

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE *DMRT3*
g.22999655C>A (EquCab2.0) EM ASININOS E MUARES COM
MARÇA BATIDA OU PICADA**

MARIANA HERMAN

Botucatu-SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE *DMRT3*
g.22999655C>A (EquCab2.0) EM ASININOS E MUARES COM
MARÇA BATIDA OU PICADA**

MARIANA HERMAN

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Professor Associado José Paes
de Oliveira Filho

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Herman, Mariana.

Frequência alélica da variante DMRT3 g.22999655C>A (EquCab2.0) em asininos e muares com marcha batida ou picada / Mariana Herman. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501003

1. Equídeo. 2. Técnicas de genotipagem. 3. Marcha.

Palavras-chave: Equídeos; Genotipagem; Marcha.

MARIANA HERMAN

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE *DMRT3* g.22999655C>A
(EquCab2.0) EM ASININOS E MUARES COM MARCHA BATIDA
OU PICADA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. José Paes de Oliveira Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

Professor Dr. Cesar Erineudo Tavares de Araújo

Membro

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – Unileão – Juazeiro do Norte-CE

Professor Dr. Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

Professor Dr. Camila Dantas Malossi

Membro

Instituto de Biotecnologia – IBTEC/UNESP – Botucatu-SP.

Professor Dr. Campo Amor Vieira da Cunha Neto

Membro

Departamento de Medicina Veterinária - UFJF – Juiz de Fora-MG.

Data da Defesa: 11 de agosto de 2023.

***À minha filha Rafaella
e à todos aqueles que fizeram parte da minha jornada até a docência.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à energia sincrônica do universo que me permitiu iniciar e finalizar essa jornada, colocando em meu caminho as ferramentas e principalmente as pessoas que foram de suma importância para essa realização.

À minha filha Rafaella Herman Rolim, com você descobri o real significado da palavra motivação. Tudo sempre será por você e para você. Obrigada por estar ao meu lado, me compreender e me aceitar. Obrigada por me ensinar sobre o amor. Acima de tudo, obrigada por dividir a sua mãe com a profissão, não ter tido que escolher foi um enorme privilégio, afinal, ambas sabemos que eu escolheria você um milhão de vezes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Paes de Oliveira-Filho, pelo exemplo. Por toda compreensão e amparo em meio às tormentas da vida acadêmica, profissionais e pessoais. Levo desse relacionamento muito mais que um título de mestre ou doutora, algo que vai além do conhecimento técnico. Uma grande parte da professora e orientadora que me tornei, devo ao senhor e à sua paciência.

Agradeço à minha família, meus colegas de pós graduação, meus amigos e meus alunos pelos momentos vividos, pelas risadas, pelas trocas e pelo incentivo para persistir sempre.

Aos animais e à minha profissão, que junto com a minha filha, me trouxeram propósito para existir. Ser mãe, professora e ser médica veterinária me construíram como sou e sem isso uma enorme parte de mim se perderia.

Finalmente agradeço à FMVZ, Unesp de Botucatu e todas as pessoas que ali trabalham pelo acolhimento e aprendizado e à instituição FAPESP de fomento à pesquisa (2019/08143-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Lista de Siglas e Abreviações

Ct - Ciclo Threshold

DMRT3 - Doublesex and mab-3 related transcription factor 3

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

mRNA - RNA mensageiro

PB - Pares de base

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PCR - RFLP - Reação com enzima de restrição

RNA - Ácido Ribonucleico

SNP - Single nucleotide polymorphism

Lista de Figuras

- Figura 1.** Imagem representando asinino sendo usado para transporte de carga no interior do estado da Bahia. Tirada em julho de 2016.....06
- Figura 2.** Imagem representando uma égua com um muar ao pé.....06
- Figura 3.** Imagem de Jumento macho (asinino) utilizado comercialmente na produção de híbridos marchadores.....07
- Figura 4.** Imagem de Jumenta fêmea com jumento ao pé.....07
- Figura 5.** Jumento apresentado bípedes laterais na passada.....10
- Figura 6.** Jumenta apresentando movimento bipedal diagonalizado (A) seguido de tríplice apoio (B) evidenciado pela seta vermelha no membro em suspensão.....10
- Figura 7.** Sequência codificante do gene *DMRT3* obtida do *Equus caballus* isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 23, EquCab3.0 (GenBank™ NC_009166.3:2237839922378896).....19
- Figura 8.** Gel de agarose a 2% mostrando a corrida eletroforética de RFLP para genotipagem da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A.....21
- Figura 9.** Cromatogramas parciais mostrando os resultados do sequenciamento capilar de homozigoto *wild type* (A), heterozigoto (B) e homozigoto mutado (C) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A.....22

Lista de Tabelas

Tabela 1. *Primers* usados na amplificação da sequência codificante do gene *DMRT3* em jumentos (*Equus asinus*) e para detecção da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A.....18

Tabela 2. Distribuição dos genótipos (C/C, C/A e A/A) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A de acordo com o fenótipo (marchas batida ou picada) em 159 muares.....23

Tabela 3. Distribuição dos genótipos (C/C, C/A e A/A) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A de acordo com o fenótipo (marchas batida ou picada) em 203 jumentos.....24

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	03
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3 OBJETIVO.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
6 BIBLIOGRAFIA.....	27
CAPÍTULO 2 - Trabalho Científico	
Trabalho a ser publicado na revista “<i>Frontiers in Veterinary Science</i>”	32

HERMAN, M. **Frequência alélica da variante *DMRT3* g.22999655C>A (EquCab2.0) em asininos e muares com marcha batida ou picada.** Botucatu, 2023 64p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A variação do gene *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A está correlacionada com tipo de marcha nos equinos, o alelo selvagem-C e o mutante-A foram associados com a marcha batida e picada respectivamente. Jumentos e muares também apresentam marcha batida e picada, e esse estudo objetivou a determinação da frequência do alelo *DMRT3* SNP em jumentos e muares marchadores, além de determinar se o genótipo influenciaria diretamente o andamento nesses animais. Para tanto, foram genotipados 159 muares e 203 jumentos. Dentro da amostragem de muares 47% tinham genótipo CC e 53% CA. Já o genótipo CC foi predominante nos jumentos (97%). O genótipo AA não foi encontrado nos muares nem nos jumentos. Ambos os genótipos estavam distribuídos de maneira similar nos muares com o andamento marchado batido ou picado. Já o genótipo CC estava presente na maioria da amostragem independente do andamento, fosse ele picado ou batido, entre os asininos. Já o genótipo CA em asininos mostrou-se mais frequente em jumentos de andamento picado do que naqueles de marcha batida. Os relatos existentes desses três genótipos nas raças Mangalarga e Campolina, as duas principais raças usadas na produção de muares no Brasil, explicam a maior incidência do genótipo CA nos muares e a baixíssima incidência do alelo mutado nos asininos. Nos permitindo especular que o alelo mutado frequente nos muares foi herdado das éguas usadas nos cruzamentos com os jumentos. Finalmente, esses resultados sugerem que a marcha em questão não é influenciada pela mencionada variante e que demais genes e polimorfismos podem justificar essa característica em equídeos.

Palavras-chave: Equídeos, Brasil, marcha, genotipagem, PCR-RFLP.

HERMAN, M. **Allele frequency of *DMRT3* g.22999655C>A (EquCab2.0) variant in donkeys and mules with batida or picada gaits.** Botucatu, 2023 64p. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The *DMRT3*:g.22999655C>A SNP influences the gait types of horses, and the wild-C and mutant-A alleles have been associated with batida and picada gaits, respectively. Donkeys and mules also have batida or picada gaits, and this study aimed to determine the allele frequency of the *DMRT3* SNP in gaited donkeys and mules and to verify whether the genotype influences the type of gait in these animals. Thus, 159-mules and 203-donkeys were genotyped. Among the 159 mules assessed, 47% had a CC genotype, and 53% had a CA genotype. The CC genotype was predominant in the donkeys (97%). The AA genotype was not found in the mules or donkeys. The CC and CA genotypes were similarly distributed in the mule group with batida or picada gaits. The frequencies of the CC genotype in the donkeys were similar, regardless of whether the gait was batida or picada. However, the CA genotype was more frequent in donkeys with a picada gait than in those with a batida gait. The previous description of the three genotypes in Mangalarga and Campolina horses, which are the main breeds involved in the production of marching mules in Brazil, explains the higher percentage of CA mules and the very low presence of the mutated allele in donkeys, allowing us to speculate that the mutated allele was inherited from the mares used in the crosses with donkeys. In addition, these results suggest that the gait is not influenced by the aforementioned mutation and that other genes and polymorphisms may influence the trait in equids.

Keywords: Equids, gait, genotyping, PCR-RFLP, Brazil.

1. Introdução e Justificativa

A equideocultura, caracterizada pela produção de equinos, asininos e muares, está inserida dentro do setor agropecuário que em 2014 representava 23% do Produto Interno Bruto do País (CEPEA, 2014).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2012, o número do efetivo de Asininos e Muares no Brasil era de 902.716 e 1.221.756 cabeças respectivamente, no mesmo ano em que o efetivo de equinos era de 5.363.185 cabeças, representando uma parcela de aproximadamente 28% do número de equídeos no território nacional. Mercado esse que o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 2016 apontou como fonte de 3.500.000 empregos diretos e indiretos em mais de trinta segmentos.

Dentre os diversos setores que abastecem esse seguimento estão a criação e a participação em eventos (MAPA, 2016). No Brasil é cultural a criação de equídeos marchadores e a realização de provas de andamento (provas de marcha). Sabe-se ainda que o Brasil é o berço de origem de algumas raças de equinos marchadores, como o Mangalarga Marchador que é originário do sul de Minas Gerais (COSTA, 2005).

O Jumento Pêga e o Jumento Brasileiro também são raças nacionais de asininos e muares marchadores (TORRES, 1992). Entende-se que a utilização destes na produção dos muares e a expansão na criação, em especial da raça Pêga, está associada ao seu potencial genético pelo andamento marchado que agrega valor econômico ao equídeo (MOREIRA, 2016).

Foi estabelecido que o gene DMRT3 é um dos mais importantes genes na determinação do padrão de locomoção, relacionado com a coordenação dos membros torácicos e pélvicos (ANDERSSON ET AL., 2012; JÄDERKVIST ET AL., 2014). Estudos anteriores mostraram que há uma forte relação entre a qualidade da marcha e a variante do gene DMRT3 (ANTIKAS, 2005).

Nas raças marchadoras de equinos se correlacionou a variante deste, um polimorfismo único em nucleotídeo (22999655C>A) que provoca um códon de parada prematuro e resulta em uma proteína inacabada, com o tipo de andamento marchado (FONSECA ET AL., 2017)

Uma vez que a produção do híbrido descende da fêmea equina, possivelmente marchadora, e que a marcha de asininos e muares é classificada de maneira similar a dos equinos, este estudo objetivou avaliar a correlação entre a presença da variante acima citada e o tipo de andamento apresentado por asininos e muares.

O desenvolvimento de metodologia de genotipagem desta variante permitirá a sua utilização pelos criadores e profissionais na aquisição de animais e no direcionamento dos acasalamentos com intuito de selecionar animais com determinado tipo de marcha. Sendo assim, os resultados trarão benefícios para subsidiar futuros estudos epidemiológicos sobre o assunto além de apresentar aplicabilidade.

2. Revisão de Literatura

2.1 Asininos e Muares

Há seis mil anos, no início de sua domesticação os asininos (*Equus asinus*) foram utilizados como fonte de alimento, e menos de um milênio depois já estavam sendo utilizados para transporte de cargas pesadas. Contudo, sobretudo pela sua grande adaptabilidade a regiões áridas e por sua capacidade de carga, os asininos passaram a desempenhar um importante papel no transporte de cargas pesadas e na distribuição de alimentos em larga escala em territórios da África e antigo Egito (ROSSEL et al., 2008).

A utilização de equídeos revolucionou a produção agrícola e de alimentos, sendo os asininos um destaque em sua capacidade de carga, capazes de percorrer distâncias de até 40km/dia carregando até 65% de seus peso vivo, bem acima do cavalo com o equivalente de 45% de seu peso vivo em distâncias de até 30km/dia (CEPEA, 2006).

Os asininos chegaram ao Brasil trazidos pelos colonizadores por volta de 1534 (MARIANTE E CAVALCANTE, 2006) provavelmente originários de linhagens portuguesas, espanholas e africanas (TORRES E JARDIM, 1992). Destes se originaram as três raças de asininos nacionais: jumento Pêga, jumento Nacional e jumento Nordeste. (MARIANTE E CAVALCANTE, 2006).

Acredita-se que o jumento Brasileiro tenha origem no cruzamento de jumentos italianos e ibéricos (CARNEIRO, 2018) e a raça Pêga de origem essencialmente ibérica. Estudos mais recentes utilizando análise de DNA mitocondrial demonstram essa proximidade entre as duas raças citadas e seu distanciamento genético da raça jumento Nordeste (ALMEIDA, 2009).

