, 1994, citado por FOCK, 2005). O receptor CD14 é encontrado na forma solúvel (sCD14) e também ligado à membrana celular (mCD14) (WRIGHT *et al.*, 1990). Os monócitos, macrófagos e, em menor proporção, os granulócitos, possuem receptores de superfície CD14 (ZIEGLER-HEITBROCK E ULEVITCH, 1993 citados por FOCK, 2005). Acredita-se que o complexo LPS-LBP (lipopolissacarídeo – proteína ligante de lipopolissacarídeo) se ligue ao mCD14 para que haja a ativação celular (WRIGHT *et al.*, 1990).

Em humanos, o SNP C159T do gene do receptor CD14 foi associado à asma e ao nível de IgE em populações do norte e noroeste da Índia (SHARMA *et al.*, 2004). Recentemente, FARIA *et al.* (2009) procuraram relacionar o mesmo polimorfismo à gravidade da doença pulmonar na fibrose cística. Os autores relataram que o genótipo TT não afeta a gravidade da doença, mas parece ser um fator de risco para o quadro pulmonar. VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005) consideraram o SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino potencialmente relevante para modificações fisiológicas do sistema imune uma vez que é não sinônimo, acarretando a troca de um aminoácido valina por um alanina na sequência da proteína codificada a partir do exon 2 do gene.

A fixação do alelo C do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino na amostra de animais estudada diverge dos obtidos por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005) em cavalos de raça não especificada, os quais encontraram

baixa frequência do alelo T (0,14) em amostra com sete indivíduos. Esta diferença de resultados tem origem na provável ausência do polimorfismo do gene *CD14* em equinos Mangalarga. Entre as possíveis explicações tem-se que a população fundadora da raça poderia ser homocigota para este loco em particular, ou a fixação do alelo C pode ter ocorrido posteriormente em razão de seleção indireta. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da rara ocorrência do alelo T na raça, o que poderia ser confirmado com amostragens mais amplas.

A provável inexistência do SNP do *CD14* na raça Mangalarga não permitirá estudos de associação entre o marcador e características relacionadas ao sistema imune na raça. Neste sentido 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. Estes resultados vão de encontro ao conhecimento de que polimorfismos que segregam satisfatoriamente em determinadas raças podem não segregar ou segregar de forma inadequada em outras. Este fato reforça a necessidade e importância de estudos de avaliação das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos de DNA em diferentes raças de espécies de interesse, incluindo os equinos, 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.

A eficiência da análise por PCR-RFLP do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino foi confirmada pelo sequenciamento de fragmentos amplificados da região de interesse de indivíduos de genótipos CC. Neste sentido, o método alternativo proposto no presente trabalho mostrou-se robusto, 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.

5.2. Polimorfismo do *TLR4*

Os produtos protéicos codificados pelos genes da família TLR dos mamíferos atuam no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (VASSELON E DETMERS, 2002; KAISHO E AKIRA, 2006), desde ácidos nucléicos até LPS. Ainda não é totalmente conhecido o mecanismo a partir do qual o receptor codificado pelo gene *CD14* envolve-se no sinal de transdução do LPS, uma vez que sua molécula não possui porção transmembrana. POLTORAK *et al.* (1998), citados por FOCK (2005) identificaram o TLR4 (Toll-like receptor 4) como proteína ligada a transdução de sinal de LPS reconhecido pelo CD14, tendo em vista que mutações no gene *TLR4* de camundongos impediram a efetiva sinalização de LPS através da membrana plasmática. ANTAL-SZALMAS *et al.* (2000), citados por FOCK (2005), propuseram o TLR4 como co-receptor essencial à sinalização de LPS.

Desarranjos na sinalização por TLRs têm sido relacionados ao surgimento de diversas doenças em humanos, e SNPs identificados na família de genes TLR associados a essas condições (SANTINI *et al.*, 2008). MOURA *et al.* (2008) relacionaram o SNP A896G do gene *TLR4* humano à infecção por *Helicobacter pylori*. Enquanto SANTINI *et al.* (2008) associaram o polimorfismo T1196C do mesmo gene ao desenvolvimento de câncer gástrico. Em equinos, o polimorfismo AY_005808:c.1530A>G do *TLR4* pode ser de importância fisiológica tendo em vista que provoca a troca de um aminoácido metionina por um valina na sequência protéica codificada a partir do exon 3 do gene (VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.*, 2005). Esta troca não sinônima, embora conservativa, abre possibilidades para diferenças no mecanismo de reconhecimento de lipopolissacarídeos, alterando a resposta imune.

