

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**SNPS EM GENES CANDIDATOS PARA POTENCIAL ATLÉTICO COMO
POSSÍVEIS MARCADORES PARA DESEMPENHO EM CORRIDA EM EQUINOS
DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

**Guilherme Luis Pereira
Zootecnista**

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**SNPS EM GENES CANDIDATOS PARA POTENCIAL ATLÉTICO COMO
POSSÍVEIS MARCADORES PARA DESEMPENHO EM CORRIDA EM EQUINOS
DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

Guilherme Luis Pereira

Orientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

**Coorientadora: Dra. Luciana Correia de Almeida
Regitano**

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

2014

M249i Pereira, Guilherme Luis
Snps em genes candidatos para potencial atlético como possíveis
marcadores para desempenho em corrida em equinos da raça quarto
de milha/ Guilherme Luis Pereira. -- Jaboticabal, 2014
xv, 69 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Rogério Abdallah Curi
Banca examinadora: Antonio de Queiroz Neto, Maurício Alvarenga
Mudado
Bibliografia

1. Índice de velocidade, 2. Conformação, 3. Herdabilidade, 4.
Trabalho, 5. Corrida. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 637.5:636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SNPS EM GENES CANDIDATOS PARA POTENCIAL ATLÉTICO COMO POSSÍVEIS MARCADORES PARA DESEMPENHO EM CORRIDA EM EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA

AUTOR: GUILHERME LUÍS PEREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ROGERIO ABDALLAH CURI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

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

Prof. Dr. ROGERIO ABDALLAH CURI

Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. ANTONIO DE QUEIROZ NETO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MAURICIO DE ALVARENGA MUDADO MUDADU

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Data da realização: 28 de fevereiro de 2014.

Dados Curriculares do autor

Guilherme Luis Pereira – solteiro, nascido em 19 de fevereiro de 1986, em Itaporanga, São Paulo. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em fevereiro de 2008, concluindo-o em julho de 2012. No período de Janeiro a Maio de 2012 realizou estágio de aperfeiçoamento em Genética Molecular aplicado ao Melhoramento Genético no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo. Em agosto de 2012 ingressou no curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV/UNESP – Campus Jaboticabal, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho ao Professor Dr. Marcílio Silveira da Mota (*in memoriam*), aos meus pais, ao meu Irmão, aos meus tios e avós, pelo incentivo, amor, força e pelo apoio, os quais sem dúvidas foram fundamentais para conclusão deste trabalho e a obtenção deste título.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela oportunidade de uma vida repleta de saúde, inteligência e capacidades interiores para ir à busca dos meus ideais, concretizando-os sob suas Bênçãos, para no fiel cumprimento dos meus deveres.

Aos meus pais, José Luiz Pereira Filho e Lucia Benedita da Veiga Pereira, e ao meu irmão e amigo Eduardo Luis Pereira, pelos exemplos de bondade, honradez e companheirismo que me ajudaram a transpor com dignidade mais uma etapa em minha vida. Dando forças nas horas mais difíceis e ajudando de pronto em todo momento desta difícil caminhada para obtenção deste título.

A todos meus tios, em especial, ao tio Cesar e aos meus avós Dito e Braulina Veiga que sempre incentivaram e estiveram presentes em todas as fases da minha vida, tendo essencial participação na realização e conclusão desta etapa.

Ao prof. Dr. Rogério Curi Abdallah, que com sua competência profissional me aceitou como seu orientado e aluno de mestrado, compartilhou com humildade suas preciosas lições que manifestam-se em conhecimentos sólidos do aprendizado, cuja confiança em mim depositada é a grande bagagem que com orgulho levo do momento presente para o amanhã que me espera...

Aos professores Marcelo Vicari e Luciana Regitano, que desde a graduação me dedicaram confiança e paciência, sempre ensinando e assistindo em todas as necessidades da vida acadêmica e muitas vezes pessoais, indicando o melhor caminho a ser seguido com votos de sucesso sempre.

E a todos que amigos, primos e familiares que me ajudaram nesta caminhada os meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim agradeço a Capes, a Fundunesp e Embrapa por ceder auxílio financeiro e infraestrutura para que este trabalho fosse realizado e concluído com sucesso.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1.1 - Introdução.....	1
1.2 - Objetivos.....	3
1.3 - Revisão Bibliográfica.....	3
1.3.1 - Equinos no mundo e no Brasil.....	3
1.3.2 - A raça Quarto de Milha.....	5
1.3.3 - Melhoramento genético de equinos.....	7
1.3.4 - Fisiologia e metabolismo do músculo estriado esquelético	9
1.3.5 - Marcadores moleculares: aspectos gerais	11
1.3.6 - Marcadores SNPs.....	13
1.3.7 - Métodos de genotipagem de SNPs	15
1.3.8 - Marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos.....	16
1.3.9 - Genes candidatos para desempenho em equinos da raça Quarto de Milha.....	18
1.3.9.1 - <i>MSTN – myostatin</i>	18
1.3.9.2 - <i>PDK4 - piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4</i>	20
1.3.9.3 - <i>COX4I2 - cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2</i>	20
1.3.9.4 - <i>CKM - creatine kinase, muscle</i>	21
1.3.9.5 - <i>DMRT3 - doublesex and mab-3 related transcription factor 3</i>	22
2 - Referências.....	23
CAPÍTULO 2 - Polimorfismos em genes candidatos para desempenho em equinos de corrida da raça Quarto de Milha	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
1 - Introdução.....	34
2 - Material e Métodos.....	36
2.1 - Animais e dados de desempenho.....	36
2.2 - Coleta de Sangue, extração de DNA e genotipagem dos animais.....	37
2.3 - Frequências alélicas genotípicas dos SNPs estudados.....	40
2.4 - Associação entre SNPs estudados e característica de desempenho na linhagem de corrida.....	41
3 - Resultados.....	41
4 - Discussão	45
5 - Conclusões.....	50
6 - Referências.....	51
CAPÍTULO 3 - Estimativas de parâmetros genéticos de características morfométricas e de desempenho em equinos da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha	54

Resumo.....	54
Abstract.....	55
1 - Introdução	55
2- Material e Métodos.....	57
2.1 - Medidas corporais.....	57
2.2 - Teste de médias.....	58
2.3 - Medidas de Índice de Velocidade.....	58
2.4 - Efeitos e covariáveis considerados.....	58
2.5 - Modelo estatístico para obtenção das variâncias.....	59
2.6 - Estimativas de parâmetros genéticos e de ambiente.....	60
3 - Resultados.....	60
4 - Discussão	64
5 - Conclusões.....	66
6 - Referências.....	67

SNPs em genes candidatos para potencial atlético como possíveis marcadores para desempenho em corrida em equinos da raça Quarto de Milha

RESUMO - Dentro da raça Quarto de Milha, diferentes objetivos de seleção formaram linhagens com distintas habilidades, entre elas a de corrida e a de trabalho. Com menor efetivo, porém com grande representatividade econômica, a linhagem de corrida se destaca por possuir animais com capacidade de alcançar grandes velocidades em curtas distâncias. A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência. Os principais objetivos deste trabalho foram estimar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs g.38973231A>G do gene *PDK4* e g.22684390C>T do gene *COX4I2* em equinos Quarto de Milha de diferentes linhagens (corrida e trabalho) bem como avaliar a ocorrência de associações destes polimorfismos com características de desempenho (IV – Índice de Velocidade) na linhagem de corrida; (2) verificar a ocorrência de diferença nas frequências alélicas dos SNPs g.66493737C>T do gene *MSTN* e g.22999655C>A do gene *DMRT3* em equinos Quarto de Milha da linhagem de corrida contrastantes para IV e; (3) estimar parâmetros genéticos e ambientais para medidas corporais e IV da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha. Resultados do presente trabalho obtidos a partir de sequenciamento de DNA mostraram o *MSTN* com o alelo C próximo de fixado, com apenas um animal heterozigoto (CT). Na análise de 296 animais de corrida e 68 de trabalho, as diferenças de frequências alélicas e genotípicas se mostraram significativas para os genes *PDK4* e *COX4I2* entre as duas linhagens. O mesmo não foi observado quando estas frequências foram comparadas entre fenótipos extremos de corrida. Também não houve efeitos significativos no teste de associação entre os alelos dos dois polimorfismos e o IV. O SNP g.22999655C>A do gene *DMRT3* foi genotipado em 60 animais. Foram observadas herdabilidades de 0,21 a 0,69 e 0,17 para medidas morfométricas e IV, respectivamente. Observou-se correlação negativa moderada entre comprimento de corpo e de garupa e desempenho (-0,44 e -0,30, respectivamente) e baixa correlação positiva entre altura à cernelha (0,25) e desempenho. Estes resultados sugerem que os alelos dos genes *PDK4* e *COX4I2*, relacionados com melhor desempenho em corridas na raça PSI, estejam, talvez, relacionados à adaptações benéficas do metabolismo aeróbico e, dessa forma, tenham papéis secundários no desempenho em corridas curtas, predominantemente anaeróbicas, na raça Quarto de Milha. Embora não fosse esperada correlação negativa entre comprimento corporal e desempenho, isso pode ser explicado pela sua baixa correlação genética com as demais medidas e pela intensa seleção empírica realizada para comprimento corporal por parte dos criadores.

Palavras-chave: Índice de velocidade, Conformação, Herdabilidade, Trabalho, Corrida

SNPs in candidate genes for athletic potential as possible markers for race performance in Quarter Horses

ABSTRACT – In the Quarter Horse, different selection objectives led to the formation of lines with different skills, including racing and cutting. Less effective, but with great economic representation, the racing line present great sprinting speed over short distances on straight tracks. The cutting line is intended to evidence of functional character, exploring skills such as agility and obedience. The main objectives of this study were to estimate the allele and genotype frequencies of the g.38973231A>G (PDK4) and g.22684390C>T (COX4I2) SNPs in Quarter Horses (racing and cutting lines), as well as, in the racing line, to assess the occurrence of associations of these polymorphisms with performance trait (SI - speed Index); (2) verify the occurrence of differences in allele frequencies of g.66493737C>T (MSTN) and g.22999655C>A (DMRT3) SNPs in racing line of contrasting to IV, and (3) to estimate genetic and environmental parameters for body measurements and IV of the racing line. The results showed the MSTN gene with the C allele near fixed with just an animal heterozygote (CT). In the analysis of 296 racing animals and 68 cutting animals, the differences in allele and genotype frequencies were statistically significant for PDK4 and COX4I2 genes between the two lines. The same was not observed when these frequencies were compared between extreme phenotypes race. There was also no significant effects on test of association between the alleles of the two polymorphisms and IV. The g.22999655C>A (DMRT3) SNP was genotyped in 60 animals. Heritability from 0.21 to 0.69 for morphometric traits and 0.17 for IV were observed. There was moderate negative correlation between body and rump length and performance (-0.44 and -0.30, respectively) and low positive correlation between height at withers and performance (0.25) that alleles. These results suggest of PDK4 and COX4I2 genes associated with better performance in race of PSI, perhaps are related to the beneficial adaptations of aerobic metabolism, and thus have secondary role in the performance of short distances on straight tracks of the Quarter Horse, which is predominantly anaerobic. The negative correlation between body length and performance, can be explained by their low genetic correlation with other morphometric traits and by empirical selection for body length by the breeders.

Keywords: conformation, cutting, heritability, racing, speed index

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1.1 – Introdução

O cavalo da raça Quarto de Milha teve sua formação na América do Norte, a partir do século XVII, com a introdução de equinos de origem árabe e turca, trazidos por colonizadores europeus. Contudo, seu maior desenvolvimento ocorreu com a ocupação do oeste Norte Americano, devido à necessidade de cavalos robustos e versáteis, com aptidão à sela e tração, visto a dificuldade de se manter plantel variado de animais para atender as diversas necessidades. A população desses equinos cresceu e em 1940 fundou-se a *American Quarter Horse Association* (AQHA), primeira envolvendo a raça. Atualmente conta com aproximadamente cinco milhões de cavalos registrados em todo o mundo (ABQM, 2012).

Dentro da raça Quarto de Milha há subdivisão em diferentes segmentos de aptidão, provenientes de distintos objetivos de seleção, consideradas linhagens, entre as quais: a de trabalho, a de conformação e a de corrida. A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência, características consideradas de grande importância no manejo do gado a campo. Dentro desta linhagem sempre houve grande interesse na produção de cavalos com *cow sense* superior (ELLERSIECK et al., 1985). *Cow sense*, ou habilidade de trabalhar com o gado bovino, pode ser medida pela capacidade do cavalo em cercar o gado e apartar do rebanho um animal escolhido (HINTZ, 1980), com pouca assistência do cavaleiro (ELLERSIECK et al., 1985). A linhagem de corrida explora a aptidão dos animais quanto à velocidade em pistas retas e de curta distância. Destacadamente equinos desta raça tem melhor desempenho em corridas de curtas distâncias do que qualquer outra raça (ABQM, 2013), sendo os mais velozes cavalos do mundo e um dos mais velozes dentre todos os animais, podendo alcançar velocidades de até 88 km/h e percorrer, a partir de uma posição estática, $\frac{1}{4}$ de milha (402 metros, aproximadamente) em menos de 21 segundos (AMERICA'S HORSE DAILY, 2008).

Muitos dos processos fisiológicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm mostrado alguns aspectos semelhantes em humanos e equinos (DIAS et al., 2007; SCHÖRODER et al., 2011). Segundo Breazile (1996), em função do tipo de treinamento físico, as concentrações do oxigênio no tecido muscular podem variar e atuar sobre a regulação de seu metabolismo (aeróbico ou anaeróbico). Cavalos podem realizar variados tipos de exercícios físicos, indo do predominantemente aeróbico até o predominantemente anaeróbico. As corridas curtas da raça Puro-Sangue Inglês (PSI) e do Quarto de milha de corrida apresentam metabolismo muscular predominantemente anaeróbico. Já algumas classes de exercícios de arena, como apartação e rédeas, modalidades desempenhadas pela linhagem de trabalho da raça Quarto de Milha, intercalam curtos turnos de exercício anaeróbico com maiores períodos de atividade aeróbia (FREEMAN, 2013), assim como as corridas longas da raça PSI.

O potencial atlético em mamíferos é influenciado por complexa inter-relação entre conjunto de genes e fatores ambientais (HILL et al., 2010c). A contribuição genética para potencial atlético em humanos é bem documentada, nos quais mais de 220 genes já foram descritos (BRAY et al., 2009). Embora seja provável que o desempenho atlético em equinos também seja influenciado por grande número de genes, até o momento poucas variantes genéticas foram relacionadas à característica, exclusivamente em animais PSI, entre estas SNPs dos genes *myostatin* – *MSTN* (HILL et al., 2010a;b e BINNS et al., 2010, TOZAKI et al., 2010); *piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4* – *PDK4* (GU et al., 2009; HILL et al., 2010c); e *cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2* – *COX4I2* (GU et al., 2010). O gene *MSTN* é expresso no tecido muscular esquelético e atua como regulador negativo do crescimento da massa muscular. Várias mutações ou polimorfismos foram identificados no *MSTN* em bovinos (GROBET et al. 1997, 1998; KAMBADUR et al., 1997; MCPHERRON & LEE, 1997), ovinos (CLOP et al., 2006), camundongos (NISHI et al., 2002) e humanos (SHUELKE et al., 2004), resultando em fenótipos de hiperplasia e hipertrofia muscular. Fukuda et al. (2007) observaram que em humanos o gene *COX4I2* foi diferencialmente expresso em ambiente celular de hipoxia (falta de oxigênio). Tem sido proposto que a regulação ambiental deste gene pode aumentar a eficiência da respiração celular. O *PDK4* controla a oxidação de ácidos graxos, os quais são altamente eficazes na geração de ATP (energia) durante e após o exercício

(PILEGAARD & NEUFER, 2004). Recentemente, um SNP do gene *doublesex and mab-3 related transcription factor 3 – DMRT3* equino foi associado de forma altamente significativa ao tipo de andamento. Esta alteração provoca mudanças sensíveis na coordenação motora dos movimentos de trote e de corrida (ANDERSSON et al., 2012).

1.2 - Objetivos

Tendo em vista que os efeitos de polimorfismos de DNA sobre fenótipos são parâmetros intrínsecos de cada população, linhagem ou raça em determinado ambiente, e considerando a falta de informações em relação ao potencial de utilização da seleção assistida por marcadores em equinos, em especial na Quarto de Milha, raça de grande importância no mundo e também no Brasil, este trabalho terá como objetivos: (1) Estimar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs g.38973231A>G do gene *PDK4* e g.22684390C>T do gene *COX4I2* em equinos Quarto de Milha de diferentes linhagens (corrida e trabalho) bem como avaliar a ocorrência de associações destes polimorfismos com características de desempenho (IV – Índice de Velocidade) na linhagem de corrida; (2) verificar a ocorrência de diferença nas frequências alélicas dos polimorfismos g.66493737C>T do gene *MSTN* e g.22999655C>A do gene *DMRT3* em equinos Quarto de Milha da linhagem de corrida contrastantes para IV e; (3) estimar parâmetros genéticos e ambientais para medidas corporais e IV da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha.

1.3 - Revisão Bibliográfica

1.3.1 - Equinos no mundo e no Brasil

Nenhum outro animal doméstico desempenhou papel tão direto no desenvolvimento social e político da humanidade como o cavalo. Embora no início de sua domesticação tenham sido utilizados como fonte de matéria prima e alimentos, ao

longo da história foram amplamente empregados como meio de transporte, comunicações e no progresso agrícola. No século XX, com o desenvolvimento tecnológico das mais diversas áreas, incluindo transportes e agropecuária, chegou ao fim grande parte do seu uso prático, ficando restrito a regiões com baixo índice de desenvolvimento econômico. Contudo, os seres humanos mantiveram sua estreita relação com estes animais, criando-os para a prática de esportes, recreação, ou simplesmente por sua beleza física (BOWLING & RUVINSKY, 2002).

Embora apresente ampla diversidade morfológica, incluindo diferenças de tamanho, conformação e coloração, os cavalos estão inseridos em uma única espécie, a *Equus caballus*. Estes apresentam o mesmo cariótipo, acasalam entre si e deixam descendentes férteis. De todas as espécies domésticas, é o que apresenta a história de domesticação mais complexa. O ancestral direto do cavalo moderno ainda não foi precisamente definido. Ao menos duas subespécies são descritas, a *Equus ferus ferus* ou Tarpan e a *Equus ferus przewalskii* (BOWLING & RUVINSKY, 2002). Evidências arqueológicas das últimas décadas indicam que a domesticação ocorreu há seis mil anos na região das estepes do sudoeste asiático, onde estão situados atualmente os países Ucrânia e Cazaquistão. Esta ainda é a teoria mais aceita, embora não tenha sido descartada a possibilidade de que a domesticação não tenha ocorrido em pequena área com população restrita, mas sim em ampla área com a domesticação independente de diversas populações de cavalos selvagens (WARMUTH et al., 2012).