Desde sua introdução no país, esses animais foram amplamente utilizados para produção e transporte no setor agropecuário, principalmente nas regiões semiáridas. E são considerados como parte da herança cultural, social, econômica e ecológica do Brasil e de toda América do Sul (CARNEIRO, 2018). Embora, o avanço da mecanização do campo tenha colocado em xeque a utilidade destes animais, sobretudo, nas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro (Figura 1). Entretanto, os jumentos das raças Pêga e Brasileiro, ainda mantêm certo destaque no Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, sobretudo no

acasalamento com equinos (*Equus caballus*) e a consequente produção de muares, principalmente burros e mulas (Oliveira, 2004; Ribeiro, 2017).



Figura 1. Imagem representando asinino sendo usado para transporte de carga no interior do estado da Bahia. Tirada em julho de 2016 (Fonte: Acervo Pessoal)

Além de fonte de alimento e utilização na agricultura e transporte os asininos também são largamente utilizados na produção de híbridos com os equinos (*Equus caballus*). Dentre eles podemos citar os muares (Figura 2) (burros e mulas) fruto do acasalamento entre a égua e o jumento (Figura 3) e os bardotos fruto do acasalamento da jumenta (Figura 4) com o garanhão equino (RIBEIRO, 2017).



Figura 2. Imagem representando uma égua com um muar ao pé. (Fonte: Acervo Pessoal)



Figura 3. Imagem de Jumento macho (asinino) utilizado comercialmente na produção de híbridos marchadores. (Fonte: Criatório Campeãs da Gameleira. Fotógrafa: Neide Weingrill)



Figura 4. Imagem de Jumenta fêmea com jumento ao pé. (Fonte: Acervo Pessoal)

A produção dos híbridos também é datada desde os tempos do antigo egito (RIBEIRO,2017) e têm destaque importante na história do país por serem o meio de transporte dos tropeiros, considerados desbravadores do Brasil, que interligavam as regiões sul e sudeste do país e sendo parte essencial do ciclo do ouro e do café na rota para exportação (GRUBER, 2016) além de sua importância como patrimônio cultural (ALMEIDA, 2009). No Brasil, o “ciclo do muar” teve início no século XVII (ELIS, 1950), época em que a economia da mineração dependia do transporte de animais de carga para fluxo constante (SUPRINYAK, 2006).

A principal característica que desponta desse cruzamento é a criação de um animal maior que o asinino porém ainda rústico e resistente (COSTA, 2005), com grande capacidade de carga e facilidade para caminhar em solos acidentados e íngremes (BORGES, 2016). Desta forma, se formou e consolidou-se um avançado sistema de comercialização destes animais (SUPRINYAK, 2006).

Com a expansão de estradas ferroviárias, durante o Brasil imperial, o mercado muar perdeu sua magnitude, porém a cultura do tropeiro é mantida até hoje. Longas cavalgadas são cada vez mais populares e a tendência de utilizar muares em detrimento de cavalos está cada vez maior. Os muares ganharam espaço na equideocultura, apresentaram resultados positivos em vários segmentos como tração, apartação, trabalho, provas morfológicas, provas funcionais, concurso de marcha, esportes e cavalgadas (Ellis, 1950).

A seleção dos asininos se dá em cima das características desejáveis para a finalidade a qual se propõe, o jumento Brasileiro e o jumento Pêga têm como principal finalidade a produção de muares de sela, sendo composto por animais sobretudo marchadores. Devido a maior exigência por animais de marcha confortável para percorrer longas distâncias e em baixa velocidade, a seleção desses muares de sela marchadores tem sido a partir do cruzamento de asininos marchadores das raças Pêga e Brasileira com equinos preferencialmente das raças Mangalarga e Campolina (Torres & Jardim, 1992).

De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM) o andamento marchado é caracterizado como um andamento natural, simétrico, a quatro tempos que alterna os bípedes laterais e diagonais intercalando com momentos de tríplice apoio. No

cavalo mangalarga machador já foram bem estabelecidos dois padrões de marcha, a marcha batida e a marcha picada (FONSECA, 2017), os mesmos padrões de marcha aceitos pela Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga em seu padrão da raça de asininos e muares. Sendo a principal característica da marcha picada a prevalência de bípodes laterais na passada, se assemelhando a andadura, e na marcha batida o predomínio da passada diagonalizada (PROCÓPIO, 2005).

Essa importância e ascensão dos asininos e muares marchadores pode ser notada uma vez que vêm sendo alvo da mídia devido ao valor agregado a elas. Já que as melhores mulas, também chamadas de mulas de patrão, podem ser estimadas em valores entre R\$20.000,00 e R\$100.000,00 (TV TEM -GLOBO, 2018). A crescente utilização desses animais também justificou a criação de uma revista derivada da revista Horse, chamada Muladeiros, que em janeiro de 2019 publicou a sua décima edição. Além de um evento dentro do parque de Barretos chamado Barretos Muar do Sertão que em 2018 teve seu quinto encontro, no qual foram realizadas provas de marcha e morfologia, além de cavalgada pela cidade, de acordo com o site dos Independentes que são responsáveis pelo evento.

2.2 Andamento

Os equídeos possuem andamentos dissociados e suas variações (Manso Filho et al., 2015). Segundo a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM) o andamento marchado é caracterizado como um andamento natural, simétrico, a quatro tempos que alterna os bípodes laterais e diagonais intercalando com momentos de tríple apoio. No Mangalarga Machador já foram bem estabelecidos dois padrões de marcha, a marcha batida e a marcha picada (Fonseca, 2017). Sendo estes, os mesmos padrões de marcha aceitos pela Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga. Sendo a principal característica da marcha picada a prevalência de bípodes laterais na passada (Figura 5), se assemelhando a andadura, e na marcha batida o predomínio da passada diagonalizada (Figura 6) (PROCÓPIO, 2005).



Figura 5. Jumento apresentado bípedes laterais na passada. (Fonte: acervo pessoal)



Figura 6. Jumenta apresentando movimento bipedal diagonalizado (A) seguido de tríplice apoio (B) evidenciado pela seta vermelha no membro em suspensão. (Fonte: acervo pessoal)

A marcha batida é definida por um andamento simétrico, marchada, de ritmo irregular a quatro tempos, com acoplamento diagonal e diagrama composto por alternância de apoios diagonais e quadrupedal intercalados por momentos de tríplice apoio, sem ocorrência de apoio lateral. Já a marcha picada é simétrica, marchada, de ritmo regular a quatro tempos, com diagrama composto por apoios alternados dos bípedes laterais e diagonais intercalados por momentos de tríplice apoio (Nicodemus & Clayton, 2003).

2.3 Gene DMRT3: “doublesex and mab-3 related transcription factor 3”

Estudos anteriores mostraram que há uma forte relação entre o tipo da marcha e a variante do gene DMRT3, em um estudo o autor Staiger tentou determinar a origem da variante, entretanto, não foi possível determiná-la com certeza (Antikas, 2015). Conclui-se de que a origem geográfica da variante do Gait keeper só pode ser esclarecida se os estudos do antigo DNA demonstrarem que as primeiras variante se tornaram abundantes em uma específica área geográfica. Em um estudo recente de DNA antigo mostrou que a variante estava presente na era medieval na Inglaterra e na Islândia e os autores argumentaram que a variante pode ter originado na Inglaterra (Wutke et al. 2016). Entretanto, uma vez que nesse estudo não foram incluídos cavalos antigos da Ásia para o período crítico de 0 a 800 dC, e apenas dois cavalos do sul da Europa do mesmo período, é totalmente possível que a variante tenha surgido em outro lugar e foi trazido para a Inglaterra. Por exemplo, Plínio, o Velho (23–79 dC), observou que os cavalos da Região das Astúrias, no norte de Espanha, moviam ambas as pernas o mesmo lado alternadamente e não trotavam (Viluma., 2012), sugerindo que a variante já estava presente na Europa 2000 antes de Cristo.

Andersson et al. (2012) demonstraram que o gene doublesex and mab-3 related transcription factors (DMRT3) desempenha papel fundamental na configuração dos circuitos espinhais, controlando assim o tamanho da passada em vertebrados. Os mesmos autores atribuem que a variante chr23:g.22999655C>A, neste gene, teve um importante efeito na diversificação do cavalo doméstico, assim como, atribuindo a caracterização dos tipos de marchas nas diferentes raças de equinos. A variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A causa um prematuro códon de parada (DMRT3_Ser301STOP) no codón 301 do gene DMRT3, conseqüentemente há a produção de uma proteína truncada, com a perda de 174 aminoácidos.

Portanto, o gene DMRT3 é um dos mais importantes genes relacionados ao “Gait keeper”, ou seja, relacionado com a coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a locomoção (Andersson et al., 2012; Jäderkvist et al., 2014). Sabe-se que a variante permite o andamento lateralizado, também havendo maior favorecimento da velocidade ao trote e inibição à transição do trote ao galope (Andersson et al., 2012). A genotipagem de 4.396 cavalos para

a variante no DMRT3, demonstrou que esta variante tem distribuição mundial e está presente em 68 das 141 raças de cavalos avaliadas no estudo, além disso, as raças com alta frequência do polimorfismo (>50%) ou eram raças marchadoras ou de “atrelagem” (Promerová et al., 2014).

Outros estudos também relacionaram a presença do genótipo AA com cavalos marchadores (Jäderkvist et al., 2014; Kristjansson et al., 2014; Promerová et al., 2014; Han et al., 2015; Novoa-Bravo, 2019). No Brasil, observou-se uma frequência alélica maior também em raças de marcha (Manso Filho et al., 2015). Por outro lado, Pereira et al. (2015) sugeriram que o alelo AA é um fator limitante para cavalos Quarto de Milha de corrida, corroborando com Ricard (2015) que também apontou o efeito negativo da variante nas características associadas a corrida.

O genótipo AA proporciona maior suporte à coordenação ipsilateral de membros, com efeito negativo ao movimento diagonal sincronizado, quando comparado ao genótipo CA (Kristjansson et al., 2014). Outro estudo avaliou cavalos marchadores islandeses em liberdade e concluiu-se que, apesar de cavalos wildtype (CC) poderem apresentar a marcha denominada tölt, cavalos afetados para a variante apresentavam maior facilidade de andamento lateralizado para realizar o tölt e apresentavam o movimento em maior frequência do que animais não afetados (Jäderkvist et al., 2015). Manso-Filho et al. (2015), evidenciaram a maior frequência do alelo C (85%), observado apenas em homozigose (23/27), em Mangalargas Marchadores que apresentavam marcha batida (diagonal), enquanto que, nos animais com marcha picada (lateral), o alelo A foi predominante (81%), sendo observado em heterozigose (17/26) e em homozigose (8/26) no Mangalargas Marchadores avaliados.

Patterson et al. (2015) também observaram o predomínio dos alelos C (97%) e A (65%) em Mangalargas Marchadores que apresentavam marchas batida e picada, respectivamente. Contudo, estes autores sugerem que a pressão de seleção pelo tipo de marcha tenha alterado a frequência alélica no Mangalarga Marchador. Sabe-se que há outros genes envolvidos com o padrão de marcha lateralizado (Patterson et al., 2015; Jäderkvist, 2017; Amano, 2018). Neste sentido, Fonseca et al. (2017) demonstraram pela primeira vez, em cavalos da raça Mangalarga Marchador, que, ao contrário da marcha picada

(lateralizada), a qual é controlada pelo alelo A do gene DMRT3, a marcha batida (diagonalizada) pode ser controlada por um grupo de genes.

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho é verificar a frequência alélica da variação no gene DMRT3, no qual há o *SNP* (*single nucleotide polymorphism*) de uma citosina por uma adenina (22999655C>A), em mulas e asininos marchadores no Brasil, e, caso haja relação, associar ao padrão de andamento (marcha batida ou picada).

4. Material e Métodos

Este projeto é desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária (LBMCV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Unesp. O LBMCV é equipado com todos os equipamentos necessários para realização do teste genético, com exceção do sequenciador 3.500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) ou similar, sendo necessário a contratação de serviços de terceiros para realização desta parte do experimento.

4.1 Comitê de ética

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da FMVZ/ Botucatu, SP. Aprovado em 26 de maio de 2020 (64/2020-CEUA-UNESP).

4.2 Seleção dos animais e coleta

Baseado no número de muares e asininos registrados na Associação Brasileira do Jumento Pêga (ABCJPêga) e usando a ferramenta Survey Monkey com uma margem de erro de 5% e um intervalo de confiança de 95%, um total de 203 jumentos (*Equus asinus*) e 159 mulas foram analisados nesse estudo. As amostras foram obtidas na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Todos os animais foram classificados quanto ao tipo de marcha, picada ou batida, por um mesmo avaliador experiente e de acordo com as regras da associação. O DNA genômico foi purificado dos bulbos de pêlo e armazenados a -80°C até processamento molecular.