As frequências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *TLR4* equino na amostra de animais estudados (Tabela 2) divergiram das encontradas por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005) em cavalos de raça não especificada (0,44 para o alelo G e 0,56 para A). Da mesma forma, as frequências genótípicas diferiram das relatadas pelos mesmos autores (0,375 para o genótipo AA, 0,375 para AG e 0,25 para GG). Estas desigualdades de frequências alélicas e genótípicas podem decorrer

da pequena amostragem (oito animais) e da diferente raça estudada por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). Por outro lado, frequências alélicas discrepantes para polimorfismos de gene candidato podem ser indicativas de sua relação com fenótipos contrastantes que ocorram entre raças. Em contrapartida à seleção indireta, podem representar apenas efeito deriva genética.

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 *TLR4*. Parâmetros referentes à variabilidade genética como a diversidade gênica de Shannon e diversidade gênica de Nei indicam diversidade intrapopulacional. O índice de fixação *F* mostrou que não há déficit de heterozigotos na população em decorrência de acasalamentos não casuais. Entretanto, embora não significativa, a probabilidade associada ao Qui-quadrado obtido está muito próxima do nível de significância de 5%. Os resultados não significativos dos testes de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e de Slatkin (Tabela 3) apontaram que não há indicativo forte de acasalamentos preferenciais ou de seleção em favor de um dos alelos. No entanto, mais uma vez, os valores observados estão próximos do limite de significância. Neste sentido, embora a população de Mangalarga estudada esteja em equilíbrio para o loco *TLR4*, há que se considerar que os valores de parâmetros genético-populacionais obtidos próximos da significância não excluem definitivamente algum potencial de aplicação em estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça.

5.3. Polimorfismo do C ϵ

As imunoglobulinas (Ig), fundamentais no reconhecimento de corpos estranhos ao organismo, são divididas em cinco classes com diferenças na estrutura e função. O arranjo das Igs consiste de duas cadeias protéicas leves e duas pesadas, as quais são divididas em domínios variáveis, que conferem especificidade, e em domínios constantes. Os anticorpos da classe IgE são potentes mediadores das reações de hipersensibilidade imediata, sendo responsáveis pelo reconhecimento dos alérgenos e pela interação com os receptores Fc ϵ dos mastócitos e basófilos (GOLDSBY *et al.*, 2002). Doenças respiratórias, eczemas, febre, alergia a alimentos são reações bastante comuns mediadas pela IgE nas mucosas e na pele (GOULD *et al.*, 2003). Em equinos os quatro domínios constantes das cadeias pesadas da molécula de IgE são codificadas pelos quatro exons do gene C ϵ (WAGNER, 2006).

Estudos demonstraram que alterações no gene codificador das cadeias pesadas da IgE podem modificar a sua função. Segundo PAN *et al.* (1996), polimorfismos no gene C ϵ humano podem afetar a expressão de IgE funcional no caso de urticária crônica. WAGNER *et al.* (2001) detectaram polimorfismos no gene C ϵ equino e sugeriram que diferentes alótipos da IgE podem influenciar sua ligação a receptores Fc ϵ de células do sistema imune. Também em equinos, níveis séricos de IgE foram associados a reações alérgicas específicas (CURIK *et al.*, 2003). O polimorfismo AX_463789:g.133T>C do gene C ϵ equino, identificado por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005), apresenta grande potencial para modificações fisiológicas do sistema imune de cavalos uma vez que acarreta a troca não conservativa de um aminoácido serina por prolina no domínio I da cadeia pesada da imunoglobulina E.

As frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo do gene C ϵ equino na população de animais Mangalarga (Tabela 2) diferiram daquelas relatadas por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005) em cavalos de raça não informada (0,13 para o alelo C e 0,87 para o T; 0,26 para o genótipo CT e 0,74 para o TT). Assim como o discutido para o polimorfismo do *TLR4*, estas divergências nas distribuições alélicas e genotípicas podem ter origem na pequena amostra (19 animais) e na

diferente raça estudada por VYCHONDILOVA-KRENKOVA *et al.* (2005). Entretanto, a seleção indireta para alelos diferentes em populações ou raças com propósitos variados bem como o efeito de fundador ou de deriva genética são eventos que não podem ser descartados.