Atualmente há cerca de 60 milhões de cavalos no mundo, a maioria deles vivendo nas Américas, Ásia e alguns países da Europa. O Estados Unidos é o país com maior contingente (aproximadamente 10,5 milhões), seguindo-se da China (6,7 milhões), seguidos do México (pouco mais de 6 milhões), e Brasil (pouco menos de 6 milhões). Estes quatro países, conjuntamente, possuem cerca de 50% da população global de cavalos (GLIPHA, 2011). O impacto do agronegócio do cavalo no Brasil é bastante expressivo, tendo movimentado em 2006 valor econômico superior a R\$ 7,5 bilhões ao ano e abrangendo cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA et al., 2006). Nesse sentido, considerando-se a estimativa de que o País possui 5.900.700 cabeças (FAO, 2006), constata-se que aproximadamente para cada dois cavalos há geração de um emprego.

A utilização de equinos na lida com rebanhos bovinos (aproximadamente 5 milhões) vem sendo o seguimento de maior destaque dentro do agronegócio do cavalo no Brasil, representando 52% da movimentação monetária e 78% dos empregos diretos gerados (LIMA et al., 2006). Esta intensa relação tem feito os cavalos acompanharem os bovinos em seu deslocamento para as regiões Centro-Oeste e Norte do País. Embora a utilização do cavalo na lida com bovinos seja marcante no contexto da equinocultura nacional, o seguimento que envolve os esportes equestres, acompanhando tendência mundial, tem crescido acentuadamente nos últimos anos. Neste sentido, no período de 1999 a 2004 o número de eventos envolvendo as diversas modalidades equestres (salto, adestramento, enduro, concurso completo de equitação, etc.) cresceu 315%, ou seja, aumento médio de 15,3% ao ano. Além da utilização do cavalo na lida da fazenda e nas provas equestres, a tendência de sua utilização para lazer vem aumentando significativamente. O cavalo também é utilizado na equoterapia, modalidade disponível há milhares de anos e, agora, reconhecida como de grande eficácia para o tratamento de inúmeros males físicos, psíquicos e comportamentais. Apesar de certa polêmica envolvendo o tema, principalmente pelo papel histórico que o cavalo desenvolveu junto ao homem, o consumo da carne e de derivados de cavalos é comum em varias partes do mundo, sendo em alguns países da Ásia Central a principal fonte de proteína animal. Em muitos outros países da Europa, América do Sul e Ásia constitui parte significativa das tradições culinárias (ANTHONY, 2008).

1.3.2 - A raça Quarto de Milha

O cavalo da raça Quarto de Milha teve sua formação na América do Norte, a partir do século XVII, com a introdução de equinos de origem árabe e turca, trazidos por colonizadores europeus. Contudo, seu maior desenvolvimento ocorreu com a ocupação do oeste Norte Americano, devido à necessidade de cavalos robustos e versáteis, com aptidão à sela e tração, visto a dificuldade de se manter plantel variado de animais para atender as diversas necessidades. A população desses equinos cresceu e em 1940 fundou-se a *American Quarter Horse Association* (AQHA),

primeira envolvendo a raça. Atualmente conta com aproximadamente cinco milhões de cavalos registrados em todo o mundo (ABQM, 2012).

No Brasil existem aproximadamente 358.000 animais registrados junto a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha (ABQM), desde sua fundação em 1969, tendo impacto relevante no agronegócio nacional do cavalo, visto que estão avaliados em aproximadamente US\$ 785,5 milhões, ocupando área de 491,6 mil hectares de propriedades rurais, estimadas em US\$ 685,7 milhões (ABQM, 2012). Dentro da raça Quarto de Milha há subdivisão em diferentes segmentos de aptidão, provenientes de distintos objetivos de seleção, consideradas linhagens, entre as quais: a de trabalho, a de conformação e a de corrida. A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência, características consideradas de grande importância no manejo do gado a campo. Dentro desta linhagem sempre houve grande interesse na produção de cavalos com *cow sense* superior (ELLERSIECK et al., 1985). *Cow sense*, ou habilidade de trabalhar com o gado bovino, pode ser medida pela capacidade do cavalo em cercar o gado e apartar do rebanho um animal escolhido (HINTZ, 1980), com pouca assistência do cavaleiro (ELLERSIECK et al., 1985). Acredita-se que o cavalo deve ter a habilidade de perceber e antecipar os movimentos do bovino para ser um bom apartador (WAGONER, 1978). A linhagem de conformação enfatiza a morfologia do padrão racial. A linhagem de corrida explora a aptidão dos animais quanto à velocidade em pistas retas e de curta distância. Destacadamente equinos desta raça tem melhor desempenho em corridas de curtas distâncias do que qualquer outra raça (ABQM, 2013), sendo os mais velozes cavalos do mundo e um dos mais velozes dentre todos os animais, podendo alcançar velocidades de até 88 km/h e percorrer, a partir de uma posição estática, $\frac{1}{4}$ de milha (402 metros, aproximadamente) em menos de 21 segundos (AMERICA'S HORSE DAILY, 2008). Apesar do efetivo de animais serem relativamente menor nesta que nas demais linhagens, sua importância econômica é substancial, não somente por gerar renda por meio de premiações e apostas (US\$ 2,5 milhões 3 – LIMA et al., 2006), mas também pelo elevado custo gerado na manutenção destes animais dentro desta modalidade esportiva (entre R\$ 800,00 e R\$ 1.400,00, em média mensal, excluindo-se medicamentos e procedimentos veterinários).

1.3.3 - Melhoramento genético de equinos

Embora algumas pesquisas publicadas em cavalos envolvam a área de melhoramento genético, ainda não existem, efetivamente, programas consistentes de seleção nas diferentes raças criadas no País. Em relação a outras espécies de exploração zootécnica, as pesquisas na área de melhoramento genético são proporcionalmente menores em equinos, no mundo todo. No Brasil, em particular, dada à grandeza de sua tropa, esta distância é ainda mais evidente. Pequenos grupos de pesquisadores ligados às universidades e institutos de pesquisa têm publicado na área, especialmente em relação a aspectos quantitativos de caracteres de interesse econômico ou conservacional, em raças nacionais. Existem algumas vantagens relativas à pesquisa na área de melhoramento genético de cavalos, utilizando-se princípios de genética quantitativa. A profundidade da genealogia na maioria das raças é alta, características de desempenho geralmente podem ser medidas em ambos os sexos, repetidamente, e em períodos de tempo relativamente curtos. Por outro lado, dificuldades inerentes à espécie equina (baixos índices reprodutivos, altos intervalos de geração e parto, baixo número de progênes por parição e longo período de gestação), e em função de aspectos operacionais (informações escassas e imprecisas de caracteres reprodutivos, comportamentais e de desempenho em grande parte das raças, baixa receptividade das associações de criadores às tecnologias reprodutivas, relação superficial entre órgãos técnicos e criadores) têm sido alguns dos contratempos ao se pesquisar melhoramento genético de cavalos no Brasil.

Com relação ao Quarto de Milha, não há estudos de melhoramento genético no país envolvendo a linhagem de trabalho, basicamente devido à escassez/inconsistência de informação de desempenho armazenada atualmente no *Stud Book* da ABQM. No entanto, desde 2009, esta associação vem de modo regular, registrando dados de desempenho de todos os animais participantes de provas por ela homologadas, o que permitirá no curto prazo, a realização de pesquisas. Pelos mesmos motivos, que a linhagem de trabalho, não há pesquisas na área de

melhoramento envolvendo a linhagem de conformação. Uma vez que apenas na linhagem de corrida encontram-se disponíveis dados de desempenho em quantidade e consistência suficientes, somente nela foram realizadas pesquisas envolvendo melhoramento genético (VILLELA et al., 2002; MOTA & ABRAHÃO, 2004; CORRÊA & MOTA, 2007). Um atributo seletivo para o Quarto de Milha de corrida é a pontuação conhecida como Índice de Velocidade (IV), que é obtido durante sua campanha, com o intuito de classificar o desempenho do animal. Seu cálculo está relacionado com o tempo obtido na corrida ajustando-se para diferentes distâncias percorridas. Os animais com IV superior acabam sendo valorizados economicamente e são utilizados mais intensamente na reprodução e, portanto, interferindo na formação do plantel. O IV foi criado nas corridas da raça Quarto de Milha com o intuito de permitir comparação de desempenhos entre os animais em diferentes condições (distâncias, hipódromo, clima, país) (EVANS, 1989). Cada hipódromo tem sua própria tabela de IV, que é elaborada a partir da média das três vitórias mais rápidas (três melhores tempos) para cada um dos três últimos anos consecutivos, em cada distância, sendo que o valor da média desses nove tempos equivalerá ao IV igual a 100 (CORRÊA & MOTA, 2007). Os pontos de IV são inteiros e variam de acordo com o tempo, ao nível de centésimos de segundo, seguindo ajustes em acordo com a distância percorrida. A tabela de IV (Tabela 1) faz a conversão do tempo em pontos do IV com ajustes pelas distâncias. Como exemplo, nas distâncias de 365 metros (m), 402m e 503m, a cada 4 centésimos de segundo, a mais ou a menos, que um animal obtém, em relação ao tempo que representa o índice de velocidade igual a 100, diminui-se ou cresce-se um ponto neste índice. Assim, ao se considerar que a média das nove vitórias (IV =100) foi de 22 segundos para os 402m, o animal cujo tempo se situe entre 22,01 e 22,04 terá IV igual a 99, se o tempo estiver entre 22,05 e 22,08 o IV será 98, e assim por diante. Por outro lado, se o tempo estiver entre 21,96 e 21,99 será acrescido em um ponto, obtendo o IV 101, e os que tiverem tempo entre 21,92 e 21,95 seus IVs serão de 102 pontos, e assim sucessivamente. Para distâncias menores, o cálculo do IV é realizado considerando-se menor variação do tempo, Em 320m se alternará a cada 3 e 4 centésimos de segundo, iniciando com 3 centésimos de segundo, enquanto que em 301m e 275m será de 3 centésimos de segundo e em 228m será a cada 2 centésimos de segundo. Esta tabela é válida para animais que correm

carregando peso mínimo de 53 Kg. Para aqueles com peso inferior, deve-se acrescentar 5 centésimos de segundo ao seu tempo, para cada quilo a menos.

Tabela 1. Variação para pontuação do índice de velocidade (IV), de acordo com a distância (metros), tendo como ponto de partida os tempos referentes ao IV igual a 100.

	Tempo (Centésimos de segundo)			
	4	3 e 4*	3	2
Distância(m)	365	320	275	228
	402		301	
	503			

* alternados, iniciando-se com três centésimos.

Com o intuito de se estabelecer um registro para desempenhos, criou-se o Registro de Mérito em Corridas (Tabela 2), atribuído aos animais com IV igual ou superior a 80 pontos (JCS, 2002).

Tabela 2. Classificação do registro de mérito de acordo com o IV.

	Índice de Velocidade (pontos)		
	80 a 90	91 a 99	>100
Registro de mérito	AA (Double A)	AAA (Triple A)	AAAT (Top Triple A)

1.3.4 - Fisiologia e metabolismo do músculo estriado esquelético

Muitos dos processos fisiológicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm mostrado alguns aspectos semelhantes em humanos e equinos (DIAS et al., 2007; SCHÖRODER et al., 2011). Para equinos de competição, o sucesso em provas depende principalmente da capacidade metabólica do animal para converter energia química em mecânica. Componentes destes processos energéticos incluem a taxa, a eficiência e a interação do metabolismo aeróbio e anaeróbio nos músculos e do

fornecimento de glicose e oxigênio por meio do sistema cardiovascular. Cavalos desempenham diferentes tipos de exercício físico, variando de predominantemente aeróbico para predominantemente anaeróbico. Corridas curtas de cavalos das raças Quarto de Milha e Puro-Sangue Inglês são predominantemente anaeróbico, já algumas classes de exercícios de arena, como apartação e rédeas, modalidades desempenhadas pela linhagem de trabalho da raça Quarto de Milha, intercalam curtos turnos de exercício anaeróbico com maiores períodos de atividade aeróbica (FREEMAN, 2013).

O músculo esquelético nos mamíferos demonstra alto grau de plasticidade e se adapta rapidamente a diferentes exercícios. Esta adaptação é devida as respostas ao tipo de contração, intensidade dos exercícios, nível de oxigênio e, principalmente, aos exercícios ou treinamentos envolvendo resistência muscular (HILL et al., 2010a; SCHRÖDER et al., 2011). Os tipos de fibras musculares podem ser classificados com base na fonte primária de energia (oxidativa/aeróbia ou glicolítica/anaeróbia) e velocidade de contração da fibra. Em mamíferos são classificadas como; tipo I e oxidativa (contração lenta) e; tipo II e glicolítica (contração rápida), podendo a última ser dividida em diferentes subclasses como, tipos IIA, IIB, IIC e IIM (BREAZILE, 1996).

Levando em consideração o tipo de treinamento físico, as concentrações do oxigênio no tecido muscular podem variar e atuar sobre a regulação de seu metabolismo (oxidativo ou glicolítico). Em humanos foi constatado que treinamentos de resistência elevam o volume de oxigênio máximo (VO_2 max) e o metabolismo aeróbico. Estes efeitos são provocados, em parte, por meio de um aumento de até 40% na densidade de capilares, de até 30% no número de mitocôndrias musculares; juntamente com o aumento da proporção das fibras oxidativas (HOPPELER et al., 1985). Em treinamentos intensos de curta duração em humanos, MacDougall *et al.*, (1998) observaram o aumento da atividade de enzimas musculares tanto glicolítica quanto oxidativa, além do aumento da potencia máxima do uso de energia e elevado VO_{2max} . O aumento da produção de energia pode ter sido resultado do aumento da atividade máxima da enzima glicolítica e da capacidade da bomba de Na^+/K^+ , enquanto que o aumento da atividade da enzima mitocondrial pode ter sido resultado do aumento da taxa de fluxo de piruvato durante o treinamento.

Para manutenção do ritmo e da intensidade das contrações a resíntese de ATP é muito importante. A concentração local de ATP, ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato), bem como a relação de ATP/ADP, são reguladores chave que influenciam muitos processos fundamentais no metabolismo muscular (COHEN, 1968; COHEN, 1976). A adenosina trifosfato (ATP) e a creatina-fosfato representam as principais fontes de energia durante a atividade física moderada. Durante a fixação e desligamento das cabeças globulares da miosina, o ATP é hidrolisado para fornecer energia para a contração muscular. A adenosina difosfato (ADP) resultante da hidrólise do ATP é fosforilada a partir de creatina-fosfato com função de manter os níveis de ATP celular constantes (BREAZILE, 1996). A fadiga muscular resulta da incapacidade de utilizar o fosfato inorgânico (Pi) formado na hidrólise do ATP em ADP para a restauração do ATP. Desta forma o Pi se acumula no citoplasma na forma de KH_2PO_4 , que, por sua acidez, atua diretamente sobre as proteínas contráteis, diminuindo sua capacidade de desenvolver tensão dentro dos sarcômeros (BREAZILE, 1996). Células excitáveis contêm concentração de ATP suficiente somente para uma contração muscular de alguns segundos (INFANTES & DAVIES, 1965). Mesmo havendo pequenas quantidades de ATP nestas células, não há alterações significativas em níveis globais de ATP durante ativação de células excitáveis (MOMMAERTS & WALLNER, 1967; SERAYDARIAN, 1980). Isso ocorre devido ao abastecimento contínuo e eficiente de ATP a partir de grandes estoques de creatina-fosfato (PCr^{2+}) catalisada pela creatina-cinase (CK), sendo que na maioria dos tecidos musculares a capacidade de regeneração de ATP por CK é muito elevada e excede consideravelmente a utilização tanto de ATP, bem como a reposição de ATP por fosforilação oxidativa ou glicólise (MCGILVERY, 1975).

1.3.5 - Marcadores moleculares: aspectos gerais

Marcador molecular é toda e qualquer variação oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar que esses marcadores segregam 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 & GRATTAPAGLIA, 1998). Neste sentido, marcadores de DNA são um tipo de marcador molecular e, na maior parte das vezes, marcadores genéticos. Do ponto de vista molecular ocorrem três tipos principais de variações na molécula de DNA, as regiões repetitivas (minissatélites e microssatélites), as inserções e deleções (InDels) e as alterações de uma única base (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs).

Marcadores moleculares permitem que os genótipos dos indivíduos sejam determinados em muitos loci para várias espécies diferentes (O' BRIEN & GRAVES, 1991), possibilitando que parâmetros genético-populacionais como frequências alélicas e genotípicas sejam estimados. Estas informações permitem a comparação de frequências entre populações e revelam diferenças em suas composições genética que podem contribuir para variações fenotípicas (MOODY et al., 1996). Isto é possível tendo em vista que ao longo da domesticação e formação das raças, os animais domésticos experimentaram a seleção natural e a artificial. Estas pressões de seleção levaram ao aumento da frequência de algumas mutações em regiões específicas do genoma, as quais tornaram os indivíduos mais adaptados ou deram a eles características favoráveis com base na demanda humana. Ao mesmo tempo, outros polimorfismos apresentaram diminuição de frequência ou eliminação completa.

Entretanto, para a identificação das regiões do DNA responsáveis por características de interesse, geralmente, recorre-se a algumas estratégias diferentes, como a localização de *Quantitative Trait Loci* (QTL) 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, no elevado custo para a manutenção dos animais, principalmente em espécies, cujo intervalo entre gerações é grande (caso dos bovinos e equinos), e na quantidade de trabalho e tempo necessários para a coleta dos dados moleculares. Além disso, após a identificação do QTL ainda há longo caminho a percorrer até a descoberta dos genes e polimorfismos diretamente implicados com o fenótipo.

Metodologia alternativa para minimizar essas dificuldades é a busca de genes candidatos principais, onde o objetivo é estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de interesse, 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 obrigatório a genotipagem de 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, ou seja, causal ou em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo causal. Entretanto, polimorfismos que segregam e se encontram associados a características interessantes em animais de certa linhagem ou raça, podem não segregar em animais de outras linhagens ou raças da mesma espécie. Além disso, resultados positivos de associação entre polimorfismos e características de interesse obtidos para populações de animais de uma linhagem ou raça não são imediatamente aplicáveis à populações de linhagens ou raças diferentes, uma vez que efeitos de substituição de alelos de um polimorfismo são parâmetros intrínsecos de cada população ou raça em determinado ambiente (REGITANO, 2004). Assim sendo, antes de transpor marcadores das populações onde foram identificados para a comercialização, é fundamental a corroboração dos seus efeitos sobre as características de interesse em diferentes raças e ambientes em processo conhecido como validação.

1.3.6 - Marcadores SNPs

A medida que as sequências de nucleotídeos dos genomas foram sendo desvendadas, característica observada foi o grande número de variações de ponto encontradas ao se comparar segmentos correspondentes do mesmo genoma. As mais comuns ocorrem, aproximadamente, a cada 600 bases e são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs.