4.3 Sequenciamento do gene DMRT3 dos jumentos

O objetivo foi sequenciar o DNA genômico correspondente ao mRNA do gene DMRT3 dos asininos. Para sequenciar os dois exons do gene DMRT3 do jumento, amostras de DNA de 20 jumentos machos (10 de marcha batida e 10 de marcha picada) foram utilizadas. Para incluir uma maior diversidade na análise os animais em questão não tinham filiação similar. Uma reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada utilizando primers específicos desenhados para amplificar a sequência codificante completa (dois exons) e as

junções intron-exon 5' e 3'. As reações foram padronizadas para um volume final de 30µL, contendo 2,5 µL do DNA, 15µL da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega™), 0,6µL de cada um dos primers e 11,3µL de água “nuclease-free”. A programação de termociclagem inicialmente testada para todas as reações de PCR será de 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 45 s, 60°C por 30s e 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos do PCR foram purificados e submetidos para o sequenciamento Sanger. As sequências obtidas e os eletroferogramas foram avaliados utilizando o software Geneious® (Biomatters®, Auckland, New Zealand) e foram comparados com os sequenciamento gênico do gene DMRT3 da espécie equina (*Equus caballus*) encontrada no GenBank™ NC_009166.3:22378399-22378896 e também à sequência XM_044756984.1 do gene previsto DRMT3 dos asininos (*Equus asinus*).

4.4 Genotipagem dos animais por PCR-RFLP

Nesse trabalho o gene DMRT3:g.22999655C>A SPN foi genotipado nas amostras de DNA de jumentos e muares usando enzimas de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism). Inicialmente foram utilizadas amostras de equinos Mangalarga Marchador para a variante DMRT3 pelo sequenciamento Sanger para identificar animais com os três diferentes genótipos (CC, CA e AA). O controle de cada genótipo foi utilizado para a padronização do PCR-RFLP.

O DNA foi purificado à partir do sangue ou bulbo de pelo de mulas e jumentos e armazenado à -20°C. O PCR (25 µL) foi realizado com 2.5 µL de DNA, 0.4 µM de cada kit de primers DMRT3_LBMCV_Ddel, 12.5 µL de PCR Master Mix (Promega, CA, USA), and 8.5 µL de água nuclease-free.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 45 s, 60°C por 60s e 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 5 min. Imediatamente após para rápida detecção do DMRT3_g.22999655C>A SNP os produtos de PCR foram clivados usando enzimas de restrição Ddel (Promega, CA, USA). As misturas de reação de RFLP continham 7.3 µL de água “nuclease-free”, 10 µL do produto de PCR, 0.2 µL de albumina bovina, 2 µL de 10X buffer de reação, e 5u de Ddel enzyme. As reações foram realizada à 37°C por 30 minutos. As reações foram realizadas a

37 °C for 30 min. E o produto analisado através de eletroforese em gel de agarose 2%. Em seguida, foi realizado o sequenciamento Sanger para o DMRT3 SNP para validar os resultados do PCR-RFLP usando produtos de PCR antes da clivagem.

4.5 Forma de análise dos resultados

Para a análise da prevalência das enfermidades uma população aleatória será utilizada, com a finalidade inicial de determinar a prevalência e suportar futuros estudos epidemiológicos. A frequência alélica e erro padrão serão calculados, respectivamente, através das contas:

$$\frac{\text{Número total de alelos mutados} / \text{Número total de animais}}{2}$$

$$\frac{2\sqrt{\text{Frequência do alelo} \times (1 - \text{frequência do alelo})}}{2 \times \text{Tamanho da amostra}}$$

5. Resultados e Discussão

5.1 Resultados

Avaliação da sequência codificante do gene DMRT3 dos jumentos

A sequência do mRNA do gene DMRT3 obtida do jumento Pêga foi depositada no GenBank™ (OP068195.1).

Ao total de 16 conjuntos de *primers* foram utilizados a fim de amplificar a sequência codificante do gene *DMRT3* do jumento, destes, três pares para amplificação do Exon 1 e outros três pares para amplificação do Exon 2 (Tabela 1). Utilizando estes pares de primers e o DNA sanguíneo de 30 jumentos (16 jumentos de marcha batida e 14 de marcha picada) obteve-se a sequência da região intrônica do gene *DMRT3* asinino e comparou-se com a sequência do gene *DMRT3* obtida do *Equus caballus* isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 23, EquCab3.0 (GenBank™ NC_009166.3:22378399-22378896).

Tabela 1. *Primers* usados na amplificação da sequência codificante do gene *DMRT3* em jumentos (*Equus asinus*) e para detecção da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Produto (pb¹)</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>
JP_DMRT3_EXON1_8	5'- AAAGACGGGTGCCGCAT -3' 5'- GTAGCGCTTGTGACCCTTGA -3'	315	64 °C
JP_DMRT3_EXON1_9	5'- GCTTCAAGGACTGCACCT -3' 5'- TTCTGCCCCGAAAGAACC -3'	479	62 °C
JP_DMRT3_EXON1_10	5'- CTGGCTCAAGGGTCACAAG -3' 5'- AGGCCAACTTCCGAAACC -3'	457	62 °C
JP_DMRT3_EXON2_3	5'- CATTTGCCAGTGACATAGTTTGG -3' 5'- CAAGCTGAAGGGCAGAGAAA -3'	454	59 °C
JP_DMRT3_EXON2_4	5'- CAGAGACCTTCAGCGACAAA -3' 5'- GTCATCCTCGGTGTAAAGAGAC -3'	866	62 °C

JP_DMRT3_EXON2_5	5'- GCAGACTCTAGTAACGTTGTCC -3'	666	62 °C
	5'- CCCAGCTTTCCCAAGACTATT -3'		
DMRT3_LBMCV_Ddel	5'- ACAGAGACCTTCAGCGACAA -3'	560	60 °C
	5'- GGGTTGGGGACAACGTTACT -3'		

¹Pares de base

Excluindo as sobreposições, as sequências obtidas somaram um total de 2.212 pares de bases (pb) (Figura 7), sendo compostos por: 135 pb do intrón prévio ao 5' - UTR; 498 pb do exón 1, sendo 38 pb da 5' - UTR e 460 pb da região codificante do exón 1; 164 pb da porção inicial do intrón posterior ao exón 1; 173 pb da porção final deste intrón; 1.241 pb do exón 2, sendo 965 pb da região codificante do exón 2 e 276 pb da região 3' - UTR do exón 2. Ao se comparar a sequência do gene *DMRT3* asinina com a equina observou-se a presença de cinco SNP (*single nucleotide polymorphism*) (Figura 1): c.627C>G, c.966A>C, c.1131T>C, c.1137A>G e c.1251G>A. Embora estes SNP tenham sido detectados na região codificante do exón 2, os mesmos não alteravam a sequência de aminoácidos previamente descrita nos equinos (p.209Val, p.322Ser, p.377Tre, p.379Ala, p.417Ser). Além disso, um SNP foi observado no exón 1 (A/G) 5 bases antes do códon de iniciação na região 5'- UTR. A sequência codificante do *DMRT3* asinina foi depositada no GenBank™ (OP068195.1).

```

aaagacgggtgccgcatctctggccagcccggagcgcacgcggccgcccggagctgcgggaccaaggac
cgcgccgtccggaggccgcccctgagcgcgcctcccagccccgccgtccagcgccccctggcccgctcC
CGCCGCCAGCCCGCCAGCTCTTCCGGGAGCTC(A/G)GGGCATGAACGGC
TACGGTTCCCCCTACCTGTACATGGGCGGCCCGGTGTCGCAGCCGCCGCG
GGCGCCCTTGACGCGCACGCCCAAGTGCGCGCGCTGCCGCAACCACGG
GGTGCTGTCCTGGCTCAAGGGTCACAAGCGCTACTGCCGCTTCAAGGACT
GCACCTGCGAGAAGTGCATCCTCATCATCGAGCGGCAGAGGGTCATGGCG
GCGCAGGTGGCGCTGCGCCGGCAGCAAGCTAACGAGAGCCTCGAGAGCC
TCATTCCCGACTCGCTGCGTGCTCTGCCCCGGCCCCCGCCGCCGGGGGA
CGCCGCCGCTGCCGCCCCGCAGCCGCCGCCACCTCGCAGCCGTCTCA
GCCGCCGCCGCCGAGCGTCCCGCCGCCGAGTTGGCTGCGGCTGCCGC

```

GCTGCGCTGGGCCACCGAGCCGCAGCCCGGGGCGCTGCAGGCGCAGCT
 CGCCAAGCCAGGtaagagcttccgcggggcgggcgccaggccaggcggtgggcgcaaaaacttc
 ggagctcttgctgcggctctgctgggaggcctggaggcaa**ggtttcggaagtggcct**ggccgggccttcctc
 cccaatccccggcaagcc**ggttctttccgggcagaa**xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
 xxx**caattgccagtacatagtttgg**atttttttttttaa
 ggcttgactatgttataacccactgagatgcatttctcctccaagaagcctgtgtggggctctcctgagcacat
 ctgttccctttatgcacaccaggaaaggattaacccagctgttctctgctttccagATTGACTGAGGAG
 CGACTTGGGGACGGCAGCTCCGCAGACAACA**CAGAGACCTTCAGCGACA**
AAGACACCGACCAGAGGAGCTCCCCAGATGTGGTGAAAAGTAAGGGCTGC
 TTCACCCCGGAGAGCCCCGAGGTCGTGTCTGTGGATGAAGGCGGGTATGC
 GGT**(C/G)**CAGAAGAACGGAGGCACCTCCGAGAGCCGCCCCGACAGTCCC
 AAGTACCACGGGGAACAGAATCACCTCCTGATCGAGGGCCCCCTCGGGGAC
 CG**TTTCTCTGCCCTTCAGCTTG**AAAGCCAACAGACCGCCCCCTGGAAGTGT
 TAAAAAAATCTTCCCCAACCAAGCCACGGTGCTGGAGCTCATCCTGA
 AGGGCTGTGGGGGCGACCTGGTGAGCGCCGTGGAGGTCCTCCTCTCCAG
 CCGCTCCTCGGCCTCGGCCGCCGACCGAACT**TCG**GCAGAGCCCGAGAGC
 CTCGTGTTGCCCTCCAACGGGCACATCTTTGAACACACCTTGAGCTC**(A/C)**
 TACCCCATCTCCTCTTCCAAATGGTCCGTGGGATCGGCCTTCAGGGTCCCA
 GACACGTTGAGGTTTTCC**GCAGACTCTAGTAACGTTGTCC**CCAACCCCTTG
 GCCGTGCCCCTGCAGCATCCTTTCCCCAGCCGCCCCGGTACCCTCTGAT
 GCTGAGGAATAC**(T/C)**TTGGC**(A/G)**AGAAACCAGTCGAGCCCCTTCCTGCC
 CAATGATGTCACCCTGTGGAACACCATGACGCTGCAGCAGCAGTACCAGCT
 GAGGTCCCAGTACGTCAGCCCTTTCCCCGGGAGCTC**(G/A)**CCCAGCGTCT
 TCAGAAGCTCGCCTGTCCTTCCCACGCGCGCCCCCGAAGACCCTCGGATC
 TCCATCCCTGACGATGGGTGTCCGATTGTGTCAAAGCA**GTCTCTTTACACC**
GAGGATGACTATGACGAGAGGTCCGACTCCTCAGACTCTAGAATACTCAAC
 ACATCATCT**TA**AAGTGGTACCGGGTGGCTGGTGACCAGGTGACATTTTCTG
 TGCATTTGAACTCTGACCCCTGCCCTCCCCAGGAGAGGCCTCGTCCTGT
 GTATACCCTTTCTTCTGTTTGACAAAGTGAAGTGTGCTTGATTCTATACCTTA
 GCAATAAAAACATAACTTATTTAATTTCTTGCACTTCACTGGAAAATGCCAAAT
 AGCTCTGCTCTGCGGCTTTAGTGCTGAATGTTTATTGTAAAAGAGAGTCTAA
 TGCTAAG**AATAGTCTTGGGAAAGCTGGG**

Figura 7. Sequência codificante do gene *DMRT3* obtida do *Equus caballus* isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 23, EquCab3.0 (GenBank™ NC_009166.3:22378399-22378896). As sequências intrônicas e exônicas são representadas por letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente. Os códons ATG (start códon) e TAA (stop códon) estão grafados em negrito, enquanto que, a variante *DMRT3_chr23:g.22999655C>A* em vermelho. Sequências dos *primers* estão destacadas em cores: em amarelo, EXON1_8; em vermelho, EXON1_9; em azul, EXON1_10; em verde, EXON2_3; em rosa, EXON2_4; em cinza, EXON2_5. A sequência de letras “x” se refere a parte do intrón 2 que não foi sequenciada. As diferenças entre as sequências do gene *DMRT3* asinina e do *Equus caballus* estão em negrito e em parênteses.