O valor inferior da heterozigosidade observada em relação à esperada para o polimorfismo do *Cε* pode representar indício da ocorrência de seleção a favor dos genótipos homozigotos em detrimento dos heterozigotos. No teste de Hardy-Weinberg, o valor do Qui-quadrado calculado indicou que a população estudada não se encontra em equilíbrio para o loco em questão. Desta forma, os alelos do polimorfismo do loco *Cε* não se distribuem de acordo com o esperado em populações que não sofrem pressões seletivas. Os valores obtidos para diversidades gênicas de Shannon e de Nei indicaram diversidade intrapopulacional. O índice de fixação significativo indicou déficit de heterozigotos, isto é, ocorrência de acasalamentos preferenciais. Além disto, os testes de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e de Slatkin foram significativos (Tabela 3), sugerindo que os alelos do loco *Cε* estão sob pressão seletiva. Desta forma, os parâmetros genético-populacionais estimados para o polimorfismo estudado do gene *Cε* equino demonstraram aplicabilidade em estudos de associação entre o marcador e características de importância na Mangalarga.

6. Conclusões

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que: (1) o método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem do SNP AY_731081: g.1900T>C do gene *CD14* equino. Entretanto, tal polimorfismo provavelmente não ocorre em equinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador de DNA na raça; (2) os parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* e AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* na amostra de animais estudada demonstraram a possibilidade de realização de pesquisas visando

a associação entre os marcadores e características relacionadas ao sistema imune na raça Mangalarga.

7. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pelos suportes financeiros concedidos.

8. Referências

ANTAL-SZALMAS, P. et al. Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes. **Cytometry**, v. 41, p. 279-88, 2000.

CURIK, I. et al. Association between the MHC gene region and variation of serum IgE levels against specific mould allergens in the horse. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 35 (S1), p. 177, 2003.

FARIA, E. J. et al. Associação entre os polimorfismos dos genes MBL2, TGF- β 1 e CD14 com a gravidade da doença pulmonar na fibrose cística. **J. bras. pneumol.** [online]. V..35, n. 4, p. 334-42, 2009.

FOCK, R. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarideo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NF κ B.** 2005. 177p.. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

FUJIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: role of the receptor complex. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 100, p.171-194. 2003.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunologia**. 4^a ed. Revinter, 2002, p.83-102.

GOULD, H. J. et al. THE BIOLOGY OF IGE AND THE BASIS OF ALLERGIC DISEASE. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 579-628, 2003.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, n. 5, p. 979-87, 2006.

KITCHENS, R. L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. **Chemical Immunology**, v. 74, p. 61-82. 2000.

LANCASTER, K. et al., PyPop update - a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. **Tissue Antigens**, v. 69, s. 1, p. 192-197, 2007.

LANDMANN, R.; MULLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 1, p. 295-304, 2000.

MARIANTE, A. S., MCMANUS, C., MENDONÇA, J. F. Country report on the state of animal genetic resources - Brasil. IV série, Documentos 99, 1a.edição, Embrapa, Brasília, 121p., 2003.

MARVIN, S., HAISMAN, M.D. 2008. Immune system may help explain fatigue in horses and human. Disponível em <www.dressagedaily.com/2008/dd_200802/20080218.htm> Acesso em março de 2008.

MOURA, S. B. et al. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection in children with and without duodenal ulcer. **Microbes and Infection** , v.10, p. 1477-83, 2008.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

PAN, K-Y. et al. Polymorphism of IgE gene in chronic urticaria. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, p. 90-95, 1996.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085-88, 1998.

RIETSCHEL, E. T. et al. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity ando function. **Faseb J.**, v. 8, p. 217-25, 1994.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Nova York: Cold Spring Harbor , 1989. v. 1.

SANTINI, D. et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 360–64, 2008.

SHARMA. M. et al. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. **Immunogenetics**, v. 56, p 544–547, 2004.

SLATKIN , M. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. **Genet. Res.**, v. 68, p. 259-260, 1996.

VAN EENENNAAM, A. L. et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **J. Anim. Sci**, v. 85, p. 891-900, 2007.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infec. Immunity**, v. 70, p. 1033-1041, 2002.

VYCHODILOVA-KRENKOVA, L.; MATIASOVIC, J.; HORIN, P. Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: CD14, TLR4, Cepsilon, and Fcepsilon R1 alpha. **Int J Immunogenet**, v. 32, p. 277–83, 2005.

WAGNER, B. et al. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphisms of the equine C ϵ gene. **Vet. Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 193-202, 2001.

WAGNER, B. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 155–64, 2006.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations: Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations**. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, Chicago, 1978.

WRIGHT, S. D. CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. **Science**, v. 249, p. 1431-33, 1990.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada, 1999.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. e ULEVITCH, R. J. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. **Immunol. Today**, v. 14, p. 121-25, 1993.

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, troca de aminoácido na sequência da proteína e região gênica de localização dos polimorfismos.