As substituições mais frequentes observadas no DNA envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, são trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) e são denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou o contrário. Essas alterações podem ser provocadas por erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA ou em outros casos, são causadas por agentes ambientais. Caso essas alterações ocorram em células germinativas, sejam transmitidas às gerações seguintes e se fixem na população a uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismos (KWOK & GU, 1999).

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, bem como em espaços intergênicos, sem função determinada. Em regiões codificadoras, quando resultam em substituição de aminoácido na sequência protéica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora SNPs sinonímicos não alterem a sequência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro, e, conseqüentemente afetar a quantidade de proteína produzida. Esta 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 & COSTA, 2002). Recentemente, polimorfismos intrônicos ganharam importância pelo fato de não mais poderem ser descartados como possíveis responsáveis diretos por alterações fenotípicas. RNAs não codificantes transcritos a partir de regiões de íntrons (micro-RNAs) estão envolvidos em diferentes processos biológicos tais como os controles transcricional e pós-transcricional da expressão gênica (NAKAYA et al., 2007).

Estudos em humanos e em espécies de interesse zootécnico, mostraram a ocorrência de milhões SNPs ao longo do genoma de um indivíduo (*Human Genome Project Information, The SNP Consortium LTD, Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, EquCab2.0 SNP Collection*). Além dos marcadores SNP serem

abundantes, suas bases moleculares permitem sua distribuição homogênea pelo genoma (CAETANO, 2009).

1.3.7 - Métodos de genotipagem de SNPs

Em razão da possibilidade de relação entre SNPs e doenças genéticas em humanos e características produtivas e reprodutivas em animais e vegetais, ao longo das últimas décadas muitas tecnologias foram desenvolvidas para sua genotipagem.

Entre as metodologias básicas para genotipagem individual de SNPs, em regiões específicas do genoma, estão a PCR-RFLP (MAEDA et al., 1989), as PCRs alelo-específico (SAIKI *et al.*, 1986), entre as quais a ARMS-PCR, e a PCR-SSCP (ORITA et al., 1989). Estes métodos não requerem estruturas laboratoriais sofisticadas e podem ser aplicados a experimentos que envolvam genotipagem em pequena escala, nos quais o número de polimorfismos genotipados seja da ordem de algumas dezenas e o de animais analisados não ultrapasse algumas centenas.

O próximo avanço tecnológico para genotipagem de SNPs surgiu com metodologia que utiliza o sequenciamento direto de produtos de PCR. Neste caso, após a amplificação do fragmento desejado, realiza-se a determinação do genótipo com base na análise da sequência produzida. Embora esta metodologia permita a genotipagem de mais de um SNP em um mesmo fragmento, e seja baseada em equipamentos geralmente encontrados em instituições de ensino/pesquisa (sequenciadores automáticos de DNA), ainda é necessária grande quantidade de trabalho para a geração de dados. Seguindo a mesma tendência, foram desenvolvidas metodologias de genotipagem de SNPs utilizando equipamentos de PCR em Tempo Real, concebidos inicialmente para quantificação de RNA mensageiros em experimentos de análise da expressão gênica (CAETANO, 2009). Alternativas para a genotipagem de dezenas de SNPs em paralelo ocorrem por meio das metodologias de extensão (ou sequenciamento) de uma única base, cromatografia líquida de alta pressão desnaturante (DHPLC) e espectrometria de massa (MALDI-TOF).

Avanços tecnológicos recentes culminaram com o desenvolvimento de metodologia para genotipagem de dezenas de milhares de SNPs em um único ensaio a baixos custos (de US\$ 0,10 a US\$ 0,001 por SNP genotipado), trazendo novas perspectivas para aplicações já consolidadas, além do desenvolvimento de novas aplicações, produtos e processos, com uso direto nas cadeias produtivas de animais de interesse zootécnico (CAETANO, 2009). Neste sentido, os chamados chips de genotipagem de SNPs, contendo em média mais de 50 mil SNPs, foram gerados e validados para humanos, bovinos, equinos, ovinos, suínos e caninos, sendo extensamente utilizados por grupos de pesquisa mundo afora para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico de doenças genéticas e de seleção de indivíduos superiores.

1.3.8 - Marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos

Apesar da maior dificuldade de aplicação de ferramentas moleculares em estudos visando a seleção e o melhoramento genético de equinos em função, entre outros, da disponibilidade de animais, as informações referentes ao genoma da espécie vêm experimentando expansão sem precedentes.

De acordo com Chowdhary (2013) entre os maiores destaques provenientes da análise do genoma de equinos estão o seu sequenciamento completo (EquCab2.0) e, a partir deste, a identificação de 750 mil SNPs com sequenciamento inicial da égua “*Twilight*” da raça Puro-Sangue Inglês, e outros 400 mil detectados em equinos de sete diferentes raças. Dados provenientes do sequenciamento de uma égua Quarto de Milha revelaram que dos 3,15 milhões de SNPs descobertos, 2,8 milhões são SNPs novos, incluindo 18 mil SNPs não sinônimos e 2,6 mil complexos (DOAN et al., 2012). Como resultado destes desenvolvimentos e da aplicação dos chips de SNPs, pode ser antecipado que, nos próximos anos, as bases genéticas de importantes características monogênicas serão analisadas com maior acurácia e rapidez e as características complexas/multigênicas de interesse terão seus componentes genéticos dissecados.

Ao longo dos últimos nove ou dez anos, muitas equipes de pesquisa ao redor do mundo analisaram grande quantidade de genes candidatos individuais buscando a identificação de marcadores potencialmente associados à características de interesse em cavalos tais como: cor da pelagem (BRUNBERG et al., 2006; ROSENGREN et al., 2007; REISSMANN et al., 2007); doenças (HANSEN et al., 2007; TRYON et al., 2007; YOUNG et al., 2007); resistência a doenças (SOLBERG et al., 2004; BROWN et al., 2006; RIOS et al., 2007); reprodução e fertilidade (HAMANN et al., 2007; GIESECKE et al., 2009); comportamento e temperamento (MOMOZAWA et al., 2005, 2006); e desempenho (HANZAWA et al., 2002; REEBEN et al., 2006; MCGIVNEY et al., 2007; HILL et al., 2010a,c; GU et al., 2010).

Projetado para permitir a identificação de regiões genômicas modificadas pela seleção e a identificação de SNPs e genes que contribuem para características de interesse nas principais raças de equinos criadas atualmente no mundo, o *Equine SNP50 BeadChip* da empresa Illumina (Illumina Inc., USA) constitui-se em poderosa plataforma para a seleção e o melhoramento genético da espécie, habilitando pesquisadores da área a conduzir vasta gama de experimentos em que a aplicação da genotipagem de polimorfismos de DNA é necessária. Já em sua segunda geração, o novo SNP *chip* possui 74,5 mil SNPs, dos quais 21 mil são novos marcadores e 53,5 mil são marcadores que foram validados no *SNP50 BeadChip*.

Em um primeiro momento, esses chips serviram com sucesso, principalmente, à identificação de SNPs, regiões genômicas e genes relacionados à importantes doenças e síndromes que acometem determinadas raças tais como lordose (COOK et al., 2009; COOK et al., 2010), osteocondrose (LYKKJEN et al., 2010; TEYSSEDRE et al., 2012), neuropatia laringeal recorrente (DUPUIS et al., 2011), nanismo (EBERTH et al., 2009) e síndrome do potro lavanda (BROOKS et al., 2010). Mais recentemente, características complexas relacionadas à desempenho em provas esportivas e aptidões específicas têm sido alvo de pesquisas por meio de chips de SNPs para equinos (HILL et al., 2010b; BINNS et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2011; PETERSEN et al., 2013).

1.3.9 - Genes candidatos para desempenho em equinos da raça Quarto de Milha

O potencial atlético em mamíferos é influenciado por complexa inter-relação entre conjunto de genes e fatores ambientais (HILL et al., 2010c). A contribuição genética para potencial atlético em humanos é bem documentada, no qual mais de 220 genes já foram descritos (BRAY et al., 2009). Embora seja provável que o desempenho atlético em equinos também seja influenciado por grande número de genes, até o momento poucas variantes genéticas foram relacionadas à característica, exclusivamente em animais Puro Sangue Inglês, entre estas SNPs nos genes *myostatin* – *MSTN* (HILL et al., 2010a;b e BINNS et al., 2010, TOZAKI et al., 2010), *piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4* – *PDK4* (GU et al., 2009; HILL et al., 2010c), *creatine kinase, muscle* – *CKM* e *cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2* – *COX4I2* (GU et al., 2010). Recentemente, um SNP do gene *doublesex and mab-3 related transcription factor 3* – *DMRT3* equino foi associado de forma altamente significativa à marcha em equinos de diversas raças, esta mutação afeta consideravelmente a coordenação motora ligada à locomoção (ANDERSSON et al., 2013).

1.3.9.1 - *MSTN* – *myostatin*

O *MSTN* é membro da família de genes *transforming growth factor-beta* (TGF- β), é expresso no tecido muscular esquelético e atua como regulador negativo do crescimento da massa muscular. Várias mutações ou polimorfismos têm sido identificados no *MSTN* em bovinos (GROBET et al., 1997, 1998; KAMBADUR et al., 1997; MCPHERRON & LEE, 1997), ovinos (CLOP et al., 2006), camundongos (NISHI et al., 2002) e mais recentemente em humanos (SHUELKE et al., 2004), resultando em fenótipos de hiperplasia e hipetrofia muscular (dupla musculatura). Polimorfismo do *MSTN* em cães de corrida da raça Whippet mostrou-se associado a aumento da massa muscular e também à habilidade atlética (MOSHER et al., 2007). Binns et al., (2010) utilizaram 189 cavalos Puro Sangue Inglês vencedores de corrida na América do Norte e identificaram por meio chips de SNPs (*Illumina Equine SNP50 BeadChip*)

dois polimorfismos (BIEC2-417274 e BIEC2-417495) associados com distância ótima de corrida. Análises de bioinformática revelaram que estes SNPs com maiores significâncias estatísticas e localizados no cromossomo equino 18 (ECA18), são vizinhos ao loco do gene *MSTN*. Em pesquisa paralela e publicada no mesmo ano, Hill et al., (2010b), também utilizando o *Equine SNP50 BeadChip* em 118 cavalos elite Puro Sangue Inglês de corrida, divergentes em relação à distância ótima de corrida, identificaram o SNP BIEC2-417495 (localizado no cromossomo 18 a aproximadamente 690Kb do gene *MSTN*), como o mais significativamente relacionado à característica. Ao analisar o gene *MSTN* equino em amostra de 148 cavalos Puro Sangue Inglês registrados, Hill et al., (2010a) identificaram um novo polimorfismo (g.66493737C>T) fortemente associado à distância ótima de corrida, onde animais de genótipo CC mostraram-se adequados para corridas de distâncias curtas (rápidas), animais de genótipo CT para corridas de distâncias médias e animais de genótipo TT para corridas de distâncias longas (resistência). Segundo Hill et al., (2010a), testes comparativos de associação demonstraram consistentemente o SNP g.66493737C>T como variante superior na predição de aptidão para distâncias em cavalos de corrida da raça Puro Sangue Inglês. A genotipagem deste SNP em animais da raça Quarto de Milha (n = 35), raça com alto desempenho em corridas curtas, mostrou excesso de alelos C (C0,9; CC 0,83; CT 0,14; TT 0,03) (HILL et al., 2010a). Na comparação de 33 raças (n=744), foi encontrada na região do gene *MSTN* alta assinatura de seleção em equinos da raça Paint Horse e Quarto de Milha. Com sequenciamento e análise histológica mostrou-se que o SNP em questão (g.66493737C>T) e uma variação na região promotora foram significativamente associados ao volume da fibra muscular do tipo IIX (PETERSEN et al., 2013). Atualmente a genotipagem deste SNP é empregada de forma comercial para auxiliar a predição da distância ótima de corrida pra equinos da raça Puro-Sangue Inglês.

1.3.9.2 - *PK4* - piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4

A expressão do gene *PK4*, localizado no cromossomo equino 4 (ECA4), é coordenada pelo co-ativador transcricional PGC-1 α (WENDE et al., 2005), o qual tem

sidio identificado como uns dos fatores críticos no controle da adaptação ao exercício (ARANY, 2008). O PGC-1 α é um regulador chave do metabolismo energético que atua regulando a sensibilidade à insulina pelo controle do transporte de glicose, mediando a angiogênese induzida por exercício (CHINSOMBOON et al., 2009) e coordenando a biogênese mitocondrial (SCARPULLA, 2008). A regulação da utilização da glicose é rigidamente controlada pela captação de glicose pelos seus transportadores, pela taxa de fluxo glicolítico e pela conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria por meio da função catalisadora do complexo piruvato desidrogenase (PDC). O passo crítico limitante da velocidade de oxidação da glicose é a regulação da montagem do PDC, que é controlado pela piruvato desidrogenase quinase (PDK). A PDK bloqueia a formação do PDC, resultando na beta-oxidação de ácidos graxos para acetil-CoA como substrato para a fosforilação oxidativa. A oxidação de ácidos graxos é altamente eficaz na geração de ATP e é controlada pela expressão de *PDK4* no músculo esquelético durante e após o exercício (PILEGAARD & NEUFER, 2004). Eivers et al., (2009) identificaram aumento significativo da expressão do mRNA do gene *PDK4* (+7,4-fold) em músculos esqueléticos de equinos durante a recuperação do exercício físico. Considerando-se que variação na expressão gênica é fortemente influenciada por variações genéticas estruturais, Hill et al., (2010c) investigaram a possibilidade de associações entre SNPs identificados no *PDK4* e desempenho em corrida de cavalos da raça Puro Sangue Inglês. Encontraram o SNP g.38973231A>G fortemente associado com a característica, onde indivíduos de genótipo AA e AG apresentaram maior *handicap rating* em relação aos de genótipo GG.

1.3.9.3 - COX4I2 - cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2

Citocromo c oxidase (COX) é uma enzima multi-subunidade (Complexo IV) que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio na respiração mitocondrial. COX é um dímero no qual cada monômero é composto de 13 subunidades, das quais três são codificados pelo genoma mitocondrial (COX1, 2 e 3). O COX4, codificado pelo DNA nuclear, é responsável pela regulação e montagem das

subunidades mitocondriais codificadas no interior da membrana mitocondrial e tem sido associado com o volume da organela. O COX4 compreende duas isoformas (COX4-1 e COX4-2) codificadas pelos genes *COX4I1* e *COX4I2*, os quais são diferencialmente regulados em ambientes de normóxia (oxigênio normal) e hipóxia (falta de oxigênio) (FUKUDA et al., 2007). Em ambientes com oxigênio normal, o gene *COX4I1* é preferencialmente transcrito. Em ambientes de oxigênio limitado o regulador principal de resposta à hipoxia, HIF-1 (fator induzível de hipoxia 1), ativa a transcrição dos genes *COX4I2* e *LON* mitocondrial, o que inibe a expressão do *COX4I1*. Neste sentido, tem sido proposto que a regulação ambiental de COX4-2 pode aumentar a eficiência da respiração celular (FUKUDA et al., 2007). Gu et al., (2010) identificaram uma fraca, mas significativa, associação entre o SNP intrônico g.22684390C>T do gene *COX4I2* de equinos, localizado no cromossomo 22 (ECA22), e a retrospectiva de desempenho em corridas utilizando 278 animais da raça Puro Sangue Inglês. Animais homozigotos para o alelo menos frequente (T) foram fenotipicamente superiores aos de genótipo CC e CT. Ainda de acordo com estes autores, o SNP g.22684390C>T pode ser o causador direto de variação na característica uma vez que rompe um possível sítio de ligação de um elemento de resposta a glicocorticóides (GRE).

1.3.9.4 - *CKM - creatine kinase, muscle*

O creatine kinase, muscle gene (*CKM*), mapeado no cromossomo equino 10 (ECA10), codifica um tipo muscular de isoenzima da creatina quinase encontrada exclusivamente no músculo estriado e envolvida em processos celulares energéticos. Durante exercício, camundongos *CKM* nocaute mostraram falta de explosão muscular, mas mantiveram as condições normais de força absoluta (VAN DEURSEN et al., 1993). Polimorfismos no gene *CKM* humano têm sido associados com aumento na resistência cardio-respiratória assim como ao consumo máximo de oxigênio após vinte semanas de treinamento (ECHEGARAY & RIVERA, 2001). O transcriptoma do músculo esquelético de cavalos Puro Sangue Inglês mostrou que o mRNA do *CKM* é o mais abundantemente expresso, representando 6,9% de todo o transcrito

(MCGIVNEY et al., 2010). Por outro lado, estudos indicaram que o mRNA do *CKM* compõe aproximadamente 1% do transcriptoma músculo esquelético humano (WELLE et al., 1999). A expressão muito elevada do mRNA do *CKM* no músculo esquelético equino em comparação ao humano é indicativo da importância do produto do gene no fenótipo atlético altamente adaptado do Puro Sangue Inglês. Em apoio a estes dados, transcritos do gene *CKM* equino aumentaram significativamente após 4 horas de exercício em esteira e após período de 10 meses de treino (EIVERS et al., 2010). O fator de regulação interferon (IRF-1) é um fator de transcrição mediado por oxigênio envolvido na biogênese e metabolismo mitocondrial. Em humanos foi demonstrado ser significativamente ativado após um período de persistência no exercício físico (MAHONEY et al., 2005). O SNP g.15884567A>G do gene *CKM* equino, localizado no íntron 4, rompe um suposto sítio de ligação do IRF-1 (GU et al., 2010). Ao investigar o efeito do polimorfismo g.15884567A>G do gene *CKM* sobre a retrospectiva de desempenho em corridas em 148 animais da raça Puro Sangue Inglês, Gu et al., (2010) encontraram o alelo A como favorável para a característica, sendo que indivíduos de genótipos AA e AG apresentaram-se superiores em relação aos GG. Os autores ressaltaram, entretanto, que tais resultados preliminares de associação entre o polimorfismo do *CKM* e performance em corrida deve ser validado e outras populações de equinos antes que a aplicação da informação possa ser utilizada.