Uma vez que os três genótipos (CC, C/A e AA) já haviam sido descritos em equinos da raça Mangalarga Marchador, optou-se pela utilização de amostras de DNA de equinos dessa raça para a padronização da RFLP. A padronização da RFLP com a enzima de restrição Ddel possibilitou a identificação por eletroforese dos três genótipos (C/C, banda de 560 pb; C/A, bandas de 560, 395 e 165 pb; e A/A, bandas de 395 e 165 pb) (Figura 8). Esses genótipos foram confirmados por sequenciamento de Sanger (Figura 9). A genotipagem de todas as amostras foi realizada por RFLP e confirmadas por sequenciamento de Sanger.

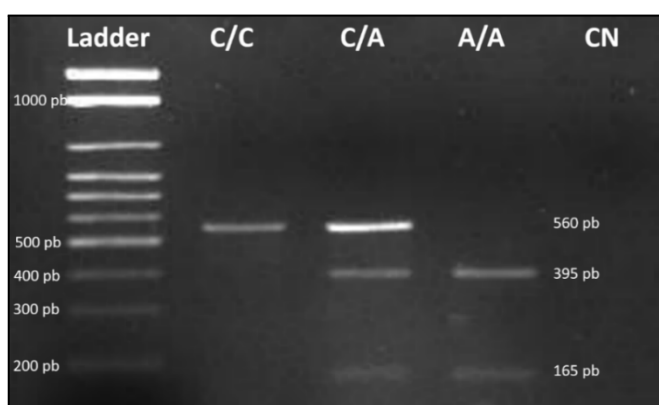


Figura 8. Gel de agarose a 2% mostrando a corrida eletroforética de RFLP para genotipagem da variante *DMRT3_chr23:g.22999655C>A*. Observa-se, Low Ladder de 100 pb; C/C, muar homozigoto *wild type* com a presença de

uma única banda de 560 pares de bases (pb); C/A, muar heterozigoto com a presença de três bandas de 560, 395 e 165 pb); A/A, equino homozigoto para variante com a presença de duas bandas com 395 e 165 pb); CN, controle negativo (amostra sem DNA) sem a visualização de bandas eletroforéticas.

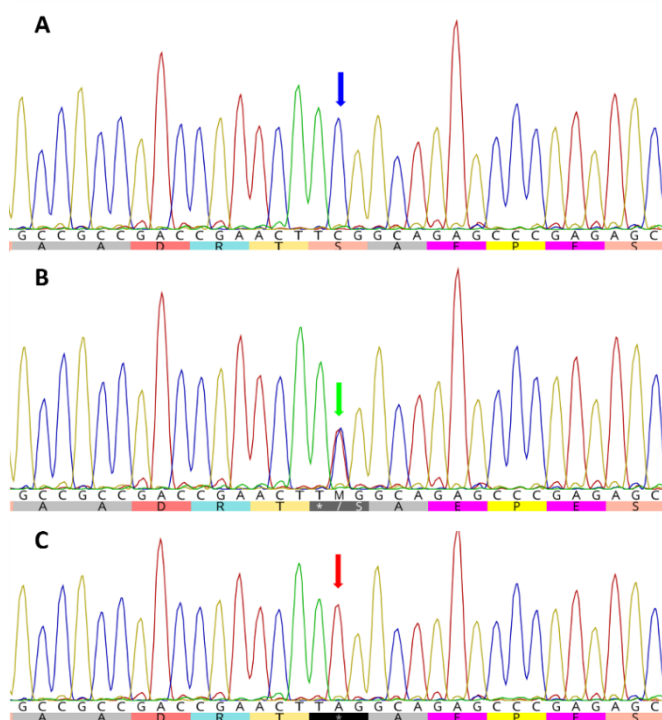


Figura 9. Cromatogramas parciais mostrando os resultados do sequenciamento capilar de homozigoto *wild type* (A), heterozigoto (B) e homozigoto mutado (C) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A. Alelo *wild type* (citosina) e o respectivo aminoácido serina (seta azul), pico duplo (citosina e adenina) e o respectivo aminoácido serina ou o stop códon (seta verde), alelo mutado (adenina) e o stop códon (TAG) (seta vermelha). Imagem obtida usando o Genious® 10.0 software (Biomartters Ltd., Auckland, Nova Zelândia).

Foram selecionados 159 muares, os quais foram classificados segundo o andamento batido (n = 99) e picado (n = 60). Os genótipos C/C e C/A foram observados em 47% (75/159) e 53% (84/159) dos muares, respectivamente, enquanto que o genótipo A/A não foi evidenciado em nenhum dos animais avaliados. Portanto, a frequência do alelo A no grupo de muares avaliados no presente estudo, independentemente da marcha, foi de $0,264 \pm 0,025$.

Os 203 jumentos foram classificados segundo o andamento batido ($n = 101$) e picado ($n = 102$). O genótipo C/C foi predominante observado nos jumentos avaliados neste estudo (97%, 196/203), enquanto que sete (3%, 7/203) jumentos eram heterozigotos (C/A) para variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A. Nenhum dos jumentos avaliados era homozigoto mutado (A/A) (Tabela 3). Portanto, a frequência do alelo A no grupo de asininos avaliados no presente estudo, independentemente da marcha, foi de $0,017 \pm 0,006$.

Ao se avaliar o genótipo de acordo com o fenótipo dos animais, observou-se que os genótipos C/C e C/A foram identificados em 99 e 1%, respectivamente, entre os animais de marcha batida; e 94% e 6%, respectivamente, entre os animais classificados com a marcha picada (Tabela 2). Ao se avaliar a distribuição dos genótipos CC e CA de acordo com a marcha, observou-se o predomínio do genótipo CC tanto no grupo de jumentos com marcha batida ($P < 0,001$) quanto no de marcha picada ($P < 0,001$). Além disso, a presença do genótipo CC foi igual ($P = 0,905$) independentemente do tipo da marcha, batida (100/196, 51%) ou picada (96/196, 49%). Diferentemente, o genótipo CA estava mais presente ($P < 0,001$) em jumentos com a marcha picada (6/7, 86%) do que aqueles de marcha batida (1/7, 14%).

Tabela 2: Distribuição dos genótipos (C/C, C/A e A/A) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A de acordo com o fenótipo (marchas batida ou picada) em 159 muares.

Genótipos	Tipo de Marcha		Total
	Batida	Picada	
C/C	46 (46%)	29 (48%)	75 (47%)
C/A	53 (54%)	31 (52%)	84 (53%)
A/A	ND*	ND*	
Total	99	60	159

*ND, não detectado.

Tabela 3: Distribuição dos genótipos (C/C, C/A e A/A) da variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A de acordo com o fenótipo (marchas batida ou picada) em 203 jumentos.

Genótipos	Tipo de Marcha		Total
	Batida	Picada	
C/C	100 (99%)	96 (94%)	196 (97%)
C/A	1 (1%)	6 (6%)	7 (3%)
A/A	ND	ND	ND
Total	101	102	203

*ND, não detectado.

5.2 Discussão

As sequências do gene DMRT3 asinina e equina são análogas, sendo observadas nos asininos cinco SNP silenciosos em região codificante (c.627C>G, c.966A>C, c.1131T>C, c.1137A>G e c.1251G>A), ou seja, estes SNP não alteram a sequência de aminoácidos previamente descrita nos equinos (p.209Val, p.322Ser, p.377Tre, p.379Ala, p.417Ser). A sequência do *Equus caballus* (GenBankTM NC_009166.3:22378399-22378896) utilizada na comparação com a sequência do *Equus asinus* foi obtida de forma automática e, portanto, não se pode dizer que os SNP observados no presente estudo também não ocorram nos equinos.

Desde que a variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A foi relacionada com a coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a locomoção (Andersson et al., 2012; Jäderkvist et al., 2014), alguns autores padronizaram a genotipagem de equinos para a referida variante utilizando diferentes técnicas, e.g., TaqMan SNP (Andersson et al., 2012; Jäderkvist et al., 2014; Promerová et al., 2014), sequenciamento gênico (Manso Filho et al., 2015) e por RFLP (Patterson et al., 2015; Pereira et al., 2016; Regatieri et al., 2016). Assim como estudos prévios (Patterson et al., 2015; Pereira et al., 2016; Regatieri et al., 2016) que utilizaram a enzima de restrição Ddel, o presente estudo padronizou

a PCR-RFLP em muares utilizando sets específicos de primers e a enzima Ddel. No presente estudo, essa metodologia foi capaz de diferenciar os genótipos avaliados e foi validada pelo sequenciamento de Sanger, portanto, é um teste barato e rápido que pode ser empregado para avaliar a presença de alelos mutados em equídeos e assim propiciar a orientação dos acasalamentos a fim de favorecer a escolha do andamento desejado.

Os equídeos possuem andamentos dissociados e suas variações (picada, batida, de centro ou intermediária e trotada) (Manso Filho et al., 2015). Utilizando as normas da ABCJPêga, os muares e asininos do presente estudo foram agrupados de acordo com o seu padrão de andamento natural, em marcha batida ou picada, ou seja, não foi levada em consideração a interferência do cavaleiro ou domador no andamento, uma vez que, os muares podem se adaptar ao tipo de marcha exigida pelo cavaleiro com treinamento.

Devido a maior exigência por animais de marcha confortável para percorrer longas distâncias e em baixa velocidade, a seleção dos muares de sela marchadores tem sido a partir do cruzamento de asininos marchadores das raças Pêga e Brasileira com equinos preferencialmente das raças Mangalarga e Campolina (Torres & Jardim, 1992). Embora o genótipo AA proporcione maior suporte à coordenação ipsilateral de membros, com efeito negativo ao movimento diagonal sincronizado, quando comparado ao genótipo CA ou CC (Kristjansson et al., 2014) o que beneficiaria o tipo de marcha picada, no presente estudo não se observou a presença de muares e nem asininos homozigotos AA. Além disso, o genótipo CA foi observado em baixa prevalência no grupo de asininos (3%, 7/203) avaliados no presente estudo, sobretudo, quando se compara com a frequência deste genótipo nos muares (53%, 84/159). Diante disso, a frequência do alelo A no grupo de muares e jumentos, independentemente da marcha, foi de $0,264 \pm 0,025$ e $0,017 \pm 0,006$, respectivamente.

Diferentemente do que foi observado no presente estudo, onde os genótipos C/C e C/A encontravam-se distribuídos de forma similar tanto no grupo de mulas com marcha batida ($P = 0,484$) quanto no grupo com marcha picada ($P = 0,749$), Manso-Filho et al. (2015) evidenciaram apenas o genótipo C/C em Mangalargas Marchadores que apresentavam marcha batida, enquanto que, nos animais com marcha picada, o alelo A foi predominante, sendo observado

heterozigose e em homozigose. Patterson et al. (2015) também observaram o predomínio dos alelos C e A em Mangalargas Marchadores que apresentavam marchas batida e picada, respectivamente. O número de muares genotipados no presente estudo (159) foi superior aos números de cavalos genotipados para a variante DMRT3_chr23:g.22999655C>A por Manso-Filho et al. (2015) (n=105) e Patterson et al. (2015) (n=81) e o resultado obtido é que a referida variação não tem relação com a marcha nos muares. Embora tenha sido observado o predomínio do genótipo CC tanto no grupo de jumentos com marcha batida ($P < 0,001$) e picada ($P < 0,001$), o genótipo CA estava mais presente ($P < 0,001$) em jumentos com a marcha picada (6/7, 86%) do que aqueles de marcha batida (1/7, 14%). Sendo assim, mesmo ressalvando-se a ausência de jumentos AA e o baixo número de jumentos CA, a maior presença desse genótipo nos jumentos com a marcha picada corrobora com os achados de Manso-Filho et al. (2015) e Patterson et al. (2015) em cavalos Mangalargas Marchadores.