Gene	Sequência dos “primers” 5’- 3’	TA (°C)	Enzima (fabricante)	Número GenBank	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Região Gênica
CD14	F - CCC AGC GCA CTG AGT TCT R - CTG ATA TCC CCA CGG TCA G	64	Acil (New England Biolabs, USA)	AY731081	g.1900T>C	V – A (conservativa)	Exon 2
TLR4	F - GGC CTC AAC CAT CTC TCC ACC T R - CCA CGG TTT ACC ATC CAG CAA G	64	BssSI (New England Biolabs, USA)	AY005808	c.1530A>G	M – V (conservativa)	Exon 3
Cε	F - GTC TCC AAG CAA GCC CCA TTA R - TTT ACC AGG GTC TTT GGA CAC CTC	68	Eco47I (Fermentas, USA)	AX463789	g.133T>C	S – P (não conservat.)	Exon 1

Tabela – 2. Frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14*, AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* e AX_463789:g.133T>C do gene *Cε* em amostra representativa da população de equinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.

Polimorfismo	Frequência alélica		Frequência genotípica		
	C	T	CC	CT	TT
AY_731081:g.1900T>C (<i>CD14</i>)	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00
AY_005808:c.1530A>G (<i>TLR4</i>)	0,31	0,69	0,09	0,44	0,47
AX_463789:g.133T>C (<i>Cε</i>)	0,47	0,53	0,28	0,38	0,34

Tabela – 3. Teste *F* de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson^a e significância de Slatkin para os sítios polimórficos dos genes *TLR4* e *Cε* em amostra representativa da população de equinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.

Polimorfismo	N	N ^c alelos	Interv. Conf. de F		F obs.	F esp. ±0,167	Fnd ^b	p
			Inf.	Sup.				
AY_005808: c.1530A>G (<i>TLR4</i>)	302	2	0,503	0,993	0,571	0,842 ±0,167	-1,622	0,126
AX_463789: g.133T>C (<i>Cε</i>)	302	2	0,503	0,993	0,501	0,842 ±0,167	-2,040	0,016

^a Intervalo de *F* com 95% de confiança, obtido com 1.000.000 de simulações.

^b Desvio normalizado entre *F* observado e *F* esperado.

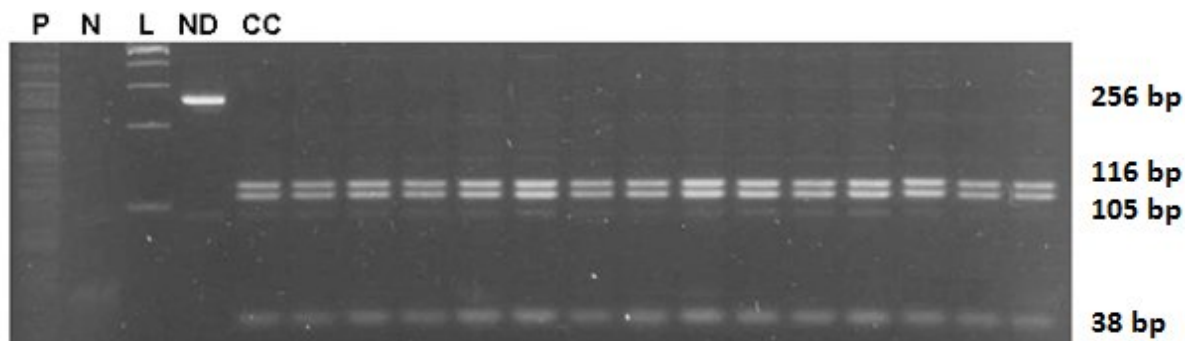


Figura – 1. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 3% do polimorfismo AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *Acil*, N o controle negativo de amplificação, L o padrão de peso molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *Acil* (259 pb) e CC o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Acil*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