1.3.9.5 - *DMRT3 - doublesex and mab-3 related transcription factor 3*

A família de genes *DMRT* (*DMRT1-8*) codifica vasta gama de fatores de transcrição cuja função vem sendo bem estudada em vertebrados e invertebrados. Seus padrões de expressão não estão restritos somente ao desenvolvimento das gônadas, mas também a outros processos de desenvolvimento, envolvendo principalmente o sistema nervoso central (HONG et al., 2007). O *DMRT3* codifica um importante fator de transcrição na configuração de circuitos da medula espinhal, controlando o movimento em vertebrados. Está envolvido na especificação neuronal, incluindo a subdivisão de neurônios da medula espinhal, e no desenvolvimento de

uma rede neuronal de coordenação do sistema locomotor que controla os movimentos dos membros. Por meio do silenciamento deste gene (*DMRT3*^{-/-}) em camundongos observou-se menor gasto de tempo de nado e espasmos frequentes nos movimentos dos membros, quando colocados em água, padrão este que não foi observado nos camundongos controle. Em esteira, camundongos *DMRT3*^{-/-} tiveram maior dificuldade de movimentos em alta velocidade e apresentaram passadas significativamente mais longas, creditada ao maior tempo no movimento de extensão. Heterozigotos não diferiram dos controles (ANDERSSON et al., 2012). Dentre os equinos ocorrem naturalmente três padrões de locomoção, em ordem crescente de velocidade, o passo, trote e galope. Alguns cavalos podem alternar o padrão intermediário de velocidade pela marcha, sendo conseqüentemente incapaz de desenvolver grande velocidade. Em estudo de associação ampla do genoma (GWAS), um marcador foi significativamente associado com o padrão de movimento em equinos da raça Icelandic. Após sequenciamento da região foi identificado um SNP (g.22999655C>A) no gene *DMRT3* significativamente associado ao tipo de andamento (ANDERSSON et al., 2013). Em estudo de validação com diversas raças, a frequência do alelo A foi próxima a um em raças marchadoras, com altas frequências de homozigotos AA; e zero em raças não marchadoras. O SNP g.22999655C>A cria *stop códon* prematuro que resulta proteína de 300 aminoácidos contra 438 do tipo selvagem. Assim, o alelo mutante (A) do gene *DMRT3* pode se mostrar prejudicial para raças de velocidade, diminuindo o desempenho de cavalos em corridas (ANDERSSON et al., 2012).

2 - Referências:

- ABQM. **Associação brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha.** Disponível em: <http://www.abqm.com.br/>, 2012 acesso em: 12/5/2013
- AMERICA'S HORSE DAILY. **All About the Racing American Quarter Horse.** 26 de fevereiro de 2008. Disponível em: < http://americashorsedaily.com/all-about-the-racing-american-quarter-horse/#.Urx8N_RDvik > acesso em: 12/11/2013.
- ANDERSSON, L.S.; LARHAMMAR, M.; MEMIC, F.; WOOTZ, H.; SCHWOCHOW, D.; RUBIN, G-J.; PATRA, K.; ARNASON, T.; WELLBRING L.; HJÄLM G.;

- IMSLAND, F.; PETERSEN, J.L.; MCCUE, M.E.; MICKELSON, J.R.; COTHRAN G.; AHITUV, N.; ROEPSTORFF, L.; MIKKO, S.; VALLSTEDT, A.; LINDGREN, G.; ANDERSSON, L.; KULLANDER, K. **Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice.** *Nature*, v.488, ed.7413, p.642-646, 2012.
- ANTHONY D.W. **The Horse, the Wheel and Language.** Princeton University Press. p.199-220, 2008.
- ARANY Z. **PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease.** *Current Opinion in Genetics and Development*, v.18, ed.5, p426–434, 2008.
- BINNS, M.M.; BOEHLER, D.A.; LAMBERT D.H. **Identification of the myostatin locus (*MSTN*) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA.** *Animal Genetics*, v.41 (Suppl. 2), p.154–158, 2010.
- BOWLING, A.T. & RUVINSKY, A. **Genetics of Horse.** CAB International. Oxon, UK. 2000.
- BRAY, M.S.; HAGBERG, J.M.; PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; ROTH, S.M.; WOLFARTH, B; BOUCHARD, C. **The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: The 2006-2007 update.** *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.41, Ed.1, p.35-73, Janeiro de 2009.
- BREAZILE, J. E. Fisiologia do Músculo Esquelético. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes/ **Fisiologia dos animais domésticos.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. p. 777-793.
- BROOKS, S. A.; GABRESKI, N.; MILLER, D.; BRISBIN, A.; BROWN, H.E. et al **Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in Myosin a responsible for Lavender Foal Syndrome.** *PLoS Genetics*, v.6, ed.4, e1000909. doi:10.1371/journal.pgen.1000909, 2010.
- BROWN, J.J.; OLLIER, W.E.; THOMSON, W. et al **TNF-alpha SNP haplotype frequencies in equidae.** *Tissue Antigens*, v.67, ed.5, p.377-382, maio de 2006.
- BRUNBERG, E.; ANDERSSON, L.; COTHRAN, G.; SANDBERG, K.; MIKKO, S.; LINDGREN, G. **A missense mutation in *PMEL17* is associated with the Silver coat color in the horse.** *BMC Genetics*, v7, ed.46, 2006.
- CAETANO, A.R. **Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p.64-71, 2009 (supl. especial).

- CHINSOMBOON, J.; RUAS, J.; GUPTA, R. K.; THOM, R.; SHOAG, J.; ROWE, G. C.; SAWADA, N.; RAGHURAM, S.; ARANY, Z. **The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle.** PNAS, v.106, ed.50, p. 21401-21406, 2009.
- CHOWDHARY, B.P. **Equine Genomics.** John Wiley & Sons, Inc. 2013. 1 ed. 323p.
- CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H. *et al.*, **A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.** Nature Genetics, v.38, p.813–818, 2006.
- COHEN, G.N. **regulation of cell metabolism.** Hermann. Paris. 1968. 240 p.
- COHEN, P. (1976) **Control of Enzyme Activity, Chapman and Hall, London;** J. Wiley and Sons, New York
Infante, A. A. & Davies, R. E. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3996-4001
- COOK, D.; GALLAGHER, P.; BAILEY, E. **Genetics of swayback in American Saddlebred horses.** Animal Genetics, v.41, p.64–71, Suppl. 2, 2010.
- COOK, D.; GALLAGHER, P.; BAILEY, E. **Illumina Equine SNP50 Bead Chip Investigation of Adolescent idiopathic lordosis among American Saddlebred Horses,** Journal of Equine Veterinary Science, v.29, ed.5, p.315-316, maio de 2009.
- CORRÊA, M. J. M.; MOTA, M. D. S. **Genetic evaluation of performance traits in Brazilian Quarter Horse.** Journal of Applied Genetics, v. 48, p. 145-151, 2007.
- DIAS, R.G.; PEREIRA, A.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, J.E. **Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 13: 211-216. 2007
- DOAN, R.; COHEN, N.D.; SAWYER, J.; GHAFARI, N.; JOHNSON, C.D.; DINDOT, S.V. **Whole-Genome Sequencing and Genetic Variant Analysis of a Quarter Horse Mare.** BMC Genomics. 2012, 13:78
- DUPUIS, M.C.; ZHANG, Z., DRUET, T., DENOIX, J.M.; CHARLIER, C.; LEKEUX P.; GEORGES M. **Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse.** Mammalian Genome, v.22, ed.9-10, p.613-20, outubro de 2011.
- EBERTH, J.; SWERCZAK, T.; BAILEY, E. **Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip.** Journal of Equine Veterinary Science, v.29, ed.5, p.315, maio de 2009.

- ECHEGARAY, M. & RIVERA, M.A. **Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance: genetic and molecular evidence.** *Sports Medicine*, v.31, p.919-934, 2001.
- EIVERS, S.S., MCGIVNEY, B.A., FONSECA, R.G., MACHUGH, D.E., MENSON, K., PARK, S.D., RIVERO, J.L., TAYLOR, C.T., KATZ, L.M. AND HILL, E.W. (2010) **Alterations in oxidative gene expression in equine skeletal muscle following exercise and training.** *Physiol. Genomics* 40, 83-93.
- ELLERSIECK, M.R.; LOCK, W.E.; VOGT, D.W.; Aipperspach, R. **Genetic evaluation of cutting scores in horses.** *Equine Veterinary Science*, v.5, p.287-289, 1985.
- EVANS J.W. **Horses: a guide to selection, care and enjoyment.** Freeman and Company, New York. 1996.
- FAO. **Food Agriculture Organization**, 2006. Disponível em <<http://www.fao.org>>
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ed. Embrapa-Cenargen: Brasília, 1998, 220p.
- FREEMAN, D.W. **Physical conditioning of horses.** Oklahoma state University: Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2013.
- FUKUDA, R.; ZHANG, H.; KIM, J.W.; SHIMODA, L.; DANG, C.V.; SEMENZA, G.L. **HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells.** *Cell*, v.129, p.111-122, 2007.
- GHILPA, **The Global Livestock Production and Health Atlas (GLIPHA)** <http://kids.fao.org/glipha/>. Accessed 2011, November 20.
- GIESECKE, K.; HAMANN, H.; STOCK, K.F.; WÖHLKE, A.; SIEME, H.; DISTL, O. **Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility.** *Animal Genetics*, v.40, p.359–365, 2009.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILER, J. H.; SUZUKI, S. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à Genética.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 6º Ed., 856 p.
- GROBET, L.; ROYO MARTIN, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. (1997) **A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle.** *Nature Genetics*, v.17, p.71–74, 1997.
- GU, J.; MACHUGH, D.E.; MCGIVENY, B.A.; PARK, S.D.E.; KATZ L.M.; HILL, E.M. **Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and**

- COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses.** Equine Veterinary Journal, v.42, p.569-575, 2010.
- GU, J.; ORR, N.; PARK, S.D.; KATZ, L.M.; SULIMOVA, G.; MACHUGH, D.E.; et al **A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses.** PLoS One, v.4, p.1-17, 2009.
- GUIMARÃES, P.E.M.; COSTA, M.C.R. **SNPs: Sutis diferenças de um código.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 26, 2002.
- HALEY, C.S. **Livestock QTLs - bringing home the bacon?** Trends in Genetics, v.11, n. 12, p.488-492, 1995.
- HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME, H. et al **A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses.** Animal Genetics, v.38, p.259-264, 2007.
- HANSEN, M.; KNORR, C.; HALL, A.J.; BROAD, T.E.; BRENIG, B. **Sequence analysis of the equine SLC26A2 gene locus on chromosome 14q15-q21.** Cytogenetic Genome Research, v.118, p.55-62, 2007.
- HANZAWA, K.; LEAR, T.L.; PIUMI, F.; BAILEY, E. **Mapping of equine potassium chloride co-transporter (SLC12A4) and amino acid transporter (SLC7A10) and preliminary studies on associations between SNPs from SLC12A4, SLC7A10 and SLC7A9 and osmotic fragility of erythrocytes.** Animal Genetics, v.33 p.455-459, 2002.
- HILL, E. W.; MCGIVNEY, B. A.; GU J.; WHISTON, R.; MACHUGH D. E. **A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses.** BMC Genomics, v.11, n.552, p.1-10, 2010b.
- HILL, E.M.; GU, J.; EIVERS, S.S.; FONSECA, R.G.; MCGIVENY, B.A.; GOVINDARAJAN, P. et al **A Sequence Polymorphism in MSTN Predicts Sprinting Ability and Racing Stamina in Thoroughbred Horses.** PLoS One, v.5, p.1-6, 2010a.
- HILL, E.M.; GU, J.; MCGIVENY, B.A.; MACHUGH, D.E. **Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance.** Animal Genetics, v.41, p.56-63, 2010c.
- HINTZ, R.L. **Genetics performance in the horse.** Journal of Animal Science, v.51, p.582-594, 1980.

- HONG, C-S.; PARK, B-Y.; SAINT-JEANNET, J-P. **The function of Dmrt genes in vertebrate development: It is not just about sex**, *Developmental Biology*, v.310, n.1, p.1-9, outubro de 2007.
- HOPPELER, H. HOWALD, H. CONLEY, K. et al **Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle**. *Journal of Applied Physiology*, 59 (1985), pp. 320–327
- INFANTES A.A. & DAVIES R.E. The **Effect of 2,4-Dinitrofluorobenzene on the Activity of Striated Muscle**. *The Journal of Biological Chemistry*, v.240, p.3996-4001, 1965.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L.; BASS, J.J. **Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle**. *Genome Research*, v.7, p.910-916, 1997.
- KWOK, P.Y.; GU, Z. **Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them?**. *Molecular Medicine Today*, v.5, n.12, p.538–543, 1999.
- LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos no Brasil**. CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.
- LEVIN, J. **Estatística aplicada a ciências humanas**. Harper & Row do Brasil, 1985. ed.2, 390p.
- LYKKJEN, S.; DOLVIK, N.I.; MCCUE, M.E.; RENDAHL, A.K.; MICKELSON, J.R.; ROED, K. H. **Genomewide association analysis of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in Norwegian Standardbred trotters**. *Animal Genetics*, v.41 (Suppl. 2), p.111–120, 2010.
- MAEDA, M.; MURAYAMA, N.; ISHII, H. et al **A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele specific restriction endonucleases**. *Tissue Antigens*, v.34, n.5, p.290-298, 1989.
- MAHONEY, D.J., PARISE, G., MELOV, S., SAFDAR, A. AND TARNOPOLSKY, M.A. **Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise**. *The FASEB Journal*, v.19, p.1498-1500, 2005.
- MCGILVERY, R. W. **Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise**, Proc. II. Int. Symposium on Biochemistry of Exercise, Magglingen (1973) (Howald, H. & Poortmans, J. R., eds.), pp. 12-26, Birkhauser-Verlag, Basel. 1975
- MCGIVNEY, B.; GU, J.; EIVERS, S.; KATZ, L.; HILL, E. **Population and functional genomics investigations of performance associations in thoroughbred**

- horses**. 7th Dorothy Russell Havemeyer International Equine Genome Mapping Workshop, Tahoe City, CA, 15. 2007.
- MCPHERRON AC, LAWLER AM, LEE SJ. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member**. *Nature* 387: 83–90, 1997.
- MOMMAERTS, W. F. H. M., and A. WALLNER. **The breakdown of adenosine triphosphate in the contraction cycle of the frog sartorius muscle**. *The Journal of Physiology (London)*, p.193-343, 1967.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T. et al **Polymorphism identification, RH mapping, and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (SLC6A4) gene**. *Journal of Vet Med Sci*, v. 68, p.619-621, 2006.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T. et al **Sequence, detection of polymorphisms and radiation hybrid mapping of the equine catechol-O-methyltransferase gene**. *Animal Genetics*, v. 36 p.190, 2005.
- MOODY, D.E.; POMP, D.; NEWMAN S.; MACNEIL, M.D. **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.
- MOSHER, D.S.; QUIGNON, P.; BUSTAMANTE, C.D.; SUTTER, N.B.; MELLERSH, C.S.; PARKER, H.G.; OSTRANDER, E.A. **A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs**. *PLoS Genetics*, v.3, e.79, 2007.
- MOTA, M. D. S. ; ABRAHÃO, A. R. **Environmental factors affecting time in Quarter Horse races**. *Archivos de Zootecnia da Universidade de Cordoba, Córdoba/Espanha*, v. 53, n. 201, p. 95-98, 2004.
- NAKAYA, H.L.; AMARAL, P.P.; LOURO, R. et al **Comment reviews reports deposited research refereed research interactions information 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, n.43, 2007.
- NISHI, M.; YASUE, A.; NISHIMATU, S.; NOHNO, T.; YAMAOKA, T.; ITAKURA, M.; MORIYAMA, K.; OHUCHI, H.; NOJI, S. **A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.293, p.247–251, 2002.
- 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.

- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H. et al **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as singlestrand conformation polymorphisms**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 86, n. 8, p. 2766-70, 1989.
- PEREIRA, J.C.C. 1999. **Melhoramento Genético Aplicado a Produção Animal**. Editora FEP-MVZ. Belo Horizonte, MG. 493p.
- PETERSEN J.L.; MICKELSON, J.R.; RENDAHL, A.K.; VALBERG, S.J.; ANDERSSON, L.S. et al **Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds**. PLoS Genetics, v.9, n.1, p. 1-17, 2013.
- PILEGAARD H.; NEUFER P.D. **Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise**. Proceedings of the Nutrition Society, v. 63, p. 221–226, 2004.
- REEBEN, M.; KOHO N.M.; RAEKALLIO, M.; HYYPPA, S.; POSO, A.R. **MCT1 and CD147 gene polymorphisms in standardbred horses**. Equine Veterinary Journal, suplemento, v.36, p.322-325, 2006.
- REGITANO L.C.A. **Importância da genética molecular para o melhoramento de ruminantes**. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004, Pirassununga - SP. Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.
- REISSMANN, M.; BIERWOLF, J.; BROCKMANN, G.A. **Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies**. Animal Genetics, v.38, p.1-6, 2007.
- RIOS, J.J.; PERELYGIN, A.A.; LONG, M.T. et al **Characterization of the equine 2-5 oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) and ribonuclease L (RNASEL) innate immunity genes**. BMC Genomics, v. 8, p. 313, 2007.
- ROSENGREN, P.G.; GOLOVKO, A.; SUNDSTROM, E. et al **Positional identification of the grey coat color mutation in horse**. 7th Dorothy Russell Havemeyer International Equine Genome Mapping Workshop, Tahoe City, CA, 13, 2007.
- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T. et al **Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes**. Nature, v.324, n.6093, p.163-166, 1986.
- SCARPULLA R.C. (2008) **Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator**. Annals of the New York Academy of Sciences 1147, 321–34.

- SCHRÖDER, W.; KLOSTERMANN, A.; STOCK, K.F.; DISTL, O. **A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warmblood horses.** *Animal Genetics*, p.1-9, 2011
- SCHUELKE, M.; ANGER, K.R.; STOLZ, L.E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T. et al **Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.** *The New England Journal of Medicine*, v.350, p.2682–2688, 2004.
- SERAYDERIAN M.W. **The correlation of creatine phosphate with muscle function, in Heart Creatine Kinase**, *The Integration of Isoenzymes for Energy Distribution*, edited by Jacobus WE, Ingwall JS, Maryland, Williams and Wilkins Press, 1980, pp. 82–90
- SOLBERG, O.D.; JACKSON, K.A.; MILLON, L.V. et al **Genomic characterization of equine interleukin-4 receptor alpha-chain (IL4R).** *Vet Immunol Immunopathol*, v.97, p.187-194, 2004.
- TEYSSÈDRE, S.; DUPUIS, M.C.; GUÉRIN, G.; SCHIBLER, L.; DENOIX, J.M.; ELSEN, J.M. et al **Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotters.** *J Animal Science*, v.90, p.45-53, 2012.
- TOZAKI, T.; MIYAKE, T.; KAKOI, H.; GAWAHARA, H.; SUGITA, S.; HASEGAWA, T. et al **A genome-wide association study for racing performances in Thoroughbreds clarifies a candidate region near the MSTN gene.** *Animal Genetics*, v.41, p.28-35, 2010.
- TRYON, R.C.; WHITE, S.D.; BANNASCH, D.L. **Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse.** *Genomics*, v.90, p.93-102, 2007.
- VAN DEURSEN, J.; HEERSCHAP, A.; OERLEMANS, F.; RUITENBEEK, W.; JAP, P.; LAAK, H.; WIERINGA, B. **Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity.** *Cell*, v.74, p.621-631, 1993.
- VILLELA, L. C. V. ; MOTA, M. D. S. ; OLIVEIRA, H. N. **Genetic parameters of racing performance traits of Quarter horses in Brazil.** *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Berlin, v. 119, p. 229-234, 2002.
- WAGONER, D.M. **Equine genetics and selection procedures.** Equine Research Publications, Dallas, Texas, 1978.
- WARMUTH, V.; ERIKSSON, A.; BOWER, M.A. et al **Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:8202–8206.