O fato de os três genótipos já terem sido descritos no Mangalarga e Campolina (Manso-Filho et al., 2015; Patterson et al., 2015), principais raças envolvidas na produção comercial de mulas no Brasil, somado a maior porcentagem de muares heterozigotos observados nos muares e a baixa presença do alelo mutado na população de jumentos avaliada no presente estudo, permitem especular que o alelo variante observado em heterozigose nestas mulas foi herdado, sobretudo, da égua utilizada no cruzamento com os jumentos. Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que, o tipo de marcha, picada ou batida, não foi influenciado pela referida variante no grupo de muares ou asininos avaliados. Por fim, a genotipagem padronizada por RFLP no presente estudo foi capaz de diferenciar os genótipos avaliados e, portanto, é além de ser um teste barato e rápido poderá ser empregada na orientação dos acasalamentos, a fim de favorecer a escolha do andamento desejado.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, L.D. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 83p. Dissertação de Mestrado.
- ALMEIDA, S.A.P. Economia tropeira paranaense formação de uma memória coletiva: aproveitamento para turismo. **Anais eletrônicos: IV Congresso Internacional de História**. p.3923-3936, 2009. DOI:10.4025/4cih.pphuem.314 Disponível em <<http://www.pph.uem.br/cih/anais/trabalho.php?tid=314>> Acesso em: 8 de março de 2019.
- AMANO, T; ONOGI, A; YAMADA, F; KAWAI, M; SHIRAI, K; UEDA, J. Genome-wide association mapping and examination of possible maternal effect for the pace trait of horses. **Animal genetics**. v.5. p.461-463. 2018.
- ANDERSSON, L.S.; LARHAMMAR, M.; MEMIC, F.; WOOTZ, H.; SCHWOCHOW, D.; RUBIN, C. J.; PATRA, K.; ARNASON, T.; WELLBRING, L.; HJÄLM, G.; IMSLAND, F. Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. **Nature**, v.488, n.7413, p.642. 2012.
- ANTIKAAS, T.G. The honor to be buried with horses from Mycenaean Nemea to Macedonian Vergina. In Les équidés dans le monde méditerranéen antique: **Actes du colloque organisé par l'école française d'Athènes, le centre Camille Jullian et l'UMR 5140 du CNRS**, Athènes, 26-28 pp. 143-152. 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE JUMENTO PÊGA. Estatutos e Regulamentos. Disponível em <<https://abcjpega.org.br/estatuto-e-regulamentos/>> Acesso em: 8 de fevereiro de 2019.
- Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM). Padrão da Raça. Disponível em <<http://leia.abccmm.org.br/portal/regulamentos/padraodaraca/>> Acesso em: 11/03/2019
- BORGES, L.A. Mulas em movimento. O mercado interno brasileiro e o negócio de tropas, primeira metade do século XIX. **Anos 90**, v.23, n.44, p.207-230, 2016.

CARNEIRO, G. F., CAVALCANTE LUCENA, J. E., & DE OLIVEIRA BARROS, L. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.65, p.106–110, 2018.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. *Perspectivas para o Agronegócio em 2015*. CEPEA. Piracicaba, dezembro/2014. Disponível em:

<http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_Perspectivas%20Agroneg2015_relatorio.pdf> Acesso em: 29/09/2015

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; RESENDE, A.S.C.; FONSECA, C.G.; FARIA, F.J. C. Estudo da subdivisão genética da raça Mangalarga Marchador. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.272-280. 2005.

ELLIS JUNIOR, A. A economia paulista no século XVIII. Ed. Academia Paulista de Letras: São Paulo, 1979.

FONSECA, M.G. Mangalarga Marchador: estudo morfométrico, cinemático e genético da marcha batida e picada. **Tese de Doutorado em Clínica Médica Veterinária**. UNESP. Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2018.

FONSECA, M.G.; DE CAMARGO FERRAZ, G.; LAGE, J.; PEREIRA, G.L.; CURI RA. A genome-wide association study reveals differences in the genetic mechanism of control of the two gait patterns of the Brazilian Mangalarga Marchador breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 64-67. 2017.

GLOBO, Programa Nosso Campo, TV TEM. **Mulas de elite são valiosas e movimentam pecuária no interior de São Paulo**. Publicado dia 04/03/2018 07h43. Disponível em

<<https://g1.globo.com/sp/sorocaba-jundiai/nosso-campo/noticia/mulas-de-elite-sao-valiosas-e-movimentam-pecuaria-no-interior-de-sao-paulo.ghtml>> Acesso em 10/03/2019.

GRUBER, T.; CARVALHO, A.I.; MARTINS I.C. entre mio-mios e embiras: homens e animais no caminho das tropas. **Ateliê de História UEPG**, V.4, N.1, P. 21-43, 2016.

HAN, H; ZENG, L; DANG, R; LAN, X; CHEN, H; LEI, C. The DMRT 3 gene mutation in Chinese horse breeds. *Animal genetics*. v.46, n.3, p.341-342. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro, V.40, p1-71, 2012. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2012_v40_br.pdf

> Acesso em: 16/03/2019

JÄDERKVIST, K.; ANDERSSON, L.S.; JOHANSSON, A.M.; ÁRNASON, T.; MIKKO, S.; ERIKSSON, S.; LINDGREN, G. The *DMRT3* 'Gait keeper' mutation affects performance of Nordic and Standardbred trotters. **Journal of animal science**, v.92, n.10, p.4279-4286. 2014.

KRISTJANSSON, T; BJORNSDOTTIR, S; SIGURDSSON, A; ANDERSSON, L.S; LINDGREN, G; HELYAR, S.J; KLONOWSKI, A.M; ARNASON, T. The effect of the 'Gait keeper' mutation in the *DMRT3* gene on gaiting ability in Icelandic horses. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. v.6, p.415-425. 2014.

MANSO, F.; COTHRAN, E.G.; JURAS, R.; GOMES, F.; DA SILVA, N.M.; DA SILVA, G.B.; FERREIRA, L.M.; ABREU, J.M.; MANSO, H.D. *DMRT3* mutant allele in batida and picada gaited horses from Campolina and Mangalarga Marchador breeds. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.18, n.1, p.58-64. 2015.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa Sede/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274 p.

NICODEMUS, M.C; CLAYTON, H.M. Temporal variables of four-beat, stepping gaits of gaited horses. **Applied Animal Behaviour Science**. v.80, n.2, p.133-42, 2003.

OLIVEIRA, V.B. Uma visão técnica e pedagógica sobre os muares. Tese de Mestrado em Ciências de Educação Agrícola. UFRRJ. Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. 2004.

PATTERSON, L.; STAIGER, E.A.; BROOKS, A. *DMRT 3* is associated with gait type in Mangalarga Marchador horses, but does not control gait ability. **Animal Genetics**, v.46, n.2, p.213-215. 2015.

PEREIRA, G.L.; MATTEIS, R.; REGITANO, L.C.; CHARDULO, L.A.; CURI, R.A. *MSTN*, *CKM*, and *DMRT3* gene variants in different lines of quarter horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.39, p.33-37. 2016.

PROMEROVÁ, M.; ANDERSSON, L.S.; JURAS, R.; PENEDO, M.C.; REISSMANN, M.; TOZAKI, T.; BELLONE, R.; DUNNER, S.; HOŘÍN, P.; IMSLAND, F.; Mikko, S.; Modrý, D.; Roed, K.H.; Schwochow, D.; Vega-Pla, J.L.;

- Mehrabani-Yeganeh, H.; Yousefi-Mashouf, N.; G Cothran, E.; Lindgren, G.; Andersson, L. Worldwide frequency distribution of the 'G ait keeper' mutation in the DMRT 3 gene. **Animal Genetics**, v.45, n.2, p.274-282. 2014.
- RIBEIRO, P.; COIMBRA, R.; ROCHA, E.; GONÇALVES, G.; ALVES, G.; EUSTÁQUIO, V.; CASTRO, L. Principais diferenças fenotípicas e genéticas entre bardotos e muares. **Sinapse Múltipla**, v.6, n.2, p.301-305, 2017.
- RICARD, A.; Does heterozygosity at the DMRT3 gene make French trotters better racers? **Genetics Selection Evolution**, v.47, n.1, p.10. 2015.
- ROSSEL, S.; MARSHAL, F.; PETERS, J.; PILGRAM, T.; ADAMS, M.D.; O'CONNOR, D. Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.10, p. 3715–3720, 2008.
- SUPRINYAK, C.E. Tropas conduzidas pela Barreira de Itapetininga e o comportamento do mercado de muares 1854-1869. **História econômica & história de empresas IX**, v.2, p. 49-72. 2006.
- TORRES, A.P.; JARDIM, W.R. **Criação do cavalo e de outros equinos**. 3ª edição. São Paulo: Nobel. 1992. 654p.

CAPÍTULO 2

***DMRT3* allele frequencies in batida- and picada-gaited donkeys and mules in Brazil**

Mariana Herman¹, Amanda Manara Caceres¹, Ana Luísa Holanda de Albuquerque¹, Raíssa Oliveira Leite¹, César Erineudo Tavares de Araújo², Diego José Zanzarini Delfiol³, Rogério Abdallah Curi¹, Alexandre Secorun Borges¹, José Paes de Oliveira-Filho^{1*}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil

²Centro Universitário Doutor Leão Sampaio (Unileão), Juazeiro do Norte, Brazil.

³Federal University of Uberlandia, Brazil.

*** Correspondence:**

José Paes de Oliveira-Filho

jose.oliveira-filho@unesp.br

Keywords: Equids, gait, genotyping, PCR-RFLP, Brazil.

ABSTRACT: The *DMRT3*:g.22999655C>A SNP influences the gait types of horses, and the reference-C and non-reference-A alleles have been associated with batida and picada gaits, respectively. Donkeys and mules also have batida or picada gaits, and this study aimed to determine the allele frequency of this SNP in gaited donkeys and mules and to verify whether the genotype influences the type of gait. Thus, 159-mules and 203-donkeys were genotyped. Among the 159 mules assessed, 47% had a CC genotype, and 53% had a CA genotype. The CC genotype was predominant in the donkeys (97%). The AA genotype was not found in the mules or donkeys. The CC and CA genotypes were similarly distributed in the mule group with batida or picada gaits. The frequencies of the CC genotype in the donkeys were similar, regardless of whether the gait was batida or picada. However, the CA genotype was more frequent in donkeys with a picada gait than in those with a batida gait. The previous description of the three genotypes in Mangalarga and Campolina horses, which are the main breeds involved in the production of marching mules in Brazil, explains the higher percentage of CA mules and the very low presence of the mutated allele in donkeys, allowing us to speculate that the mutated allele was inherited from the mares used in the crosses with donkeys. In addition, these results suggest that the gait is not influenced by the aforementioned mutation and that other genes and polymorphisms may influence the trait in equids.

Number of words: 3036 words (excluding abstract, section files, figure and table captions, funding statement, acknowledgements, and references in the bibliography)

Number of figures: 1 figure

Number of tables: 2 tables

INTRODUCTION

DMRT3 (*doublesex and mab-3 related transcription factor 3*) is one of the main genes involved in vertebrate coordination of the front and hind limbs and control of stride length during locomotion. A nonsense mutation/polymorphism (g.22999655C>A, EquCab2.0) in the *DMRT3* gene, which is responsible for the stop codon (*DMRT3*_Ser301STOP) and which results in the production of a truncated protein that

is 174 amino acids shorter than the wild-type protein, had an important effect on domestic horse diversification by determining the gait phenotypes in different horse breeds (1). Regarding worldwide frequency distribution, this variant has been identified in 68 of the 141 genotyped horse breeds, with the highest frequency of polymorphism observed in breeds of horses either classified as gaited or as bred for harness racing (2). Compared with the CA genotype, the AA genotype reinforces the coordination of ipsilateral legs, with a subsequent negative effect on the synchronized movement of contralaterally diagonal legs (3). Several studies have associated the presence of two mutated alleles (AA) with gaited horses (2-6). The AA genotype also has a negative effect on characteristics associated with running (7, 8).

Two gait types, batida or picada, have been established by the Mangalarga Marchador horses (MM) and the Pêga Donkey Breeders' associations (9). In the batida gait, the horse's contralaterally diagonal hooves touch the ground in coupled steps more frequently than occurs with the lateral pairs of hooves, although moments of triple-limb support exist; in contrast, in the picada gait, the steps are more often laterally coupled, rather than being coupled in a contralaterally diagonal manner, and all without loss of triple support moments (10). Studies carried out on the Brazilian MM revealed a predominance of C and A alleles in horses that presented batida or picada gaits, respectively (10-12).

In Brazil, the production of gaited mules, which are obtained mainly from the crossing of gaited donkeys of the Pêga and Brasileira breeds with horses of the MM and Campolina breeds (13), has been a prominent activity in agribusiness, primarily for the commercial value of these animals that increasingly gain esteem in gait and morphological-functional sports contests. Since the gait of donkeys and mules can also be classified as batida or picada and consequently may be associated with the *DMRT3* nonsense variant, this study aims to determine the allele frequencies of the *DMRT3* SNP in gaited donkeys and mules and to verify whether the genotype influences the type of gait—batida or picada—in these animals.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval statement

This study was approved on May 26, 2020 by the Institutional Animal Care and Use Committee (64/2020—CEUA—UNESP).

Sample collection

The sample size was calculated using OpenEpi software (version 3.0.1) and based on the number of donkeys (30,020) and mules (10,010) registered in the Associação Brasileira dos Criadores de Jumento Pêga (ABCJPÊGA), an estimated prevalence of *DMRT3* SNP of 5%, and a 5% margin of error. The results were a minimal sample size of 126 donkeys and 113 mules with and a 99% confidence interval. However, a total of 203 Pêga male donkeys (*Equus asinus*) and 159 female mules were assessed in this study. Samples were obtained from 38 farms in the Southeast and Midwest regions of Brazil. The sampling was performed under a strict confidentiality agreement to ensure the anonymity of establishments, owners and animals. The researchers tried to collect as many samples as possible according to the availability of the owners during the visits to the farms. All animals were classified by gait type, picada or batida, by an experienced technician and according to the ABCJPÊGA's rules. Genomic DNA was purified from hair bulbs (from the mane or tail) or blood samples and was stored at -80 °C until molecular processing.