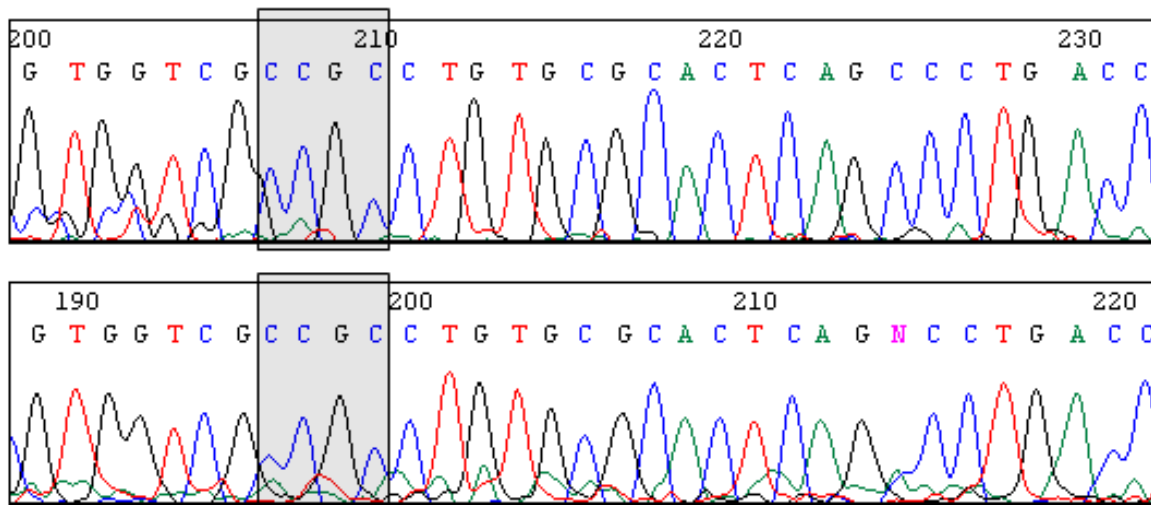


Figura – 2. Eletroferograma parcial do sequenciamento direto de produtos de PCR de 259 pares de bases do gene *CD14* de dois equinos da raça Mangalarga estudados no presente trabalho. A região em destaque evidencia o sítio de localização do SNP AY_731081:g.1900T>C do gene *CD14* equino e mostra que ambos os indivíduos apresentaram a mesma sequência na região, ou seja, uma citosina (C) na posição 1900, considerando a deposição AY731081 como referência.

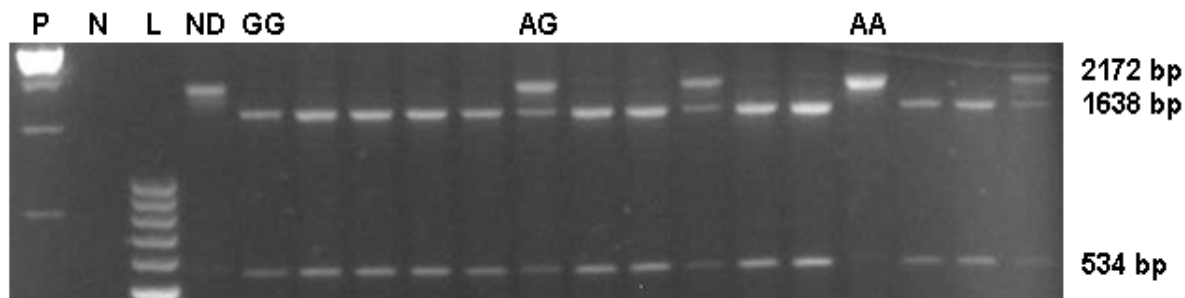


Figura – 3. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo AY_005808:c.1530A>G do gene *TLR4* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *BssSI*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *BssSI* (2172 pb) e GG, AG e AA indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *BssSI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

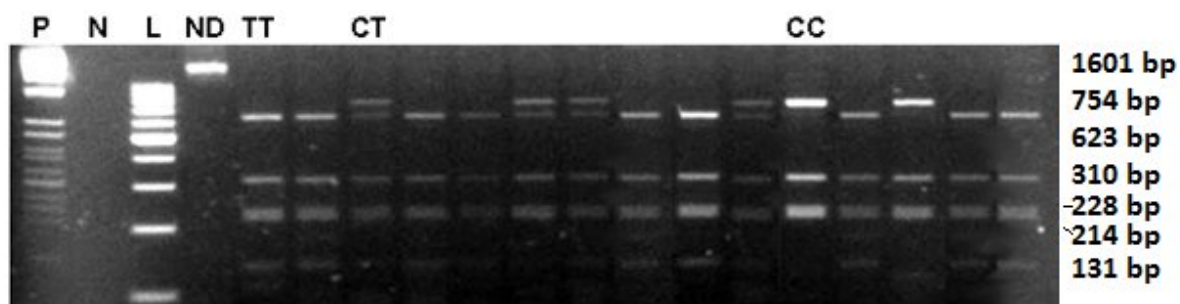


Figura – 4. Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo AX_463789:g.133T>C do gene $C\epsilon$ equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *Eco47I*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *Eco47I* (1601 pb) e TT, CT e CC indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Eco47I*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

D
I
S
S.

/

P
R
I
O
L
I

R.
A.

2
0
1
0