- WELLE, S.; BHATT, K.; THORNTON, C.A. **Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men.** Genome Research, v.9, p.506-513, 1999.
- WENDE A.R.; HUSS J.M.; SCHAEFFER P.J.; GIGUERE V.; KELLY D.P. **PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism.** Molecular and Cellular Biology, v.25, ed.10, p.684-94, 2005.
- WOMACK, J.E. **The goals and status of the bovine gene map.** Journal of Dairy Science, v. 76, p.1199-1203, 1993.
- YOUNG, A.E.; BOWER, L.P.; AFFOLTER, V.K.; DE COCK, H.E.; FERRARO, G.L.; BANNASCH, D.L. **Evaluation of FOXC2 as a candidate gene for chronic progressive lymphedema in draft horses.** Veterinary Journal, v.174, p.397-399, 2007.

Capítulo 2 – Polimorfismos em genes candidatos para desempenho em equinos de corrida da raça Quarto de Milha

Resumo: Dentro da raça Quarto de Milha, diferentes objetivos de seleção formaram linhagens com distintas habilidades, entre elas a de corrida e a de trabalho. Com menor efetivo, porém com grande representatividade econômica, a linhagem de corrida se destaca por possuir animais com capacidade de alcançar grandes velocidades em curtas distâncias e em pequeno espaço de tempo. A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência. Embora seja provável que o desempenho atlético em equinos seja influenciado por grande número de genes, até o momento poucas variantes genéticas foram relacionadas à característica, exclusivamente em animais Puro-Sangue Inglês (PSI), entre estas os SNPs g.66493737C>T (*MSTN*), g.38973231A>G (*PDK4*), g.22684390C>T (*COX4I2*). Resultados do presente trabalho obtidos a partir de sequenciamento de DNA mostraram os genes *PDK4* e *COX4I2* polimórficos no Quarto de Milha, enquanto que o *MSTN* mostrou o alelo C próximo de fixado, com apenas um animal heterozigoto (CT). Na análise de 296 animais de corrida e 68 de trabalho, as diferenças de frequências alélicas e genotípicas se mostraram significativas para os genes *PDK4* e *COX4I2* entre as duas linhagens. O mesmo não foi observado quando estas frequências foram comparadas entre fenótipos extremos de corrida. Também não houve efeitos significativos no teste de associação entre os alelos dos dois polimorfismos e o Índice de Velocidade (IV). O SNP g.22999655C>A do gene *DMRT3* foi genotipado em 60 animais. Exceto por dois animais heterozigotos (CA) no grupo de IV inferiores (n=20) e um na linhagem de trabalho (n=20), todos foram homozigotos (CC). Estes resultados sugerem que os alelos dos genes *PDK4* e *COX4I2*, relacionados com melhor desempenho em corridas na raça PSI, estejam, talvez, relacionados à adaptações benéficas do metabolismo aeróbico e, dessa forma, tenham papéis secundários no desempenho em corridas curtas, predominantemente anaeróbicas, na raça Quarto de Milha. A aparição do alelo da marcha (A) do gene *DMRT3* apenas em animais de corrida de IV inferior e de trabalho indica a possibilidade de esta alteração afetar consideravelmente o desempenho em corridas.

Palavras-chave: *COX4I2*, *DMRT3*, Índice de velocidade, *MSTN*, *PDK4*

Polymorphisms in candidate genes for race performance in Quarter Horses

Abstract: *In Quarter Horses, different objectives of selection formed lineages with distinct skills, including the racing and cutting. Less effective, but with great economic representation, the racing line stands out for having animals capable of reaching high speeds over short distances and short time. The cutting line is used in competitions of functional character, exploring skills such as agility and obedience. Although it is likely that athletic performance in horses is influenced by many genes, few genetic variants were related to the trait exclusively in Thoroughbred, among these SNPs g.66493737C>T (MSTN), g.38973231A>G (PDK4) and g.22684390C>T (COX4I2). Present results obtained from DNA sequencing showed PDK4 and COX4I2 as polymorphic genes in Quarter Horses, while MSTN allele C showed near fixed with just one animal heterozygous (CT). In the analysis of 296 racing and 68 cutting animals, the differences in allele and genotype frequencies were statistically significant for PDK4 and COX4I2 genes between the two lines. The same was not observed when these frequencies were compared between racing extreme phenotypes. There were also no significant effects on test of association between the alleles of the two polymorphisms and Speed Index (SI). The SNP g.22999655C>A of the DMRT3 gene was genotyped in 60 animals. Except for two heterozygous animals (CA) in the group of low SI (n = 20) and one in the cutting line (n = 20), were all homozygous (CC). These results suggest that PDK4 and COX4I2 alleles, associated with better performance in Thoroughbred, are perhaps related to the beneficial adaptations of aerobic metabolism and thus have secondary roles in the performance of short runs, predominantly anaerobic, of the Quarter Horses. The presence of the gait allele (A) of DMRT3 only in racing animals of low SI and in the cutting line indicates the possibility of this alteration affect considerably performance in races.*

KEYWORD: *COX4I2, DMRT3, Speed Index, MSTN, PDK4*

1 - Introdução

Durante sua formação, equinos da raça Quarto de Milha foram selecionados com diferentes objetivos, resultando em grupos com diferentes aptidões ou habilidades, entre os quais as linhagens de corrida e de trabalho (ABQM, 2013). Cavalos da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha tem melhor desempenho em provas de curta distância do que qualquer outra linhagem ou raça, sendo o mais veloz entre os equinos e um dos mais velozes animais do mundo. Podem alcançar

velocidade de até 88 km/h e percorrer, a partir de uma posição estática, ¼ de milha (aproximadamente 402 metros) em menos de 21 segundos (America's Horse Daily, 2008). A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência, características consideradas de grande importância no manejo do gado a campo. Acredita-se que o cavalo de trabalho deva ter a habilidade de perceber e antecipar os movimentos do bovino para ser bom apartador (WAGONER, 1978).

Muitos dos processos fisiológicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm mostrado alguns aspectos semelhantes em humanos e equinos (DIAS et al., 2007; SCHÖRODER et al., 2011). Segundo Breazile (1996), em função do tipo de treinamento físico, as concentrações do oxigênio no tecido muscular podem variar e atuar sobre a regulação de seu metabolismo (aeróbico ou anaeróbico). Cavalos podem realizar variados tipos de exercícios físicos, indo do predominantemente aeróbico até o predominantemente anaeróbico. As corridas curtas da raça Puro-Sangue Inglês (PSI) e do Quarto de milha de corrida apresentam metabolismo muscular predominantemente anaeróbico. Já algumas classes de exercícios de arena, como apartação e rédeas, modalidades desempenhadas pela linhagem de trabalho da raça Quarto de Milha, intercalam curtos turnos de exercício anaeróbico com maiores períodos de atividade aeróbia (FREEMAN, 2013), assim como as corridas longas da raça PSI.

O potencial atlético em mamíferos é influenciado por complexa inter-relação entre conjunto de genes e fatores ambientais (HILL et al., 2010c). A contribuição genética para potencial atlético em humanos é bem documentada, nos quais mais de 220 genes já foram descritos (BRAY et al., 2009). Embora seja provável que o desempenho atlético em equinos também seja influenciado por grande número de genes, até o momento poucas variantes genéticas foram relacionadas à característica, exclusivamente em animais PSI, entre estas SNPs dos genes *myostatin* – *MSTN* (HILL et al., 2010a;b e BINNS et al., 2010, TOZAKI et al., 2010); *piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4* – *PDK4* (GU et al., 2009; HILL et al., 2010c); e *cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2* – *COX4I2* (GU et al., 2010). O gene *MSTN* é expresso no tecido muscular esquelético e atua como regulador negativo do crescimento da massa muscular. Várias mutações ou polimorfismos foram identificados no *MSTN* em bovinos (GROBET et al. 1997, 1998; KAMBADUR et

al., 1997; MCPHERRON & LEE, 1997), ovinos (CLOP et al., 2006), camundongos (NISHI et al., 2002) e humanos (SHUELKE et al., 2004), resultando em fenótipos de hiperplasia e hipertrofia muscular. Fukuda et al. (2007) observaram que em humanos o gene *COX4I2* foi diferencialmente expresso em ambiente celular de hipoxia (falta de oxigênio). Tem sido proposto que a regulação ambiental deste gene pode aumentar a eficiência da respiração celular. O *PDK4* controla a oxidação de ácidos graxos, os quais são altamente eficazes na geração de ATP (energia) durante e após o exercício (PILEGAARD & NEUFER, 2004). Recentemente, um SNP do gene *doublesex and mab-3 related transcription factor 3 – DMRT3* equino foi associado de forma altamente significativa ao tipo de andamento. Esta alteração provoca mudanças sensíveis na coordenação motora dos movimentos de trote e de corrida (ANDERSSON et al., 2012).

Tendo em vista o papel de cada um dos genes descritos na fisiologia do músculo esquelético e do sistema nervoso e considerando-se que os efeitos de polimorfismos de DNA sobre fenótipos são parâmetros intrínsecos de cada linhagem ou raça em determinado ambiente, os objetivos deste trabalho foram: (1) comparar as frequências dos SNPs g.66493737C>T do *MSTN*, g.38973231A>G do *PDK4*, g.22684390C>T do *COX4I2* e g.22999655C>A do *DMRT3* entre as linhagens de corrida e de trabalho da raça Quarto de Milha e entre animais com fenótipos extremos para corrida; e (2) realizar análise de associação destes polimorfismos com Índice de Velocidade (IV), característica quantitativa indicativa de desempenho em animais Quarto de Milha de corrida. Os resultados desta pesquisa poderão auxiliar, por meio do uso de marcadores moleculares, nos processos seleção de cavalos para melhor desempenho em corridas.

2 - Material e Métodos

2.1 - Animais e dados de desempenho

Para análise experimental foram utilizados 364 equinos da raça Quarto de Milha, de ambos os sexos, nascidos entre os anos de 1982 e 2011, registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha (ABQM), sendo 296 da linhagem de corrida e 68 da de trabalho. Os animais da linhagem de corrida, 67 machos e 229 fêmeas, filhos de 95 garanhões e 240 éguas, encontravam-se alojados, no Jockey Club de Sorocaba e em outras 14 propriedades no interior do estado de São Paulo, Brasil. Por sua vez, os animais da linhagem de trabalho, 26 machos e 42 fêmeas, filhos de 44 garanhões e 64 éguas, encontravam-se alojados em três propriedades no interior do estado de São Paulo. As coletas de sangue ocorreram em haras do estado de São Paulo e no Jockey Club de Sorocaba. A presença de irmãos completos foi evitada em ambas as linhagens.

Os dados de desempenho foram obtidos junto ao Departamento de Estatística do Jockey Club de Sorocaba e ao banco de dados online da Equibase (EQUIBASE COMPANY, 2013). Foi utilizado o registro de desempenho dado pelo Índice de Velocidade (IV) máximo obtido ao longo do histórico de competição de cada animal. De acordo com Evans (1989), o IV foi criado nas corridas da raça Quarto de Milha com o intuito de permitir comparação de desempenhos entre os animais em diferentes condições (distâncias, hipódromo, clima, país). Detalhes a respeito do cálculo do IV foram descritos anteriormente por Corrêa (2005). Para a maior parte dos animais utilizados havia informação de IV de vários anos, para os quais foi calculado o IV médio. Entretanto, para outros havia apenas informação de IV máximo. Como o IV médio apresentou alta correlação com o IV máximo ($r = 0.8762$) optou-se por utilizar o IV máximo a fim de que não se perdesse informações de desempenho.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados segundo as normas brasileiras de bem estar animal (protocolo n° 204/2012-CEUA expedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu, São Paulo, Brasil).

2.2 - Coleta de sangue, extração do DNA e genotipagem dos animais

Amostras de 5 mL de sangue total de cada animal foram colhidas por venipunção da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos a vácuo, contendo 7,5 mg de EDTA. O processo de extração do DNA foi realizado por meio do *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise dos SNPs alvos dos genes *MSTN*, *PDK4* e *COX4I2* foram sequenciados produtos de PCR com tamanhos de 463, 356 e 556 pares de bases (pb), respectivamente, envolvendo suas regiões flanqueadoras, de 30 animais, dos quais 20 eram da linhagem de corrida, sendo 10 de cada fenótipo extremo, e 10 da de trabalho. As sequências foram geradas por meio do *ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) e analisadas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998). Os *primers* utilizados no sequenciamento das regiões de localização dos SNPs alvos dos genes *PDK4* e *COX4I2* foram os mesmos utilizados no processo de genotipagem (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos *primers* utilizados para sequenciamento e/ou genotipagem das regiões alvo e SNPs, respectivamente, de cada gene candidato estudado

Gene/id	Primer 5'-3'	Finalidade
PDK4-F inner	GCAGCAGTAAAGACTATGGATTGACTG	Sequenciamento* e genotipagem
PDK4-R inner	CCATTAACAATGACAATCTGAAACAAAT	
PDK4-F outer	GATGCAACTTTAACCCTCAACTTTCTAA	
PDK4-R outer	CAGATTTTCAGAGAATAGAGCCAGGATA	
COX4I2-F	CCCCCAAATACTGAATGCAC	Sequenciamento e genotipagem
COX4I2-R	GCCAGGAGCTAGTGACAAGG	
DMRT3-F	GGGAACAGAATCACCTCCTG	Genotipagem
DMRT3-R	CGACTGGTTTCTTGCCAAAG	
MSTN-F	TATTCTTCTTGGGAGGGAGGACTACT	Sequenciamento
MSTN-R	GCAAGTAATTAGCACAAAAATTTGAATG	

* Somente os *primers outers* foram utilizados para sequenciamento; *F* = forward; *R* = reverse.

Com intuito de verificar as frequências alélicas e genotípicas e de realizar o estudo de associação dos polimorfismos dos genes *PDK4* e *COX4I2* com desempenho, foram genotipados 364 equinos da raça Quarto de Milha, sendo 296 da

linhagem de corrida e 68 da linhagem de trabalho. A identificação dos genótipos do SNP g.38973231A>G do gene *PDK4* equino foi realizada por meio da técnica de ARMS-PCR, de forma original, na qual ocorreu amplificação alelo-específica de fragmentos de 235 e 177 pb, para os alelos A e G respectivamente. A PCR foi realizada em um volume final de 15 μ L e a mistura para amplificação foi constituída de: 50ng de DNA genômico; 0,07 μ M de cada *primer outer*; 0,7 μ M de cada *primer inner*; 10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50mM de KCl; 1,7 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). As amplificações consistiram de cinco passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 94°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 94°C por 45 segundos; (3) anelamento dos *primers* a 63°C por 45 segundos; (4) extensão a 72°C por 45 segundos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituíram um ciclo, que foi repetido por 38 vezes. A determinação dos alelos C e T do SNP g.22684390C>T do gene *COX4I2* equino foi realizada, também de forma inédita por meio da técnica de PCR-RFLP, na qual fragmento de 556pb foi amplificado e digerido utilizando a enzima de restrição *Xcel* (Thermo Scientific, EUA). A PCR foi realizada em volume final de 15 μ L e a mistura para amplificação foi constituída de: 50ng de DNA genômico; 0,20 μ M de cada *primer*; 10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50mM de KCl; 1,3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). As amplificações consistiram de cinco passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 94°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 94°C por 45 segundos; (3) anelamento dos *primers* a 59°C por 45 segundos; (4) extensão a 72°C por 45 segundos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituíram um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10 μ L de produto de PCR e 5U de enzima de restrição. As misturas para digestão foram incubadas em termociclador a 37°C por 12 horas.

O SNP g.22999655C>A do gene *DMRT3* equino foi analisado em 60 animais, dos quais 20 eram de cada fenótipo extremo para corrida e 20 da linhagem de trabalho. Foi desenvolvido protocolo de genotipagem pela técnica de PCR-RFLP, na qual fragmento gênico com 470pb foi amplificado e digerido utilizando a endonuclease *Ddel* (New England BioLabs, EUA). Cada reação de PCR, com volume final de 25 μ L, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,25 μ M de cada *primer* (Tabela 1), 0,4

mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 1X PCR buffer (20mM de Tris-HCl, pH 8.4; 50mM de KCl) e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). Após desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, a amplificação foi realizada em 36 ciclos a 95°C por 1 minuto, 59°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. Alíquotas de 12 µL dos produtos de amplificação foram digeridas com 4U de enzima de restrição a 37°C por 12 horas.

Os fragmentos de DNA obtidos pelas técnicas de ARMS-PCR e PCR-RFLP foram separados em gel de agarose a 3%, em sistema de eletroforese horizontal. Padrão de peso molecular de 100pb foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos gerados e a determinação dos genótipos.

2.3 - Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados

A partir dos genótipos identificados nos géis de eletroforese foram calculadas, de acordo com Weir (1996), as frequências alélicas e genotípicas para cada um dos polimorfismos genotipados. Foram feitas comparações das frequências alélicas e genotípicas dos genes *COX4I2* e *PDK4* entre as linhagens de trabalho e corrida, e entre fenótipos extremos de desempenho dados pelos menores e maiores IV (IV inferiores e IV superiores). Para análise entre IV inferiores e superiores, os fenótipos foram ajustados para efeitos sistemáticos de ambiente (efeitos fixos), de sexo, da interação de hipódromo (1 a 14) e distância (228, 275, 301, 320, 365, 402 e 502 metros) e da interação de ano da corrida (1988 a 2013) e idade do animal à corrida (2, 3 e 4 anos). O efeito de sexo e das interações foram testados quanto à significância utilizando o PROC GLM do programa SAS v.9.1 (SAS, 2004). A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a linhagem de corrida e das diferenças entre frequências alélicas e genotípicas foi realizada utilizando o teste χ^2 por meio do pacote *genetics* do *software* R (WARNES, 2013).

2.4 - Associação entre os SNPs estudados e característica de desempenho na linhagem de corrida

A análise de associação foi realizada por meio da metodologia dos modelos mistos utilizando-se PROC MIXED do programa SAS v.9.1 (SAS, 2004). O modelo para associação de cada SNP incluiu o efeito aleatório de reprodutor, os efeitos fixos de sexo, da interação da classe etária e ano de corrida, e da interação de hipódromo e distância, além do erro aleatório. O número de cópias de um alelo particular do genótipo do polimorfismo foi incluído no modelo como covariável. Como SNPs são bialélicos, ou seja, só existem dois alelos possíveis, a regressão foi feita em um dos alelos, a saber: o mais frequente.