Sequencing of the donkey *DMRT3* gene

We aimed to sequence the genomic DNA region corresponding to the mRNA of the donkey *DMRT3* gene. To sequence the two exons from the donkey *DMRT3* gene, DNA samples from 20 Pêga male donkeys (10 with batida and 10 with picada gaits) were used. To include greater genome diversity in the analysis, the selected animals were unrelated to each other. A polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers designed to amplify the complete coding *DMRT3* sequence (two exons) and the 5' and 3' intron–exon junctions (Supplementary Table 1). PCR (25 µL) contained 2.5 µL (200 ng) of template DNA, 0.4 µM of each primer, 12.5 µL of PCR Master Mix (Promega, CA, USA), and 8.5 µL of nuclease-free water. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, then annealing at 59–64 °C for 60 s and extension at 72 °C for 60 s, with a final extension at 72 °C for 5 min.

The PCR products were purified and subjected to Sanger sequencing. The obtained sequences and the electropherograms were examined using Geneious® software (Biomatters®, Auckland, New Zealand) and were compared with the *Equus caballus* (horse) *DMRT3* coding sequence (GenBank™ NC_009166.3:22378399–22378896) and the *Equus asinus* *DMRT3* coding predicted sequence (XM_044756984.1).

DMRT3 genotyping using PCR-RFLP analysis

In this study, the *DMRT3*:g.22999655C>A SNP was genotyped in donkey and mules DNA samples using the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Initially, DNA samples from MM horses were genotyped for the nonsense variant *DMRT3* by Sanger sequencing to identify the animals of the different genotypes (CC, CA, and AA). The control samples for each genotype were used for the standardized PCR-RFLP method.

The DNA was purified from blood or hair bulb samples collected from mules and donkeys and stored at -20 °C. The PCR (25 µL) was performed with 2.5 µL (200 ng) of template DNA, 0.4 µM of each *DMRT3_LBMCV_DdeI* set primer, 12.5 µL of PCR Master Mix (Promega, CA, USA), and 8.5 µL of nuclease-free water. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, then annealing at 60 °C for 60 s and extension at 72 °C for 60 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. Immediately afterward, for rapid detection of the *DMRT3*_g.22999655C>A SNP, the PCR products were cleaved using *DdeI* restriction enzymes (Promega, CA, USA). The RFLP reaction mixtures contained 7.3 µL of nuclease-free water, 10 µL of PCR product, 0.2 µL of bovine serum albumin, 2 µL of 10X reaction buffer, and 5u of *DdeI* enzyme. Reactions were carried out at 37 °C for 30 min. The PCR amplicons and the products of restriction enzyme cleavage were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis stained with GelRed® Nucleic Acid Stain (Millipore®, Darmstadt, German). Sanger sequencing was performed for the *DMRT3* SNP to validate the PCR-RFLP results using PCR products before being cleaved.

Data analysis

The allele frequency and standard error for each group were estimated using the following equations:

$$\text{allele frequency} = \frac{\text{total number of mutant alleles} / \text{total number of animals}}{2} \quad \text{and}$$

$$\text{standard error} = \sqrt{\frac{\text{allele frequency} * (1 - \text{allele frequency})}{2 * \text{sample size}}}. \quad \text{All calculations were}$$

performed using a spreadsheet program as previously described (14). The relationship between genotypes and gait types was analyzed using the chi-square test. Statistical significance was determined by a $P \leq 0.05$, and the data analysis was performed using GraphPad Prism 7 software. The chi-square test was also used to test whether alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within the donkeys' group, and the alleles were considered to exhibit disequilibrium if $P < 0.05$.

Limitations of the study

The main limitations of the study were the impossibility of genotyping the mares used in the production of the mules evaluated in the study and obtaining a reliable genealogy of these mules. It was not possible to access the genealogy data of the donkeys; therefore, unfortunately, we were not able to calculate the degree of inbreeding of the studied animals. Additionally, the lack of analysis of the *DMRT3* gene coding sequence in the mules may be seen as a limitation of this study; however, it was not the objective of the study, since these infertile hybrid animals cannot be used in breeding programs, and genotyping these animals would therefore not be a useful tool in the design of mating schemes between donkeys and mares.

RESULTS

The *DMRT3* mRNA sequence obtained from the Pêga donkey DNA samples was deposited in GenBank™ (OP068195.1). Of the 1,718 bases sequenced, 38 bases were from the 5' UTR, 1,425 bases were from the open reading frame (ORF; 460 bases in exon 1 and 965 bases in exon 2), and 255 bases were from the 3' UTR. This sequence was 99.94% and 99.59% identical to that of the *Equus caballus DMRT3* mRNA (NM_001317265.1) and to that of the predicted *Equus asinus DMRT3* mRNA (XM_044756984.1), respectively. Six synonymous SNPs were observed in the donkey *DMRT3 coding* sequence when compared to that of the horse sequence, i.e., c.396 (C or T), p.132ALA; c.627 (C or G), p.209Val; c.966 (A or C), p.322Ser; c.1131 (T or C), p.377Tre; c.1137 (A or G), p.379Ala; and c.1251 (G or A), p.417Ser. One SNP was also observed in exon 1 (A/G) five bases before the start codon in the 5' UTR. Furthermore, the predicted donkey *DMRT3* sequence has two synonymous SNPs (c.315T>C, p.105Ala; c.336C>G, p.112Pro) and three deleted bases (c.359_361delCGC) relative to the horse and Pêga donkey *DMRT3 coding* sequences. The three protein sequences were 100% identical except for the deleted codon, p.Pro120del, in the predicted donkey *DMRT3* sequence. In addition, no changes were observed in the intronic region after exon 1 (146 bases) or before exon 2 (150 bases).

Since the three genotypes had already been described in MM horses, it was decided to use DNA samples from horses of this breed to standardize the PCR-RFLP method. Using the restriction enzyme *DdeI*, it was possible to use electrophoresis to identify the three genotypes, i.e., wild-type homozygous (CC, 560-bp band), mutant homozygous (AA, 395- and 165-bp bands) and heterozygous animals (CA, 560-, 395- and 165-bp bands). These genotypes were confirmed by Sanger sequencing (Figure 1).

Of the 159 mules assessed, 47% (75/159) were homozygous wild-type (CC), and 53% (84/159) were heterozygous (CA) animals. The CC genotype was predominant in the Pêga donkeys (97%, 196/203), while seven (3%, 7/203) donkeys were identified as heterozygous (CA) for the *DMRT3* SNP. The A/A genotype was not found in the mules or donkeys of this study (Table 1). Therefore, the C allele was the most frequent allele in the group of mules and donkeys evaluated (0.736 ± 0.025 , 0.983 ± 0.006), while the frequencies of the A allele in the group of mules and donkeys evaluated, regardless of

gait, were 0.264 (± 0.025) and 0.017 (± 0.006), respectively. The allele distribution of the *DMRT3* SNP in the donkey group was in HWE equilibrium ($P = 0.879$).

The mules and donkeys were grouped according to their gait type, with the result that 99 mules were classified as having the batida gait and 60 as having the picada gait, while 101 donkeys were classified as having the batida gait and 102 as having the picada gait (Table 2). Assessing the mules according to the type of gait, it was observed that the CC and CA genotypes were similarly distributed in the mule group with the batida gait ($P = 0.484$) and in the mule group with the picada gait ($P = 0.749$). When verifying the distribution of the CC and CA genotypes in the donkeys according to their gait phenotypes, it was found that the CC genotype was more predominant than the CA genotype in both the batida gait group ($P < 0.001$) and the picada gait group ($P < 0.001$). In addition, the presence of the CC genotype was statistically similar ($P = 0.905$) regardless of the type of gait, batida (100/196, 51%) or picada (96/196, 49%). However, the CA genotype was statistically more associated ($P < 0.001$) with donkeys that had the picada gait (6/7, 86%) than with those that had the batida gait (1/7, 14%).

DISCUSSION

The donkey (GenBank™ OP068195.1) and horse *DMRT3* gene sequences are orthologs, given that in the donkey sequence five synonymous SNPs in the coding region (c.627C>G, c.966A>C, c.1131T>C, c.1137A>G and c.1251G> A) were observed; that is, these SNPs reflect no changes from the amino acid sequence previously described in horses (p.209Val, p.322Ser, p.377Tre, p.379Ala, p.417Ser). The *Equus caballus* sequence (GenBank™ NC_009166.3:22378399-22378896) used in this study for the comparison with the *Equus asinus* sequence was obtained through automated prediction, and it, therefore, cannot be said that the SNPs observed in the present study do not also occur in horses. The C allele of the synonymous SNP (c.966A>C, p.322Ser) was also observed in the French (Poitu) donkey and in two breeds of Indian donkeys (Spiti and Leh breeds); on the other hand, the Halari donkeys had only the A allele (15). The A allele was observed in heterozygosis in a single donkey (1/30) of the group of Pega donkeys evaluated in the present study.

As the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A SNP was related to the coordination of forelimbs and pelvic limbs during locomotion (1, 4), some authors have standardized the genotyping of horses for the aforementioned polymorphism using different techniques, e.g., TaqMan SNP probe (1, 2, 4), PCR-sequencing (11) and PCR-RFLP (9, 10, 16). As with previous studies (9, 10, 16) that employed the restriction enzyme *DdeI*, the methods of the present study entailed standardizing the PCR-RFLP in mules using specific sets of primers and the *DdeI* enzyme. This methodology enabled differentiation of the evaluated genotypes and was validated by Sanger sequencing, demonstrating its utility as an inexpensive and fast test that can be used to evaluate the presence of mutated alleles in mules and donkeys.

Members of the Equidae family have different gaits and variations of these gaits (e.g., picada, batida, and the gaits of different gaited horse breeds) (11). Using the ABCJPêga rules, the mules and donkeys of the present study were grouped according to their natural batida or picada gait pattern, which is to say that the interference of the human rider or trainer with the gait was not taken into account, since mules may adapt to the type of gait required by the trained rider. Due to the greater demand for animals with a comfortable gait for traveling long distances and at low speeds, the selection of marching saddle mules has been based on the crossing of marching donkeys of the Pêga and Brasileira breeds with horses, preferably those of the Mangalarga Marchador and Campolina breeds (13). Although the AA genotype, when compared to the CA or CC

genotype, provides greater support for ipsilateral limb coordination, with a negative effect on synchronized laterally diagonal movement (3), which would be of benefit to the picada gait type, in the present study we did not observe the presence of mutant homozygous AA mules or donkeys. In addition, the CA genotype was observed at a low prevalence in the group of donkeys (3%, 7/203) evaluated in the present study, especially when compared to the frequency of this genotype in mules (53%, 84/159). Overall, the frequency of allele A in the groups of mules and donkeys, regardless of gait, was 0.264 ± 0.025 and 0.017 ± 0.006 , respectively. Several studies have also linked the presence of the AA genotype with gait horses (2-6). However, similarly to the present study, when the presence of *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A was evaluated in a group of donkeys in India (15), only animals homozygous for the reference allele C were found. Although the number of donkeys was small, these authors suggested that this SNP has been equally distributed among the breeds of donkeys in India.

In contrast to what was observed in the present study, where the CC and CA genotypes were similarly distributed both in the group of mules with batida gait ($P = 0.484$) and in the group with picada gait ($P = 0.749$), Manso-Filho et al. (11) showed only the CC genotype in MM that presented a batida gait, while in animals with a picada gait, the A allele was predominant, with heterozygosity and homozygosity being observed. Others authors (11-12) also observed the predominance of the C and A alleles in the MM that presented batida and picada gaits, respectively. Although the number of mules genotyped in the present study (159) was higher than the number of horses genotyped for the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A by Manso-Filho et al. (11) ($n=105$) and Patterson et al. (10) ($n=81$), it is difficult to rule out this variant being related to gait in mules. Although the predominance of the CC genotype was observed both in the group of donkeys with the batida ($P < 0.001$) and picada ($P < 0.001$) gaits, the CA genotype was more frequently observed ($P < 0.001$) in donkeys with the picada gait (6/7, 86%) than in those with the batida gait (1/7, 14%). Therefore, even considering the exception of the absence of AA donkeys and the low number of CA donkeys, the greater presence of this genotype in the donkeys with the picada gait is in agreement with other studies in MM horses (10-12).

The fact that the three genotypes have already been described in Mangalarga and Campolina horses (10-12), the main horse breeds involved in the commercial production of mules in Brazil, in combination with the higher percentage of heterozygous mules and the low frequency of the mutated allele in the donkey population evaluated in this study, allows us to speculate that the mutated allele observed in heterozygosity in the mules in this study was inherited, above all, from the mare used in the cross with the donkeys. In addition, contrary to our expectations, the type of gait, picada or batida, was not influenced by the *DMRT3* SNP in the group of mules or donkeys evaluated. In addition, in Mangalarga horses, a study has shown that unlike what happens in picada gait (lateralized), which is influenced by the A allele, batida gait (diagonalized) may be controlled by another group of genes (9). Therefore, future studies can be carried out to investigate genes that might be associated with the gait type in mules and donkeys, such as genes that are associated with differences in metabolic changes in horses with a batida or picada gait after gait exercise (17).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article, and further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH, CETA, and JPO-F contributed to the conception and design of the study. MH, AMC, CETA, DJZD, and JPO-F contributed to the sample collection. AMC, ALHA, ROL, CETA, and JPO-F contributed to sample processing. MH, ASB, RAC and JPO-F contributed to writing the first drafts of the manuscript. JPO-F contributed to directing the project. All authors contributed to the manuscript revision and have read and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), Grant Numbers 19/15076-9 and 19/08143-1.

REFERENCES

1. Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ, et al. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature*. (2012) 488:642-6. doi: 10.1038/nature11399.
2. Promerová M, Andersson LS, Juras R, Penedo MC, Reissmann M, Tozaki T, et al. Worldwide frequency distribution of the ‘Gait keeper’ mutation in the DMRT3 gene. *Anim Genet*. (2014) 45:274-82. doi: 10.1111/age.12120
3. Kristjansson T, Bjornsdottir S, Sigurdsson A, Andersson LS, Lindgren G, Helyar SJ, et al. The effect of the ‘Gait keeper’ mutation in the DMRT3 gene on gaiting ability in Icelandic horses. *J Anim Breed Genet*. (2014) 6:415-25. doi: 10.1111/jbg.12112.
4. Jäderkvist K, Andersson LS, Johansson AM, Árnason T, Mikko S, Eriksson S, et al. The DMRT3 ‘Gait keeper’ mutation affects performance of Nordic and Standardbred trotters. *J Anim Sci*. (2014) 92:4279-86. doi: 10.2527/jas.2014-7803.
5. Han H, Zeng L, Dang R, Lan X, Chen H, Lei C. The DMRT3 gene mutation in Chinese horse breeds. *Anim Genet*. (2015) 46:341-2. doi: 10.1111/age.12292.
6. Novoa-Bravo M, Jäderkvist Fegraeus K, Rhodin M, Strand E, Garcia LF, Lindgren G. Selection on the Colombian paso horse’s gaits has produced kinematic differences partly explained by the DMRT3 gene. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0202584. doi: 10.1371/journal.pone.0202584.
7. Ricard A. Does heterozygosity at the DMRT3 gene make French trotters better racers? *Genet Sel Evol*. (2015) 47(1):1-16. doi: 10.1186/s12711-015-0095-7.
8. Pereira GL, Matteis R, Regitano LC, Chardulo LA, Curi RA. MSTN, CKM, and DMRT3 gene variants in different lines of quarter horses. *J Equine Vet Sci*. (2016) 39:33-7. doi: 10.1016/j.jevs.2015.09.001.
9. Fonseca MG, De Camargo Ferraz G, Lage J, Pereira GL, Curi RA. A genome-wide association study reveals differences in the genetic mechanism of control of the two gait patterns of the Brazilian Mangalarga Marchador breed. *J Equine Veterinary Science*. (2017), v.53, p.64-67. 2017.
10. Patterson L, Staiger EA, Brooks A. DMRT 3 is associated with gait type in Mangalarga Marchador horses, but does not control gait ability. *Anim Genet*. (2015) 46:213-215. doi: 10.1111/age.12273
11. Manso F, Cothran EG, Juras R, Gomes F, Da Silva NM, Da Silva GB, et al. DMRT3 mutant allele in batida and picada gaited horses from Campolina and Mangalarga Marchador breeds. *Cienc. Vet Trop*. (2015) 18:58-64.
12. Bussiman FO, Santos BA, Silva BCA, Perez BC, Pereira GL, Chardulo LAL, et al. Allelic and genotypic frequencies of the DMRT3 gene in the Brazilian horse breed

- Mangalarga Marchador and their association with types of gait. *Genet Mol Res.* (2019) 18:gmr18217. doi: 10.4238/gmr18217.
13. Torres AP, Jardim WR. (1992). Criação do cavalo e de outros equinos. São Paulo: Nobel.
 14. Delfiol DJ, Oliveira-Filho JP, Badial PR, Battazza A, Araujo-Junior JP, Borges AS. Estimation of the allele frequency of type 1 polysaccharide storage myopathy and malignant hyperthermia in Quarter Horses in Brazil. *J Equine Vet Sci.* (2018) 70:38-41. doi: 10.1016/j.jevs.2018.06.015
 - Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ, et al. Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature.* (2012) 488:642-6. doi: 10.1038/nature11399.
 15. Bhardwaj A, Nayan V, Legha RA, Bhattacharya TK, Pal Y, Giri SK. (2023) Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in *DMRT3* gene in Indian horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) populations. *Anim Biotechnol.* 1-11. 2023. doi: 10.1080/10495398.2023.2206866.
 16. Regatieri IC, Eberth JE, Sarver F, Lear TL, Bailey E. Comparison of *DMRT3* genotypes among American Saddlebred horses with reference to gait. *Anim Genet.* (2016) 47:603-5. doi: 10.1111/age.12458.
 17. Bussiman FO, Santos BA, Silva BCA, Mamani GM., Grigoletto L, Pereira GL.; et al. Genome-wide association study: Understanding the genetic basis of the gait type in Brazilian Mangalarga Marchador horses, a preliminary study. *Livest Sci.* (2020) 231:103867. doi: 10.1016/j.livsci.2019.103867.

Figure Captions

Figure 1. Partial chromatogram showing capillary sequencing results for *wild-type* homozygous (A), heterozygous (B) and mutated homozygous (C) EquCab2.0 *DMRT3_chr23:g.22999655C>A* variant. Wild-type allele (cytosine) and the respective amino acid serine (blue arrow); double peaks (cytosine/guanine) and the related amino acid stop codon or serine (green arrow), mutant allele (adenine) and TAG stop codon (red arrow). Images were obtained using Geneious® 10.0 software (Biomartters Ltd., Auckland, New Zealand).

Figure Captions

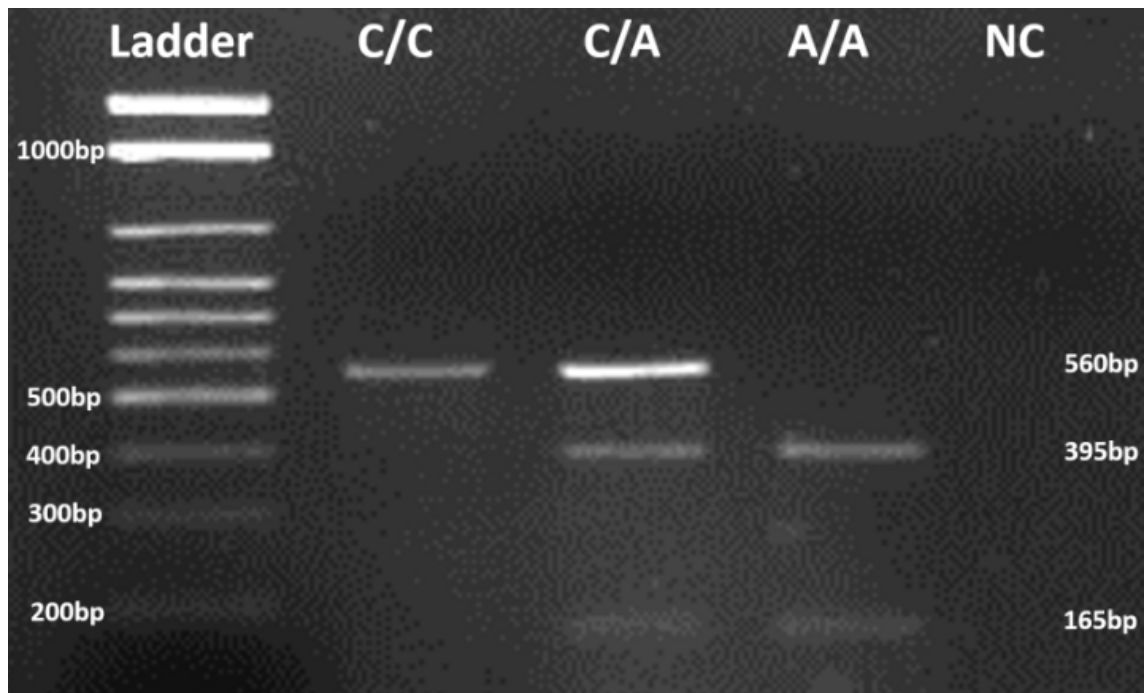


Figure 1. Agarose gel (2%) showing PCR-RFLP results for the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A variant. Note, Low ladder of 100 bp; CC, homozygous wild-type mule (single band of 560 bp); CA, heterozygous mule (three bands of 560, 395 and 165 bp); AA, homozygous horse (two bands of 395 and 165 bp); NC, negative control (sample without DNA) without visualization of electrophoretic bands.

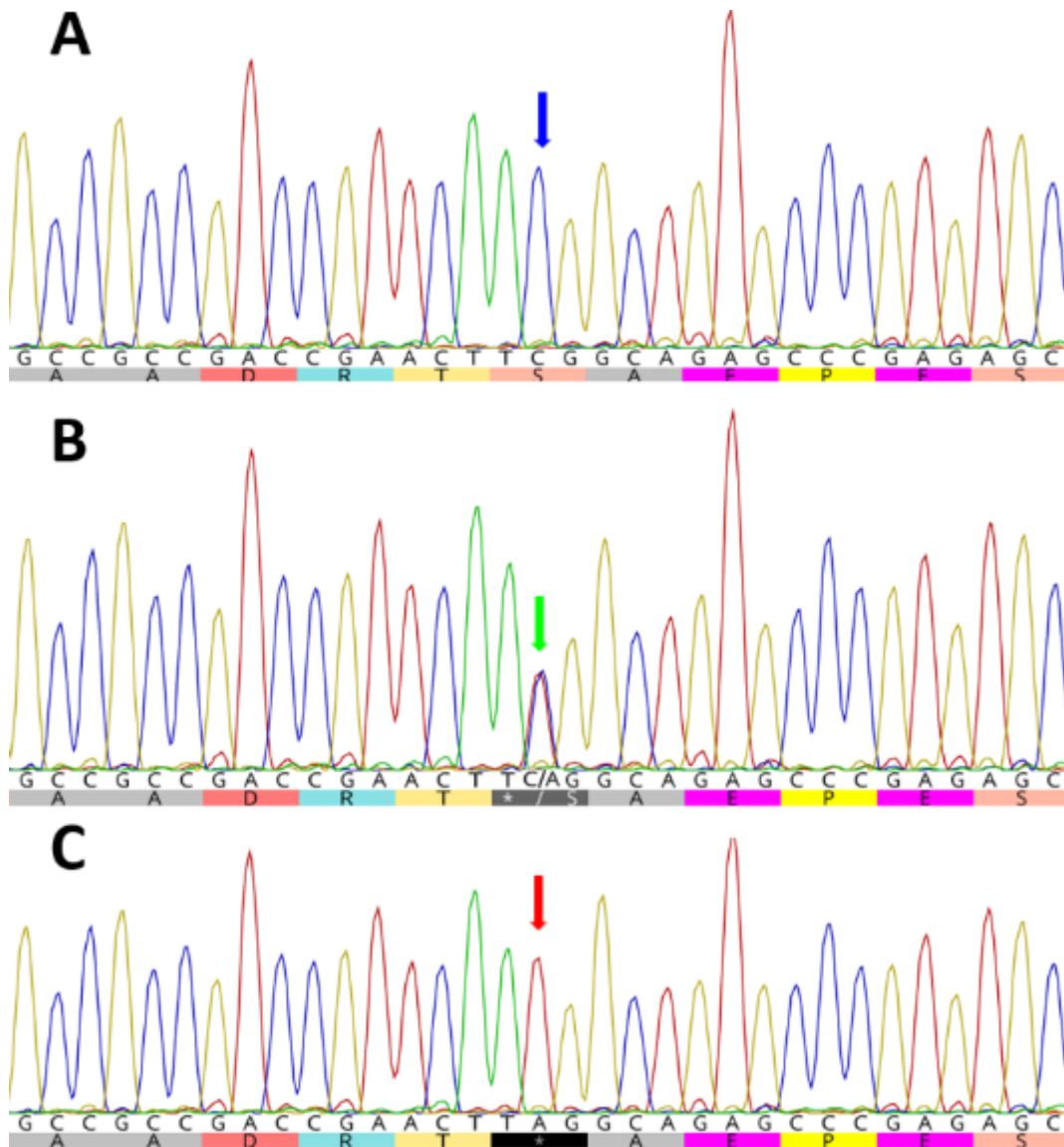


Figure 2. Partial chromatogram showing capillary sequencing results for *wild-type* homozygous (A), heterozygous (B) and mutated homozygous (C) *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A SNP. Wild-type allele (cytosine) and the respective amino acid serine (blue arrow); double peaks (cytosine/guanine) and the related amino acid stop codon or serine (green arrow), mutant allele (adenine) and TAG stop codon (red arrow). Images were obtained using Geneious® 10.0 software (Biomartters Ltd., Auckland, New Zealand).