3 - Resultados

Os resultados gerados a partir do sequenciamento de produtos de PCR mostraram os genes *PDK4* e *COX4I2* polimórficos na raça Quarto de Milha, enquanto que o SNP g.66493737C>T do *MSTN* praticamente não variou. Por essa razão, apenas os polimorfismos dos dois primeiros (g.38973231A>G do *PDK4* e g.22684390C>T do *COX4I2*) foram genotipados para o conjunto total de animais (n=364). O SNP g.22999655C>A do *DMRT3*, genotipado em subamostra de 60 animais, também mostrou um de seus alelos praticamente fixado. Na Tabela 2 encontram-se descritos os padrões eletroforéticos dos genótipos dos polimorfismos dos genes *PDK4*, *COX4I2* e *DMRT3*.

Tabela 2. Descrição dos padrões de bandas encontrados e esperados para os diferentes genótipos dos SNPs analisados.

SNP (gene)	Genótipo	Padrão eletroforético observado ou esperado*
g.38973231A>G (<i>PDK4</i>)	AA	356 e 235 pb
	AG	356, 235 e 177 pb
	GG	356 e 177 pb
g.22684390C>T (<i>COX4I2</i>)	CC	556 pb
	CT	556, 291 e 265 pb
	TT	291 e 265 pb
g.22999655C>A (<i>DMRT3</i>)	AA	221, 221 e 28 pb*
	AC	442, 221, 221 e 28 pb
	CC	442 e 28 pb

* Sob as condições de eletroforese realizadas na presente pesquisa, os fragmentos de 28 pb dos genótipos do SNP do gene *DMRT3* não foram visualizados.

Resultados das análises de frequências alélicas e genotípicas dos SNPs dos genes *COX4I2* e *PDK4* nas linhagens de corrida e de trabalho estão descritos na Tabela 3. Notou-se diferença significativa das frequências genotípicas do SNP g.22684390C>T do gene *COX4I2* entre as linhagens. Embora não significativo ($p=0,071$), o alelo T, favorável para desempenho em corridas no PSI (GU et al., 2010), foi encontrado em menor frequência na linhagem de corrida quando comparado à de trabalho (0,38 x 0,46). Para o polimorfismo g.38973231A>G do gene *PDK4* foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas ($p=0,0005$) e alélicas ($p=0,0001$) entre as linhagens, sendo que o alelo A, favorável para desempenho em corridas no PSI (HILL et al., 2010a), apresentou maior ocorrência na linhagem de corrida. A partir dos achados disponíveis na Tabela 2 para o teste de Hardy-Weinberg, pode-se inferir que a população de equinos de corrida da raça Quarto de Milha do estado de São Paulo não se encontra em equilíbrio para os polimorfismos analisados dos genes *COX4I2* ($p=0,0013$) e *PDK4* ($p=0,0358$).

Tabela 3. Comparação das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *COX4I2* e *PDK4* nas linhagens de corrida e de trabalho da raça Quarto de Milha e equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para a linhagem de corrida

		Corrida (n=296)		Trabalho (n=68)		χ^2	Valor de P	HWE
		n	Frequência	n	Frequência			(Valor de P)
<i>COX4I2</i> (n=364)								
Genótipos	CC	102	0,34	20	0,29	8,428	0,01479	0,0013
	CT	166	0,56	33	0,49			
	TT	28	0,09	15	0,22			
Alelos	C	370	0,62	73	0,54	3,253	0,07127	
	T	222	0,38	63	0,46			
<i>PDK4</i> (n=364)								
Genótipos	GG	141	0,48	50	0,74	15,239	0,00049	0,0358
	GA	137	0,46	17	0,25			
	AA	18	0,06	1	0,01			
Alelos	G	419	0,71	117	0,86	14,62	0,00013	
	A	173	0,29	19	0,14			

χ^2 = Qui-quadrado; HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As comparações de frequências alélicas e genótípicas dos SNPs dos genes *COX4I2* e *PDK4* entre animais com fenótipo extremos para desempenho em corridas (Tabela 4) não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 4. Comparação das frequências genotípica e alélica dos polimorfismos dos genes *COX4I2* e *PDK4* nas linhagens entre fenótipos extremos para desempenho em corridas da raça Quarto de Milha

		IV Superior (n=20)		IV Inferior (n=20)		χ^2	Valor de P
		n	Frequências	n	Frequências		
<i>COX4I2</i>							
Genótipos	CC	6	0,3	11	0,55	2,56	0,2871
	CT	11	0,55	7	0,35		
	TT	3	0,15	2	0,1		
Alelos	C	23	0,57	29	0,72	1,374	0,2412
	T	17	0,43	11	0,28		
<i>PDK4</i>							
Genótipos	GG	10	0,5	11	0,55	1,114	0,5728
	GA	7	0,35	8	0,4		
	AA	3	0,15	1	0,05		
Alelos	G	27	0,68	30	0,75	0,244	0,6213
	A	13	0,32	10	0,25		

χ^2 = qui-quadrado; IV = Índice de Velocidade

A significância dos efeitos fixos de sexo, e das interações de hipódromo e distância e ano da corrida e idade do animal à corrida utilizados no modelo de associação entre os SNPs dos genes *COX4I2* e *PDK4* e desempenho encontram-se apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Efeitos fixos de sexo, e das interações de hipódromo e distância e ano da corrida e idade do animal à corrida, graus de liberdade (DF) e o valor de P

Efeito	DF	Valor de P
Sexo	1	0,0010**
Idade x ano	55	0,0362*
Distância x hipódromo	54	0,0001***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Nos estudos de associação entre os polimorfismos dos genes *COX4I2* e *PDK4* e IV máximo (Tabela 6) não foram observadas associações significativas. Foram consideradas substituições do alelo T pelo C para o gene *COX4I2* e do A pelo G para o *PDK4*.

Tabela 6. Efeito de substituição alélica dos SNPs g.22684390C>T do gene *COX4I2* e g.38973231G>A do gene *PDK4* sobre o desempenho em equinos de corrida da raça Quarto de Milha

Gene	n	Substituição	Efeito	p-value
<i>COX4I2</i>	266	T>C	-0,8788	0,3666
<i>PDK4</i>	267	A>G	-1,5991	0,1104

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

O SNP g.66493737C>T do gene *MSTN* apresentou o alelo C em todos os animais genotipados da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha (IV superiores, n=10; e IV inferiores, n = 10). Na linhagem de trabalho (n=10), apenas um animal heterozigoto (CT) foi encontrado.

O polimorfismo g.22999655C>A do gene *DMRT3* não mostrou a presença do alelo A, favorável para o andamento do tipo marcha, nos animais de IV superior (n=20). Entretanto, foi observada a existência de dois animais heterozigotos (AC) no grupo IV inferior (n=20) e outro em cavalos da linhagem de trabalho (n=20).

4 - Discussão

Em razão da enorme dificuldade de obtenção de maior número de animais Quarto de Milha de corrida com informação de desempenho no Brasil, a presente pesquisa foi conduzida com número reduzido de indivíduos quando comparado a estudos de associação entre polimorfismos de DNA e características de produção realizados em outras espécies de interesse zootécnico, principalmente em bovinos. Entretanto, é necessário constatar que este estudo foi realizado com número de

animais relativamente grande quando comparado a outros estudos de associação realizados com equinos.

Os protocolos de genotipagem por ARMS-PCR para o polimorfismo g.38973231A>G do gene *PDK4* e por PCR-RFLP para os SNPs g.22684390C>T do *COX4I2* e g.22999655C>A do *DMRT3*, ora apresentados, mostraram-se eficazes, robustos, de baixo custo e apropriados para laboratórios dotados de estrutura básica em equipamentos e reagentes, o que permitirá a expansão da análise desses polimorfismos em equinos.

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg observado para os SNPs g.22684390C>T do gene *COX4I2* e g.38973231A>G do *PDK4*, na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha sugere que algumas das condições para cumprimento deste teorema não puderam ser encontradas, possivelmente, em decorrência da introdução de animais de outras raças como reprodutores e/ou outras ações, como seleção e acasalamento não ao acaso.

Os resultados do presente trabalho mostraram frequências menores do alelo T do SNP g.22684390C>T do gene *COX4I2* nas linhagens de corrida (0,38) e de trabalho (0,46) da raça Quarto de Milha, do que na raça PSI. Em trabalho realizado por Gu et al. (2010) com a raça inglesa, a ocorrência do alelo T foi significativamente maior no grupo com melhor desempenho em corridas (0,68) em relação ao de pior (0,55). Observa-se que, nesta pesquisa, o alelo T apresenta maior frequência (próximo de significativo) na linhagem de trabalho em relação à de corrida. Estes resultados sugerem que esta variante pode estar relacionada a melhorias do metabolismo aeróbico, predominante nas provas esportivas desempenhadas pelo Quarto de Milha de trabalho. Este alelo também foi relacionado a melhores desempenhos em corridas no PSI (GU et al., 2010), os quais mesmo em corridas curtas percorrem distâncias sensivelmente superiores a aquelas percorridas nas provas da raça Quarto de Milha. Apesar de localizado em intron, o SNP g.22684390C>T do *COX4I2* equino pode ser o causador direto de variação fenotípica uma vez que rompe possível sítio de ligação de elemento de resposta a glicocorticóides (GU et al., 2010). Citocromo c oxidase (COX) é uma enzima multi-subunidade (Complexo IV) que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c

reduzido para o oxigênio na respiração mitocondrial. O COX4, codificado pelo DNA nuclear, é responsável pela regulação e montagem das subunidades mitocondriais codificadas no interior da membrana mitocondrial e tem sido associado com o volume da organela. O COX4 compreende duas isoformas (COX4-1 e COX4-2) codificadas pelos genes *COX4I1* e *COX4I2*, localizados no cromossomo equino 22 (ECA 22), os quais são diferencialmente regulados em ambientes de normóxia (oxigênio normal) e hipóxia (falta de oxigênio) (FUKUDA *et al.*, 2007). Em ambientes com oxigênio normal, o gene *COX4I1* é preferencialmente transcrito. Em ambientes de oxigênio limitado o regulador principal de resposta à hipoxia, HIF-1 (fator induzível de hipoxia 1), ativa a transcrição dos genes *COX4I2* e *LON* mitocondrial, o que inibe a expressão do *COX4I1*. Neste sentido, tem sido proposto que a regulação ambiental de COX4-2 pode aumentar a eficiência da respiração celular (FUKUDA *et al.*, 2007), o que o credenciou a gene candidato para desempenho atlético em humanos e também em equinos.

Uma variante no gene *PDK4*, localizada no intron 2, foi o primeiro exemplo de associação significativa entre um SNP e desempenho superior de cavalos em corridas (CHOWDHARY, 2013). Em Hill *et al.* (2010a), o SNP g.38973231A>G do gene *PDK4* mostrou frequências superiores do alelo A em cavalos PSI com melhor desempenho em corridas (0,44) quando comparados a grupo com pior desempenho (0,29). Aqui, maiores ocorrências do alelo A foram observadas na linhagem de corrida (0,29) em relação à de trabalho (0,14). Entretanto não houve diferenças estatísticas entre os fenótipos extremos para corrida e nem associação significativa entre as variantes do polimorfismo e IV. Embora não associado a melhor desempenho em corridas na raça Quarto de Milha, o *p-value* de 0,1104 e as diferenças de frequência entre linhagens ($p=0,00013$) e fenótipos extremos (IV superior: 0,32; IV inferior: 0,25) podem indicar que o alelo A está sendo selecionado. Por outro lado, esses resultados podem ser explicados pelo uso de cavalos PSI, com bom desempenho em corridas de curtas distâncias, como reprodutores na linhagem de corrida de Quarto de Milha. Tal fato pode acarretar aumento da frequência do alelo A na raça sem que necessariamente esteja relacionado com melhor desempenho. A expressão do gene *PDK4*, localizado no cromossomo equino 4 (ECA4), é coordenada pelo co-ativador transcricional PGC-1 α (WENDE *et al.*, 2005), o qual tem sido identificado como um dos fatores críticos

no controle da adaptação ao exercício (ARANY, 2008). A regulação da utilização da glicose é rigidamente controlada pela captação de glicose pelos seus transportadores, pela taxa de fluxo glicolítico e pela conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria por meio da função catalisadora do complexo piruvato desidrogenase (PDC). O passo crítico limitante da velocidade de oxidação da glicose é a regulação da montagem do PDC, que é controlado pela piruvato desidrogenase quinase (PDK). A PDK bloqueia a formação do PDC, resultando na beta-oxidação de ácidos graxos para acetil-CoA como substrato para a fosforilação oxidativa. A oxidação de ácidos graxos é altamente eficaz na geração de ATP e é controlada pela expressão de *PDK4* no músculo esquelético durante e após o exercício (PILEGAARD & NEUFER, 2004).

Os resultados, aqui obtidos, a partir do sequenciamento da região do SNP g.66493737C>T do *MSTN* mostrou o alelo C fixado na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha. Portanto, a realização de teste associação para verificação de sua relação com desempenho em corridas não foi possível. Em Hill et al. (2010a), genotipagem realizada com 35 cavalos Quarto de Milha também mostrou a alta ocorrência do alelo C (0,9) e do genótipo CC (CC 0,83; CT 0,14; TT 0,03). Estes resultados sugerem que este alelo vem sofrendo pressão de seleção na raça. Foi suposto, inicialmente, nesta pesquisa que a ocorrência do alelo T do polimorfismo do *MSTN*, relacionado à menor desenvolvimento muscular (HILL et al., 2010a), seria desfavorável ao desempenho em corridas de cavalos da raça Quarto de Milha. Essa suposição, veio a partir da análise do trabalho de Hill et al. (2010a), que ao estudar SNP g.66493737C>T próximo ao gene *MSTN* equino em amostra de 148 cavalos PSI, identificaram forte associação do polimorfismo com distância ótima de corrida, onde animais de genótipo CC mostraram-se adequados para corridas de distâncias curtas (rápidas), animais de genótipo CT para corridas de distâncias médias e animais de genótipo TT para corridas de distâncias longas (resistência). Dessa forma, o alelo T do SNP do *MSTN*, gene localizado no cromossomo equino 18 (ECA18) e associado com o desenvolvimento da massa muscular em diversas espécies, estaria relacionado ao menor desenvolvimento corporal e, conseqüentemente, ao pior desempenho. Em avaliações realizadas em PSI de diversos países na Europa, América do Norte e Oceania, não foi encontrada relação entre este polimorfismo e melhores desempenhos (CHOWDHARY, 2013). Exceção feita a PSIs do Japão, em que foi

observada associação significativa deste SNP com *rank* e histórico de premiações (TOZAKI et al., 2010). Binns et al. (2010) utilizaram 189 cavalos PSI vencedores de corrida na América do Norte e identificaram por meio chips de SNPs (*Equine SNP50 BeadChip* – Illumina, EUA) dois polimorfismos (BIEC2-417274 e BIEC2-417495) associados com distância ótima de corrida. Análises de bioinformática revelaram que estes SNPs são vizinhos ao loco do gene *MSTN*. Em pesquisa paralela e publicada no mesmo ano, Hill et al. (2010b), também utilizando o *Equine SNP50 BeadChip* em 118 cavalos elite PSI de corrida, divergentes em relação à distância ótima de corrida, identificaram o SNP BIEC2-417495 (localizado no cromossomo 18 a aproximadamente 690Kb do gene *MSTN*), como o mais significativamente relacionado à característica.

O presente trabalho mostrou, pela primeira vez, a ocorrência do alelo A do polimorfismo g.22999655C>A do gene *DMRT3* em raça não marchadora de grande expressão. Em pesquisa desenvolvida por Anderson et al. (2012), a frequência do alelo A variou de 0,95 a 1,00 em diversas raças marchadoras, entre as quais: Icelandic horses (n=248), Paso Fino (n=45), Missouri Fox Trotter (n=40) e teve frequência zero em raças não marchadoras como o Árabe (n=18) e o PSI (n=29). O *DMRT3* codifica um importante fator de transcrição na configuração de circuitos da medula espinhal, controlando o movimento em vertebrados. Está envolvido na especificação neuronal, incluindo a subdivisão de neurônios da medula, e no desenvolvimento de uma rede neuronal de coordenação do sistema locomotor que controla os movimentos dos membros. O SNP g.22999655C>A cria *stop códon* prematuro que resulta em proteína truncada de 300 aminoácidos contra 438 do tipo selvagem, e, portanto, sem atividade fisiológica. Assim, de acordo com Anderson et al. (2012), o alelo mutante (A) do gene *DMRT3* pode se mostrar prejudicial para raças de velocidade, diminuindo o desempenho de cavalos em corridas. O alelo da marcha, só mostrou alterar drasticamente o fenótipo de andamento quando encontrado em homozigose (ANDERSSON et al., 2012). Entretanto, o efeito da heterozigose em raças de velocidade ainda não foi evidenciado. Portanto, testes de DNA para raça Quarto de Milha seriam úteis para eliminação de heterozigotos e prevenção da formação de homozigotos.

Em estudo recente de associação ampla do genoma (GWAS) realizado com o *Equine SNP50 BeadChip* em equinos Quarto de Milha da linhagem de corrida, dos quais 120 animais foram utilizados na presente pesquisa (C.T. Meira, dados em vias de publicação), consideraram para associação IV máximo, altura à cernelha, peso e comprimento corporal. Cerca de 50 marcadores foram significativamente associados ao IV e a pelo menos duas características de conformação. Destes, nove são de grande interesse biológico por estarem próximos a genes possivelmente relacionados ao desempenho atlético. Os genes *NEB*, *NDRG1*, *PITX2*, *CAMTA1*, *PIK3C3*, *MEIS1*, *MIPEP* e *PAPP-A* mostraram-se candidatos para desempenho de equinos desta linhagem, visto que têm importante papel na fisiologia dos músculos esquelético e cardíaco, no crescimento corporal e no sistema cardiovascular.

5 - Conclusões

Embora os resultados do presente trabalho tenham mostrado diferenças nas frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos g.22684390C>T do gene *COX4I2* e g.38973231A>G do *PK4* entre as linhagens de corrida e de trabalho da raça Quarto de Milha, não foi possível associá-los ao melhor desempenho em corridas, sugerindo que estes genes estejam ligados a melhorias do metabolismo aeróbico ou que os alelos favoráveis ao melhor desempenho tenham sido introduzidos nesta linhagem pela utilização de garanhões Puro-Sangue Inglês, sem que de fato o aumento das suas frequências contribua para a melhoria da característica. Deste modo, não poderão ser utilizados como marcadores para o auxílio na seleção de animais superiores para corrida na raça Quarto de Milha. Estudos de todo o genoma estão sendo realizados na raça e deverão indicar regiões cromossômicas e genes relacionados ao desempenho em corridas, principalmente ao metabolismo muscular energético predominantemente anaeróbio.

O alelo C do SNP g.66493737C>T do gene *MSTN*, relacionado a corridas de curtas distâncias, apresentou-se próximo de fixado na raça Quarto de Milha, impedindo qualquer análise de associação. Entretanto, este resultado confirma a

relação do alelo C com corridas de curtas distâncias e possivelmente à maior massa corporal. O gene da marcha *DMRT3* mostrou pela primeira vez a presença do alelo A (da marcha) do SNP g.22999655C>A em raça não marchadora selecionada para velocidade. Embora em baixa frequência, esta variante foi encontrada apenas em animais com pior desempenho em corridas e de trabalho, o que pode sugerir seu efeito nocivo para o desempenho em corridas.

6 - Referências:

- ABQM. **Associação brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha.** Disponível em: <http://www.abqm.com.br/>, 2013 acesso em: 12/5/2013.
- AMERICA'S HORSE DAILY. **All About the Racing American Quarter Horse.** 26 de fevereiro de 2008. Disponível em: < http://americashorsedaily.com/all-about-the-racing-american-quarter-horse/#.Urx8N_RDvik> acesso em: 12/11/2013.
- ANDERSSON, L.S.; LARHAMMAR, M.; MEMIC, F.; WOOTZ, H.; SCHWOCHOW, D.; RUBIN, G-J.; PATRA, K.; ARNASON, T.; WELLBRING L.; HJÄLM G.; IMSLAND, F.; PETERSEN, J.L.; MCCUE, M.E.; MICKELSON, J.R.; COTHRAN G.; AHITUV, N.; ROEPSTORFF, L.; MIKKO, S.; VALLSTEDT, A.; LINDGREN, G.; ANDERSSON, L.; KULLANDER, K. **Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice.** Nature, v.488, ed.7413, p.642-646, 2012.
- BINNS, M.M.; BOEHLER, D.A.; LAMBERT D.H. **Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA.** Animal Genetics, v.41 (Suppl. 2), p.154–158, 2010.
- BRAY, M.S.; HAGBERG, J.M.; PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; ROTH, S.M.; WOLFARTH, B; BOUCHARD, C. **The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: The 2006-2007 update.** Medicine and Science in Sports and Exercise, v.41, Ed.1, p.35-73, Janeiro de 2009.
- BREAZILE, J. E. Fisiologia do Músculo Esquelético. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes/ **Fisiologia dos animais domésticos.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. p. 777-793.
- CORRÊA, M.J.M. **Avaliação genético-quantitativa de características de desempenho em cavalos da raça Quarto de Milha.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2005.

- CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H. *et al.* **A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.** *Nature Genetics*, v.38, p.813–818, 2006.
- CHOWDHARY, B.P. **Equine Genomics.** John Wiley & Sons, Inc. 2013. 1 ed. 323p.
- DIAS, R.G.; PEREIRA, A.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, J.E. **Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 13: 211-216. 2007.
- EQUIBASE COMPANY. Disponível em <<http://www.equibase.com/>> acesso: 21/09/2013
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. **Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Research*. v.8, p. 175-185, 1998.
- FREEMAN, D.W. **Physical conditioning of horses.** Oklahoma state University: Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2013.
- GROBET, L.; ROYO MARTIN, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. (1997) **A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle.** *Nature Genetics*, v.17, p.71–74, 1997
- GU, J.; MACHUGH, D.E.; MCGIVENY, B.A.; PARK, S.D.E.; KATZ L.M.; HILL, E.M. **Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses.** *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.569-575, 2010.
- GU, J.; ORR, N.; PARK, S.D.; KATZ, L.M.; SULIMOVA, G.; MACHUGH, D.E.; *et al.* **A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses.** *PLoS One*, v.4, p.1-17, 2009.
- HILL, E. W.; MCGIVNEY, B. A.; GU J.; WHISTON, R.; MACHUGH D. E. **A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses.** *BMC Genomics*, v.11, n.552, p.1-10, 2010b.
- HILL, E.M.; GU, J.; EIVERS, S.S.; FONSECA, R.G.; MCGIVENY, B.A.; GOVINDARAJAN, P. *et al.* **A Sequence Polymorphism in MSTN Predicts Sprinting Ability and Racing Stamina in Thoroughbred Horses.** *PLoS One*, v.5, p.1-6, 2010a.

- HILL, E.M.; GU, J.; MCGIVENY, B.A.; MACHUGH, D.E. **Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance.** *Animal Genetics*, v.41, p.56-63, 2010c.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L.; BASS, J.J. **Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle.** *Genome Research*, v.7, p.910-916, 1997.
- MCPHERRON AC, LAWLER AM, LEE SJ. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.** *Nature* 387: 83–90, 1997.
- PILEGAARD H.; NEUFER P.D. **Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise.** *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 221–226, 2004.
- SAS, 2004. **SAS/STAT User's Guide**, Version 9.1, Volumes 1-7. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SCHRÖDER, W.; KLOSTERMANN, A.; STOCK, K.F.; DISTL, O. **A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warmblood horses.** *Animal Genetics*, p.1-9, 2011.
- SCHUELKE, M.; ANGER, K.R.; STOLZ, L.E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T. et al. **Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.** *The New England Journal of Medicine*, v.350, p.2682–2688, 2004.
- TOZAKI, T.; MIYAKE, T.; KAKOI, H.; GAWAHARA, H.; SUGITA, S.; HASEGAWA, T. et al. **A genome-wide association study for racing performances in Thoroughbreds clarifies a candidate region near the MSTN gene.** *Animal Genetics*,v.41, p.28-35, 2010.
- WAGONER, D.M. **Equine genetics & selection procedures.** Equine Research Publications, Dallas, Texas, 513 p., 1978.
- WARNES G. **Popualation genetics.** Package “genetics” v.1.3.8.1. 3 de setembro de 2013.
- WEIR B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data.** Massachusetts: Sinauer Associates, 1996, 445 p.
- WENDE A.R.; HUSS J.M.; SCHAEFFER P.J.; GIGUERE V.; KELLY D.P. **PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism.** *Molecular and Cellular Biology*, v.25, ed.10, p.684–94, 2005.

CAPÍTULO 3 - Estimativas de parâmetros genéticos de características morfométricas e de desempenho em equinos da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha

RESUMO - Equinos da raça Quarto de Milha, devido à sua versatilidade, podem ser utilizados no trabalho a campo e em esportes variados, entre os quais as corridas. Com notório desempenho em corridas de curtas distâncias (402 metros em sua maioria), a linhagem de corrida representa o mais importante seguimento dentro da raça, com significativo impacto no agronegócio nacional. Além, do número de provas e ganho monetário, o desempenho dado pelo Índice de Velocidade (IV) é muito utilizado em decisões de seleção e comércio. Foram coletadas medidas morfométricas e de desempenho de 296 equinos Quarto de Milha de corrida. A fim de melhorar as estimativas de parâmetros genéticos para IV, além dos registros de IV dos animais medidos, adicional de 3340 registros foram considerados. Por meio do software REMLF90, foram estimadas as (co) variâncias e obtidas as correlações genéticas e de ambiente e as herdabilidade para oito características morfométricas e IV. Foram observadas herdabilidades de 0,21 a 0,69 e 0,17 para medidas morfométricas e IV, respectivamente. Observou-se correlação negativa moderada entre comprimento de corpo e de garupa e desempenho (-0,44 e -,30, respectivamente) e baixa correlação positiva entre altura à cernelha (0,25) e desempenho. O perímetro de canela e de casco, e altura à cernelha apresentaram alta correlação genética com perímetro torácico, sugerindo que a seleção de animais mais altos promove o aumento do peso e não necessariamente o incremento do comprimento corporal. O comprimento de quartela mostrou correlação positiva com altura à cernelha, dado importante visto que o comprimento de quartela teve correlação positiva moderada (0,37) com desempenho. A seleção para comprimento corporal acarreta, assim como para perímetro torácico, aumento nos perímetros de casco e de canela e do comprimento de garupa. Embora não fosse esperada correlação negativa entre comprimento corporal e desempenho, isso pode ser explicado pela sua baixa correlação genética com as demais medidas e pela intensa seleção empírica realizada para comprimento corporal por parte dos criadores. Se não guardadas as devidas proporções com as demais dimensões corporais, como altura à cernelha, também comumente utilizada na seleção empírica, possivelmente, se terá animais com comprimento excessivo e piora do desempenho.

Palavras-chave: Conformação, Correlação, Herdabilidade, Índice de Velocidade

Estimates of genetic parameters of morphometric characteristics and performance horses in the lineage of racing Quarter Horse

ABSTRACT - Quarter Horses, due to its versatility, can be used for work on the farms and in various sports, including racing. With extraordinary performance in racing short distances (402 meters at most), the racing line is the most important group within the breed, with significant impact on agribusiness. In addition, the number of tests and monetary gain, the performance given by Speed Index (SI) is widely used in selection decisions and trade. Morphometric and performance of 296 Quarter Horses racing measures were collected. In order to improve the estimates of genetic parameters for IV obtained here, additional records of 3340 animals were considered measured. Were estimated (co) variances components and genetic and environmental correlations and heritabilities for eight morphometric traits and SI by REMLF90 software. Heritability from 0.21 to 0.69 and 0.17 for morphometric traits and SI, respectively, were observed. There was moderate negative correlation between body length and rump and performance (-0.44 and -0.30, respectively) and low positive correlation between height at withers and performance (0.25). The perimeter of cinnamon and Hull, and height at withers showed high genetic correlation with heart girth, suggesting that selection of higher animals promotes weight gain and not necessarily an increase in body length. The length of pastern showed positive correlation with height at the withers, as important as the length of pastern had moderate positive correlation (0.37) with performance selection for body length leads, as well as heart girth, increase in girth of the hull and cinnamon and length of croup. Although not expected negative correlation between body length and performance, this can be explained by their low genetic correlation with other measures and marked empirical selection for body length by the creators. If not, *mutatis mutandis* with the other body measurements such as height at withers, also commonly used in empirical selection possibly will be animals with excessive length and worse performance.

KEYWORDS: *Conformation, relation, Heritability, Speed Index*

1 - Introdução

Surgida no século XVII na América do norte, a raça Quarto de Milha teve seu maior desenvolvimento a partir ocupação do oeste Norte Americano, devido principalmente à necessidade de cavalos robustos e versáteis. Com diferentes objetivos de seleção, ao longo da sua formação, ao menos três linhagens com habilidades distintas foram desenvolvidas: a de conformação, de trabalho e de corrida

(ABQM, 2013). A linhagem de corrida explora a aptidão dos animais quanto à velocidade em pistas retas e de curta distância. Apesar do efetivo de animais ser relativamente menor nesta que nas demais linhagens, sua importância econômica é substancial, não somente por gerar renda por meio de premiações e apostas (US\$ 2,5 milhões; LIMA et al., 2006), mas também pelo elevado custo gerado na manutenção destes animais dentro desta modalidade esportiva (entre R\$ 800,00 e R\$ 1.400,00, em média mensal, excluindo-se medicamentos e procedimentos veterinários).

Medidas de desempenho em corridas são comumente dadas por tempo, *rank* ou premiação. Dentro da raça Quarto de Milha o desempenho de cada animal é medido pelo índice de velocidade (IV). De acordo com Evans (1989), o IV foi criado nas corridas da raça Quarto de Milha com o intuito de permitir comparação de desempenhos entre os animais em diferentes condições (distâncias, hipódromo, clima, país). Cada hipódromo tem sua própria tabela de IV, que é elaborada a partir da média das três vitórias mais rápidas (três melhores tempos) para cada um dos três últimos anos consecutivos, em cada distância, sendo que o valor da média desses nove tempos equivalerá ao IV igual a 100 (JCS, 2002). Os pontos de IV são inteiros e variam de acordo com o tempo, em centésimos de segundo, seguindo ajustes em acordo com a distância percorrida. A tabela de IV faz a conversão do tempo em pontos do IV com ajustes pelas distâncias. Como exemplo, nas distâncias de 365 metros (m), 402m e 503m, a cada quatro centésimos de segundo a mais ou a menos obtido em relação ao tempo que representa o IV 100, diminui-se ou acrescenta-se um ponto ao índice.

Embora cavalos de corrida apresentem maior proporção de massa muscular, mais do que raças de outras finalidades (CHOWDHURY, 2013), estes começam a treinar ainda bastante jovens e, dessa forma, estão sujeitos à alta pressão sobre ossos e articulações imaturas (THOMAS, 2005). Tal fato pode acarretar rupturas e lesões de tecidos, sobretudo em equinos Quarto de Milha que iniciam a vida de competições aos dois anos. Assim, animais de corrida precisam ter boa conformação para desenvolver velocidade em corridas de curtas distâncias e suportar o estresse do treinamento e participações em provas de alta velocidade. De acordo com Hill et al. (2010), na raça Puro-Sangue Inglês (PSI) a característica que mais contribui para o

melhor desempenho em corridas de curtas distâncias é a proporção e maturidade da musculatura esquelética.

Estudos realizados em variadas raças avaliaram diversos parâmetros, como correlações genéticas, de ambiente e fenotípicas entre medidas corporais (MOTA et al., 2006; PINTO et al., 2005; LAGE et al., 2009) e até mesmo correlações destas com desempenho (KOENEN et al., 1995; WALLIN et al., 2002). Entretanto, na raça Quarto de Milha, as pesquisas ficaram restritas, em sua maioria, à linhagem de trabalho, na obtenção de curvas de crescimento de potros, variâncias e correlações fenotípicas entre algumas medidas corporais (MOTA & OLIVEIRA, 2008; MOREIRA et al., 2009; MOTA et al., 2010). Pouco ou nada se tem feito para estimar parâmetros genéticos para medidas morfométricas na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha, bem como para a obtenção de correlações genéticas destas com o desempenho. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi estimar (co) variâncias genéticas e de ambiente para desempenho e para medidas corporais e analisar com profundidade as correlações genéticas entre medidas morfométricas e o desempenho em corridas. Assim pretende-se gerar maior compreensão dessas inter-relações.

2 - Material e Métodos

2.1 - Medidas corporais

Foram coletadas medidas corporais de 296 animais da raça Quarto de Milha de corrida. As medidas foram coletadas nos anos de 2011 e 2013 no Jockey Club de Sorocaba e em haras situados no estado de São Paulo, Brasil. Os procedimentos de mensuração foram realizados conforme Torres e Jardim (1992) com os equinos em estação forçada, isto é, com membros anteriores e posteriores na perpendicular sobre piso plano, sempre do lado direito do animal. Foram tomadas as medidas de altura à cernelha (AC), comprimento de corpo (CC), comprimento de garupa (CG), comprimento de Canela (CCan), comprimento de quartela (CQ), perímetros torácico (PT), perímetro de canela (PCan) e perímetro de casco (PCas). Também foram

coletadas estas mesmas medidas corporais de 68 animais da linhagem de trabalho, com intuito de comparar características corporais entre animais das linhagens de corrida e trabalho.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados segundo as normas brasileiras de bem estar animal (protocolo n° 204/2012-CEUA expedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu, São Paulo, Brasil).

2.2 - Teste de médias

Para o teste de médias das medidas corporais entre as linhagens foram considerados além do efeito de linhagem, os efeitos de sexo e idade como covariável. O PROC GLM foi utilizado para verificar a significância dos efeitos e o PROC MEANS do programa SAS 9.1 (SAS, 2004) para comparação de médias entre linhagens. Foi utilizado teste de Tukey com nível de significância a 5%.

2.3 - Medidas de Índice de Velocidade

Por meio de consulta ao banco de dados do Departamento de Estatística do Jockey Jóquei Clube de Sorocaba (JCS), São Paulo, Brasil, e Equibase (Equibase Company, EUA), foram coletados os IV máximos (o maior IV obtido ao longo da vida de competição do animal) para os 296 indivíduos que tiveram suas medidas corporais aferidas. Com o intuito de se melhorar as estimativas de variância de IV máximo, foram agregadas ao conjunto de dados já existente, registros de IV máximo de 3340 animais que correram entre os anos 1988 e 2013 no JCS. Dessa forma, para determinação das estimativas das variâncias para IV, foram considerados 3636 registros e pedigree com 5068 animais de quatro gerações.

2.4 - Efeitos e covariáveis considerados

Para medidas morfométricas foram considerados, mediante análise para verificação de significância realizada por meio de PROC GLM do software SAS v.9.1 (SAS, 2004), os efeitos fixos de sexo, ano (2011 e 2013) e local da coleta (1, 2, 3... 15). A idade do animal à coleta da medida foi considerada no modelo como covariável linear. O efeito de prenhes foi considerado como fator aninhado em sexo.

Para Índice de Velocidade, além do efeito aleatório de animal e de ambiente permanente, os efeitos fixos considerados foram: idade do animal (2, 3 e 4 anos), e ano da corrida no qual obteve seu IV máximo (1988 a 2013), distância (228, 275, 301, 320, 365, 402 e 502 m), hipódromo (1 a 14) e sexo. Visto que a idade do animal a corrida se dá em um determinado ano (diferentes anos tem diferentes índices a ser superado) e que ambas podem atuar de forma conjunta interferindo no melhor ou pior desempenho durante a prova, é razoável considerar a interação entre ano e idade. Note que um determinado animal que esteja em uma idade mais favorável para conseguir melhores tempos pode também estar em um ano mais ou menos favorável à obtenção de melhores IVs. Interação ocorre também entre distância e hipódromo, já que cada tempo de índice em determinada distância é considerado em determinado hipódromo. Após análise de significância pelo PROC GLM do software SAS 9.1 (SAS, 2004), foram considerados os efeitos fixos de sexo e das interações entre ano e corrida, e distância e hipódromo.

2.5 - Modelo estatístico para obtenção das variâncias

Para determinação das estimativas de (co) variâncias genéticas e de ambiente para IV máximo e medidas morfométricas foi considerado o seguinte modelo simplificado:

$$y_{ij} = X\beta + Z\alpha + \varepsilon_{ij}, \text{ onde:}$$

y_{ij} representa o vetor das observações fenotípicas do i^{th} animal à j^{th} característica; X é a matriz de incidência relacionando o vetor de efeitos fixos em β com as observações em y_{ij} ; Z é a matriz de incidência relacionando o efeito aleatório de animal em α com

as observações em y_{ij} ; e ε_{ij} é o vetor de efeitos aleatórios residuais. A idade à coleta das medidas morfométricas foi considerada no modelo como covariável linear.

2.6 - Estimativas de parâmetros genéticos e de ambiente

Para obtenção das estimativas de (co) variâncias foi realizada análise multivariada utilizando o *software* REMLF90 (MISZTAL, 2001), que emprega o algoritmo de Maximização da Esperança (EM), com processo de aceleração da convergência. Admitiu-se que a convergência seria atingida quando o quadrado das diferenças relativas entre estimativas consecutivas fosse menor que 10^{-9} . Foram incluídos na análise multivariada as mensurações de medidas morfométricas e o Índice de Velocidade.

3 - Resultados

Todas as medidas corporais tomadas na presente pesquisa foram significativamente ($p < 0,05$) maiores na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva das medidas morfométricas dadas em centímetros, peso e idade das linhagens de trabalho e corrida de Quarto de Milha.

Medidas	Trabalho					Corrida				
	n	Média	C.V.	Min.	Max.	n	Média	C.V.	Min.	Max.
Altura de Cernelha	69	146.60 ^b	3,762	139	154	296	158.75 ^a	4,702	146	172
Comprimento corporal	69	163.43 ^b	7,305	144	180	296	181.95 ^a	6,211	164	200
Comprimento de canela	69	24.47 ^b	1,183	22	27	296	27.18 ^a	1,347	23	31
Comprimento de quartela	69	12.23 ^b	0,77	10	14	296	13.36 ^a	0,918	11	16
Comprimento de garupa	69	55.17 ^b	2,376	50	60	296	64.16 ^a	3,633	54	74
Perímetro de Canela	69	18.81 ^b	0,753	17	20	296	20.34 ^a	0,914	18	23
Perímetro de Casco	69	39.75 ^b	2,316	36	45	296	42.36 ^a	2,256	36	48
Perímetro Torácico	69	180.20 ^b	7,838	154	200	296	192.44 ^a	6,922	174	213

Médias, na linha, seguidas por letras diferentes são distintas ($P < 0,05$) pelo teste Tukey. n = número de equinos medidos; C.V. coeficiente de variação; Min. – mínimo e Max. – máximo.

Na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha, a medida de desempenho IV apresentou herdabilidade de 0,17. As herdabilidades para medidas morfométricas variaram de 0,21 a 0,69 (Tabela 2). O perímetro torácico, altura à cernelha e perímetros de canela e de casco apresentaram as maiores herdabilidades (0,66; 0,69; 0,69 e 0,68, respectivamente). As menores estimativas de herdabilidade foram obtidas para comprimento de garupa e de corpo (0,20 e 0,21, respectivamente). Os comprimentos de membros dados pelo comprimento de quartela e de canela tiveram herdabilidades de 0,51 e 0,32, respectivamente.

Tabela 2. Herdabilidades e variâncias genéticas, de ambiente e fenotípicas para medidas morfométricas e de desempenho da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha obtidas por análise multivariada.

	σ^2_a	σ^2_e	σ^2_F	h^2
IV	10,84	53,50	64,34	0,17
PT	23,77	12,04	35,81	0,66
AC	11,01	5,236	16,24	0,68
CC	6,354	24,61	30,96	0,21
CGar	1,750	6,946	8,696	0,20
CCan	0,521	1,110	1,631	0,32
CQua	0,381	0,362	0,743	0,51
PCan	0,508	0,226	0,734	0,69
PCas	2,266	1,081	3,347	0,68

σ^2_a = Variância genética aditiva; σ^2_e - variância genética de ambiente; σ^2_F variância genética de ambiente; h^2 - herdabilidade. Índice de Velocidade (IV), altura à cernelha (AC), comprimento de corpo (CC), comprimento de garupa (CGar), comprimento de Canela (CCan), comprimento de quartela (CQua), perímetros torácico (PT), perímetro de canela (PCan) e perímetro de casco (PCas).

As estimativas de correlação genética entre medidas corporais variaram de 0,10 a 0,84 (Tabela 3). As correlações genéticas entre medidas corporais foram de moderadas a altas, e todas positivas. Entre membros observou-se, em sua maioria, correlações genéticas de moderadas a baixas, exceto pela correlação genética entre perímetros de casco e de canela (0,88). As correlações genéticas entre IV e características morfométricas não foram altas. Foram observadas correlações genéticas negativas moderadas entre comprimento de corpo e de garupa e IV (-0,44 e -0,30, respectivamente); e correlações genéticas positivas baixas e moderadas entre altura à cernelha e comprimento de quartela e IV (0,25 e 0,37, respectivamente). Os perímetros de canela e de casco, e altura à cernelha apresentaram alta correlação genética com perímetro torácico (0,70; 0,81 e 0,81, respectivamente). Os comprimentos de garupa e corporal apresentaram alta correlação genética (0,77). Altura à cernelha, além de alta correlação genética com perímetro torácico (0,81), apresentou alta correlação genética com comprimento de quartela (0,64).

Tabela 3. Correlações genéticas e de ambiente entre medidas de desempenho e morfométricas em equinos de corrida da raça Quarto de Milha.

	IV	PT	AC	CC	CGar	CCan	CQua	PCan	PCas
IV	-	0,12	0,25	-0,44	-0,30	-0,06	0,37	-0,18	-0,13
PT	0,01	-	0,81	0,53	0,55	0,14	0,45	0,70	0,81
AC	-0,08	-0,15	-	0,49	0,35	0,28	0,64	0,44	0,64
CC	0,12	0,42	0,45	-	0,77	0,54	0,20	0,72	0,74
CGar	0,06	0,36	0,28	0,31	-	0,23	0,10	0,59	0,72
CCan	0,08	0,07	0,44	0,09	-0,03	-	0,28	0,54	0,44
CQua	-0,21	-0,23	0,21	0,21	0,01	0,26	-	0,17	0,19
PCan	0,24	-0,18	0,38	0,09	0,05	-0,04	0,48	-	0,84
PCas	0,18	-0,56	-0,22	0,04	-0,10	-0,13	0,30	-0,26	-

Acima da diagonal encontram-se as correlações genéticas e abaixo da diagonal encontram-se as correlações de ambiente. Índice de Velocidade (IV), altura à cernelha (AC), comprimento de corpo (CC), comprimento de garupa (CGar), comprimento de Canela (CCan), comprimento de quartela (CQua), perímetros torácico (PT), perímetro de canela (PCan) e perímetro de casco (PCas).

As correlações fenotípicas entre as medidas morfométricas foram positivas e, em sua maioria baixas: variaram de zero a 0,54 (Tabela 4). Porém, algumas foram moderadas, entre elas as correlações de: comprimento corporal e altura à cernelha, perímetro torácico e comprimento de garupa (0,48; 0,43 e 0,50, respectivamente). Os perímetros de canela e de casco também apresentaram correlação moderada com perímetro torácico (0,46 e 0,52, respectivamente). Os perímetros de casco e canela também apresentaram correlação moderada de 0,54.

Tabela 4. Correlações fenotípicas entre medidas de desempenho e morfométricas em equinos de corrida da raça Quarto de Milha.

	IV	PT	AC	CC	CGar	CCan	CQua	PCan	PCas
IV	-	0,14	0,04	0,12	0,00	0,08	0,03	0,29	0,20
PT		-	0,26	0,43	0,13	0,09	0,12	0,46	0,52
AC			-	0,48	0,50	0,37	0,30	0,30	0,18
CC				-	0,42	0,23	0,27	0,34	0,37
CGar					-	0,15	0,08	0,14	0,00
CCan						-	0,32	0,23	0,11
CQua							-	0,30	0,20
PCan								-	0,54
PCas									-

Acima da diagonal se encontra as estimativas de correlação fenotípica. Índice de Velocidade (IV), altura à cernelha (AC), comprimento de corpo (CC), comprimento de garupa (CGar), comprimento de Canela (CCan), comprimento de quartela (CQua), perímetros torácico (PT), perímetro de canela (PCan) e perímetro de casco (PCas).

4 - Discussão

O teste de médias das medidas corporais entre linhagens mostrou a maior dimensão corporal da linhagem de corrida em relação à de trabalho, sugerindo que a intensa seleção na raça Quarto de Milha para provas curtas e de grande explosão muscular reflita também em aumento das dimensões corporais e possivelmente na proporção de massa muscular. Neste sentido, foi mostrado por Hill et al. (2010) que cavalos PSI com aptidão para provas curtas apresentaram massa corporal maior (2,94 kg/cm) que as encontradas em cavalos que correm distâncias longas (2,83 kg/cm).

Na raça Quarto de Milha não são realizadas mensurações morfométricas no processo de registro do indivíduo junto à associação de criadores, nem para a linhagem de corrida, nem para a de trabalho. Embora, o número de animais utilizados para obtenção de parâmetros genéticos neste estudo possa ser considerado pequeno diante de outras raças e espécies, sobretudo para análise multivariada e obtenção de correlações genéticas, o volume de dados aqui levantados são expressivos, visto o tamanho reduzido do rebanho da linhagem de corrida em relação à de trabalho e a dificuldade inerente a coleta de dados morfométricos de cavalos com grande valor agregado.

As estimativas de herdabilidade aqui obtidas para medidas morfométricas na linhagem de corrida foram altas. A altura à cernelha mostrou herdabilidade estimada de 0,66 e foi pouco superior aos valores encontrados nas raças Andaluz (0,58), Wielkpolski (0,57) e Pantaneira (0,61) (MOLINA et al., 1999; KAPRÓN et al., 2013; MISERANI et al., 2002); maior que observada na raça PSI (0,38) e semelhante a encontrada por Dolvik e Klemetsdal (2010) em Cold-blooded Trotters Norueguês (0,70).

Os perímetros de tórax e de canela apresentaram valores elevados de herdabilidade. O valor encontrado para perímetro torácico foi superior (0,68) ao encontrado por Molina et al. (1999) na raça Andaluz (0,48) e por Dolviki e Klemetsdal

(1999) na raça Cold-blooded Trotters Norueguesa (0,27); e inferior ao encontrado na raça pantaneira (0,83) por Miserani et al. (2002). A herdabilidade para perímetro de canela foi superior ao encontrado por Molina et al. (1999) na raça Andaluz (0,35), por Dolviki e Klemetsdal (1999) na raça Cold-blooded Trotters Norueguesa (0,53); Miserani et al. (2002) na raça Pantaneira (0,53) e por Kaprón et al. (2013) na raça Wielkpolski (0,42).

Obteve-se herdabilidade de 0,21 para comprimento de corpo, valor inferior ao encontrados por Miserani et al. (2002) e Molina et al. (1999) para as raças Pantaneiras e Andaluz (0,72 para ambas) e próxima a encontrada por Gharahveysi et al. (2008) na raça Árabe (0,27). O comprimento de garupa também apresentou baixa herdabilidade (0,20), inferior a encontrada por Miserani et al. (2002) para a raça Pantaneira (0,68). Para o comprimento de canela obteve-se herdabilidade de 0,32, superior a encontrada na raça Árabe (0,13) por Gharahveysi et al. (2008).

O IV foi analisado neste estudo por ser comumente utilizado como medida de desempenho na raça Quarto de Milha, por sua facilidade de interpretação por parte dos criadores e por estar disponível nos registros de corridas. A herdabilidade aqui obtida para IV (0,17) foi pouco superior as estimadas por Mota e Corrêa et al. (2004), em que diferentes distâncias apresentaram herdabilidades de 0,01 a 0,13 e semelhante às estimativas obtidas por Corrêa et al. (2007) (0,14 a 0,19). Entretanto, foi sugerido, devido à herdabilidades superiores (0,26 a 0,41) e alta correlação com IV (-0,99), que a utilização do tempo seria mais eficiente na seleção do que a utilização de IV ou *rank*, acarretando maior ganho genético para desempenho em corridas nesta raça no Brasil (CORRÊA et al., 2007; VILLELA et al., 2002). Outros efeitos não considerados por indisponibilidade ou estrutura dos dados aqui utilizados, foram empregados por outros autores tais como: efeito de origem do animal (nacional ou importado); e efeito de páreo ou corrida. Embora, aqui tenha se considerado diferentes fatores ambientais para ajuste do modelo e interações entre estes, ainda não considerados em outros estudos, não houve incremento ou perdas importantes nas estimativas de herdabilidade do IV.

As estimativas de correlação genética entre as medidas corporais e de desempenho, em sua maioria, foram baixas (-0,44 a 0,37). Ao contrário do que seria

esperado, a correlação genética entre IV e comprimento corporal foi negativa. Comumente criadores fazem uso desta medida para predizer animais de melhor desempenho. Espera-se assim que animais mais compridos obtenham maiores IVs em corridas. Uma provável explicação para o fato de essa correlação ser negativa se deve a escolha de cavalos mais compridos sem se guardar as devidas proporções com outras medidas corporais, como altura, por exemplo, promovendo queda no rendimento em competições. Para apoiar esta hipótese, nota-se que a correlação entre comprimento corporal e altura à cernelha é moderada (0,49), tendo a última alta correlação genética com perímetro torácico (0,81). Deste modo a escolha de animais mais compridos não implica necessariamente em incremento da altura, e a seleção de animais mais altos tem influência positiva sobre o peso do animal (reflete no aumento do perímetro torácico). Mediante estes resultados é possível inferir que a escolha de animais com boas proporções entre as medidas corporais seria mais eficiente do que utilização de medidas únicas como critério de escolha de cavalos atletas ou na seleção de reprodutores.

5 - Conclusões

A importância das medidas corporais em cavalos da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha é percebida durante o cotidiano de haras e de jóqueis clubes nacionais. Entretanto, pouco ou nenhum estudo até hoje analisou qual a relação destas medidas com a obtenção de melhores resultados em corridas. Por meio deste estudo, foi possível demonstrar que há pouca correlação genética entre características morfométricas e desempenho em corridas. Isto sugere que o melhor desempenho pode estar ligado principalmente ao treinamento, habilidade do jóquei, e características inerentes ao animal como: variações da fisiologia dos músculos esqueléticos e cardíacos; do sistema cardiorrespiratório; e do instinto de competição, este último relacionado ao temperamento e sistema nervoso.

6 - Referências:

- ABQM. **Associação brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha**. Disponível em: <http://www.abqm.com.br/>, 2013 acesso em: 12/5/2013.
- CHOWDHARY, B.P. **Equine Genomics**. John Wiley & Sons, Inc. 2013. 1 ed. 323p.
- DOLVIK, N.I.; KLEMETSDAL, G. **Conformational Traits of Norwegian Cold-blooded Trotters: Heritability and the Relationship with Performance**. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science, v.49, n.3, p.156-162, 2010
- EQUIBASE COMPANY. **Stats Central - Horse Profile**. 2013. Disponível em: <<http://www.equibase.com/profiles/Results.cfm?type=Horse&refno=8544675®istry=Q>>.
- EVANS J.W. **Horses: a guide to selection, care and enjoyment**. Freeman and Company, New York. 1996.
- GHARAHVEYSI, S.; KASHAN, N.E.J.; GERAMI, A.; TORSHIZI, R.V. **Estimation of genetic parameters on conformation traits of the Iranian Arab horse population**. Pakistan Journal of Biology Sciences. v.11, n.2, p.280-284, 2008.
- HILL, E. W.; MCGIVNEY, B. A.; GU J.; WHISTON, R.; MACHUGH D. E. **A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses**. BMC Genomics, v.11, n.552, p.1-10, 2010.
- HINTZ, R. **Genetics of performance in the horse**. Journal of Animal Science, v.51, n.582, 1980.
- LAGE, M.C.G.R.; BERGMANN, J.A.G.; PROCÓPIO, A.M.; PEREIRA, J.C.C; BIONDINI, J. **Associação entre medidas lineares e angulares de equinos da raça Mangalarga Marchador**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.4, 2009.
- KAPRÓN, M.; CZERNIAK, E.; ŁUKASZEWICZ, M.; DANIELEWICZ, A. **Genetic parameters of body conformation and performance traits of Wielkopolski horses registered in the successive volumes of the herdbook**. Archives Animal Breeding. v.56, n.12, p.127-136, 2013.
- KOENEN, E.P.C.; VAN VELDHUIZEN, A.E.; BRASCAMP, E.W. **Genetic parameters of linear scored conformation traits relation to dressage**

- and show-jumping performance Dutch Warmblood Riding Horse population.** *Livestock Production Science*, v.43, p.85-94, 1995.
- LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos no Brasil.** CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006
- MISERANI, M.G.; MCMANUS, C.; SANTOS, S.A.; SILVA, J.A.; MARIANTE, A.S.; ABREU, U.G.P.; MAZZA, M.C.; SERENO J.R.B. **HERITABILITY ESTIMATES FOR BIOMETRIC MEASURES OF THE PANTANEIRO HORSE.** *Arquivos Brasileiro de Zootecia*. V.51, p.107-112, 2002.
- MISZTAL, I. [2001]. **REMLF90 Manual.** Disponível em: <<http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/newprograms.html>>. Acesso em 11/10/2013.
- MOLINA, A; VALERA, M.; SANTOS, R. RODERO, A. **Genetic parameter of morphofunctional traits in andalusian horse.** *Livestock Production Science*. v.60, p.295-303, 1999.
- MOREIRA, P.R.; COSTA, M.D. DA; RUAS, J.R.M.; MARUCH, S.; RIBAS, W.F.G. **Medidas Morfométricas em Equinos da Raça Quarto de Milha – (2009).**
- CORRÊA, M.J.M.; MOTA, M.D.S. **Genetic evaluation of performance traits in Brazilian Quarter Horse.** *Journal of applied genetics*, v.48, n.2. p.145-151, 2007.
- MOTA, M.D.S.; PRADO, R.S.A.; FERREIRA, D.F.M.G. **Genetic parameters estimative for movement in mangalarga horse.** *Arch. Zootec.* 55 (210): 207-210. 2006.
- MOTA, M.D.S.; ABRAHAO, A.R.; OLIVEIRA, H.N. **Genetic and environmental parameters for racing time at different distances in Brazilian Thoroughbreds.** *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.122, p.393–399, 2005.
- MOTA, M.D.S.; OLIVEIRA, H.N.; FILHO, N.P.P. **Avaliação do crescimento em potros da raça Quarto de milha.** *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, v.11, n.1, 2010.
- MOTA, M.D.S.; OLIVEIRA H.N. **Crescimento em potros da raça Quarto de Milha.** VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008.
- SOBCZYNSKA, M. **Selected environmental factors influencing racing time, rank at finish and earnings by Thoroughbreds in Poland.** *Prace i Materiały Zootechniczne*, v.61, p.49–59, 2003.

- PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R.; AZEVEDO, P.C.N.; CABRA, G.C.; A, CORASSA. **Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de componentes principais.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.2, 2005.
- SAS. **SAS/STAT User's Guide**, Version 9.1, Volumes 1-7. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2004.
- THOMAS H.S. **The Horse Conformation Handbook.** Storey Publishing, North Adams, 2005.
- TORRES, A. D. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros equídeos.** São Paulo: Editora Nobel, 3ª ed., 992. 654p.
- VILELA, L.C.V. MOTA, M.D.S.; OLIVEIRA, H.N. **Genetics parameters of racing performance traits of Quarter Horses in Brazil.** Journal of Animal Breeding and Genetics, v.19, p.229–234, 2002.
- WALLIN, L.; STRANDBERG, E.; PHILIPSSON, J. **Genetic correlations between field test results of Swedish Warmblood Riding Horses as 4-year-olds and lifetime performance results in dressage and show jumping.** Livestock Production Science, v.82, p.61–71, 2003.