Table 1: Distribution of genotypes (CC, CA and AA) of the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A mutation according to the phenotype (batida or picada gait) in 159 mules.

Genotypes	Gait		Total
	Batida	Picada	
CC	46 (46%)	29 (48%)	75 (47%)
CA	53 (54%)	31 (52%)	84 (53%)
AA	ND*	ND*	
Total	99	60	159

*ND, not detected.

Table 2: Distribution of genotypes (CC, CA and AA) of the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A mutation according to the phenotype (batida or picada gait) in 203 donkeys.

Genotypes	Gait		Total
	Batida	Picada	
CC	100 (99%)	96 (94%)	196 (97%)
CA	1 (1%)	6 (6%)	7 (3%)
AA	ND	ND	ND
Total	101	102	203

*ND, not detected

Supplementary Table 1. PCR primers for the amplification of the *DMRT3* gene exons, 5' and 3' intron–exon junctions, and 5' and 3' UTRs in donkeys (*Equus asinus*) and for the detection of the *DMRT3*_chr23:g.22999655C>A variant.

<i>Primers</i>	<i>Sequences</i>	Product (bp¹)	Annealing temperature
JP_DMRT3_EXON1_8	AAAGACGGGTGCCGCAT GTAGCGCTTGTGACCCCTGA	315	64 °C
JP_DMRT3_EXON1_9	GCTTCAAGGACTGCACCT TTCTGCCCCGAAAGAACC	479	62 °C
JP_DMRT3_EXON1_10	CTGGCTCAAGGGTCACAAG AGGCCAACTTCCGAAACC	457	62 °C
JP_DMRT3_EXON2_3	CATTTGCCAGTGACATAGTTTGG CAAGCTGAAGGGCAGAGAAA	454	59 °C
JP_DMRT3_EXON2_4	CAGAGACCTTCAGCGACAAA GTCATCCTCGGTGTAAAGAGAC	866	62 °C
JP_DMRT3_EXON2_5	GCAGACTCTAGTAACGTTGTCC CCCAGCTTTCCCAAGACTATT	666	62 °C
DMRT3_LBMCV_DdeI	ACAGAGACCTTCAGCGACAA GGGTTGGGGACAACGTTACT	560	60 °C

¹base pairs

Equus asinus DMRT3 mRNA complete cds

LOCUS OP068195 1718 bp mRNA linear MAM
26-SEP-2022

DEFINITION Equus asinus doublesex and mab-3 related transcription factor 3 (DMRT3) mRNA, complete cds.

ACCESSION OP068195

VERSION OP068195.1

KEYWORDS .

SOURCE Equus asinus (ass)

ORGANISM [Equus asinus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae;
Equus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1718)

AUTHORS Oliveira-Filho, J.P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-JUL-2022) Veterinary Clinical Science, Sao Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Prof. Doutor Walter Mauricio Corre, Botucatu, Sao Paulo 18618681, Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES

source Location/Qualifiers
1..1718
/organism="Equus asinus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[9793](#)"
/chromosome="23"
/sex="male"
/tissue_type="blood"
/country="Brazil"
/note="breed: Pega"

[gene](#) 1..1718
/gene="DMRT3"

[CDS](#) 39..1463
/gene="DMRT3"
/codon_start=1
/product="doublesex and mab-3 related transcription factor 3"

[protein_id](#)="UXE46280.1"

/translation="MNGYGYSPYLYMGGPVSQPPRAPLQRTPKCARCRNHGVLVSWLKGH
KRYCRFKDCTCEKCILIIERQVRMAAQVALRRQQANESLESLESLIPDSLRLALPGPPPPGD
AAAAAPQPPPTSQPSQPPPPQRPAAELAAAAALRWATEPQPGALQAQLAKPDLTEERL
GDGSSADNTETFSDKDTDQRSSPDVVKSKGCFTPESPEVVSVDDEGGYAVQKNGGTSES
RPDSPKYHGEQNHLIEGPGTVSLPFLSKANRPPLEVLKKIFPNQKPTVLELILKGC
GGDLVSAVEVLLSSRSSASAADRTSAEPESLVLP SNGHIFEHTLSSYPISSSKWSVGS
AFRVDPDTLRF SADSSNVVFNPLAVPLQHPFPQPPRYPLMLRNTLARNQSSPFLPNDVT
LWNTMTLQQYQLRSQYVSPFPGSSPSVFRSSPVLPTRAPEDPRISIPDDGCPIVSKQ
SLYTEDDYDERSDSSDSRILNTSS"

ORIGIN

1 ccgccgccag cccgccagct cttccgggag ctcrgggcat gaacggctac ggttccccct
61 acctgtacat gggcgcccg gtgtcgcagc cgccgcgggc gcccttgcag cgcacgcccc
121 agtgcgcgcg ctgccgcaac cacgggggtgc tgctctggct caagggtcac aagcgctact
181 gccgcttcaa ggactgcacc tgcgagaagt gcatcctcat catcgagcgg cagagggtca
241 tggcggcgca ggtggcgctg cgccggcagc aagctaacga gaggctcgag agcctcattc
301 ccgactcgct cgtgctctcg cccggccccc cgccgcgggg ggaagccgcc gctgccgccc
361 cgcagccgcc gccacacctg cagccgtctc agccgcggcc gccgcagcgt cccgcgcggc
421 agttggctgc ggctgccgcy ctgcgctggg ccaccgagcc gcagcccggg gcgctgcagg
481 cgcagctcgc caagccagat ttgactgagg agcgacttgg ggacggcagc tccgcagaca
541 acacagagac cttcagcgac aaagacaccg accagaggag ctccccagat gtgggtgaaaa
601 gtaaggggctg cttcaccgcc gagagccccc aggtcgtgtc tgtggatgaa ggcggggtatg
661 cggtsccagaa gaacggaggc acctccgaga gccgccccga cagtcccaag taccacgggg


```

721 aacagaatca cctcctgata gagggccctt cggggaccgt ttctctgccc ttcagcttga
781 aagccaacag accgcccctg gaagtgttaa aaaaaatctt cccaaccag aagcccacgg
841 tgctggagct catcctgaag ggctgtgggg gcgacctggt gagcgccgtg gaggtcctcc
901 tctccagccg ctctcgggcc tcggccgccc accgaacttc ggcagagccc gagagcctcg
961 tgttgcctc caacgggcac atctttgaac acacctgag ctcmataccc atctcctctt
1021 ccaaattggc cgtgggatcg gccttcaggg tcccagacac gttgaggttt tccgcagact
1081 ctagtaacgt tgtccccaac cccttgccg tgcccctgca gcaccccttc cccagccgc
1141 cccggtaccc tctgatgctg aggaatacyt tggcragaaa ccagtcgagc cccttcctgc
1201 ccaatgatgt caccctgtgg aacaccatga cgctgcagca gcagtaccag ctgaggtccc
1261 agtacgtcag ccctttcccc gggagctcgc ccagcgtctt cagaagctcg cctgtccttc
1321 ccacgcgcgc cccgaagac cctcgatct ccatccctga cgatgggtgt ccgattgtgt
1381 caaagcagtc tctttacacc gaggatgact atgacgagag gtccgactcc tcagactcta
1441 gaatactcaa cacatcatct taaagtggta ccgggtggct ggtgaccagg tgacattttc
1501 tgtgcatttg aactctgacc ccctgccctc cccaggagag gcctcgctct gtgtataccc
1561 tttccttctg tttgacaaa tgactgtgct tgattctata ccttagcaat aaaaacataa
1621 cttatttaat ttcttgcact tcaactgaaa atgccaaata gctctgctct gcggctttag
1681 tgctgaatgt ttattgtaaa agagagtcta atgctaag

```

//

Author guidelines

General standards

Article type

Frontiers requires authors to select the appropriate article type for their manuscript and to comply with the article type descriptions defined in the journal's 'Article types' page, which can be seen from the 'For authors' menu on every Frontiers journal page. Please pay close attention to the word count limits.

Templates

If working with Word please use our [Word templates](#). If you wish to submit your article as LaTeX, we recommend our [LaTeX templates](#). For LaTeX files, please ensure all relevant manuscript files are uploaded: .tex file, PDF, and .bib file (if the bibliography is not already included in the .tex file).

During the [interactive review](#), authors are encouraged to upload versions using track changes. Editors and reviewers can only download the PDF file of the submitted manuscript.

Manuscript length

Frontiers encourages the authors to closely follow the article word count lengths given in the 'Article types' page of the journals. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes, and all citations within it, and excludes the abstract, section titles, figure and table captions, funding statement, acknowledgments, and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures and tables included in your manuscript on the first page.

Language editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international English language standards to be considered for publication.

For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofreading to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing services provided by the following external partners.

Note that sending your manuscript for language editing does not imply or guarantee that it will be accepted for publication by a Frontiers journal. Editorial decisions on the scientific content of a manuscript are independent of whether it has received language editing or proofreading by these partner services or other services.

Editage Frontiers is pleased to recommend the language-editing service provided by our external partner Editage to authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing. These services may be particularly useful for researchers for whom English is not the primary language. They can help to improve the grammar, syntax, and flow of your manuscript prior to submission. Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link: editage.com/frontiers.

The Charlesworth Group Frontiers recommends the Charlesworth Group's author services, who has a long-standing track record in language editing and proofreading. This is a third-party service for which Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link: www.cwauthors.com/frontiers.

Frontiers推荐您使用在英语语言编辑和校对领域具有悠久历史和良好口碑的查尔斯沃思作者服务。此项服务由第三方为您提供, Frontiers中国作者通过此链接提交稿件时可获得10%的特别优惠: www.cwauthors.com.cn/frontiers

Language style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on the first page of your manuscript. For any questions regarding style, Frontiers recommends authors to consult the [Chicago Manual of Style](#).

Search engine optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve the search results of your article:

- include a few of your article's keywords in the title of the article
- do not use long article titles

- pick 5-8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s)
- use the maximum amount of keywords in the first two sentences of the abstract
- use some of the keywords in level 1 headings.

CrossMark policy

[CrossMark](#) is a multi-publisher initiative to provide a standard way for readers to locate the current version of a piece of content. By applying the CrossMark logo Frontiers is committed to maintaining the content it publishes and to alerting readers to changes if and when they occur. Clicking on the CrossMark logo will tell you the current status of a document and may also give you additional publication record information about the document.

Title

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative. Authors should avoid:

- titles that are a mere question without giving the answer
- unambitious titles, for example starting with 'Towards,' 'A description of,' 'A characterization of' or 'Preliminary study on'
- vague titles, for example starting with 'Role of', 'Link between', or 'Effect of' that do not specify the role, link, or effect
- including terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

For Corrigenda, General Commentaries, and Editorials, the title of your manuscript should have the following format:

- 'Corrigendum: Title of Original Article'
- General Commentaries: 'Commentary: Title of Original Article'
'Response: Commentary: Title of Original Article'
- 'Editorial: Title of Research Topic'

The running title should be a maximum of five words in length.

Authors and affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows:

- Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (only for United States, Canada, and Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus¹ ¹ Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, United States.

Correspondence

The corresponding author(s) should be marked with an asterisk in the author list. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section. Example: Max Maximus* maximus@iuscience.edu If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

Equal contributions

The authors who have contributed equally should be marked with a symbol (†) in the author list of the doc/latex and pdf files of the manuscript uploaded at submission.

Please use the appropriate standard statement(s) to indicate equal contributions:

- **Equal contribution:** These authors contributed equally to this work
- **First authorship:** These authors share first authorship
- **Senior authorship:** These authors share senior authorship
- **Last authorship:** These authors share last authorship
- **Equal contribution and first authorship:** These authors contributed equally to this work and share first authorship
- **Equal contribution and senior authorship:** These authors contributed equally to this work and share senior authorship
- **Equal contribution and last authorship:** These authors contributed equally to this work and share last authorship

Example: Max Maximus ^{1†}, John Smith^{2†} and Barbara Smith¹ †These authors contributed equally to this work and share first authorship

Consortium/group and collaborative authors

Consortium/group authorship should be listed in the manuscript with the other author(s).

In cases where authorship is retained by the consortium/group, the consortium/group should be listed as an author separated by a comma or 'and'. The consortium/group name will appear in the author list, in the citation, and in the copyright. If provided, the consortium/group members will be listed in a separate section at the end of the article.

For the collaborators of the consortium/group to be indexed in PubMed, they do not have to be inserted in the Frontiers submission system individually. However, in the manuscript itself, provide a section with the name of the consortium/group as the heading followed by the list of collaborators, so they can be tagged accordingly and indexed properly.

Example: John Smith, Barbara Smith and The Collaborative Working Group. In cases where work is presented by the author(s) on behalf of a consortium/group, it should be included in the author list separated with the wording 'for' or 'on behalf of.' The consortium/group will not retain authorship and will only appear in the author list.

Example: John Smith and Barbara Smith on behalf of The Collaborative Working Group.

Abstract

As a primary goal, the abstract should make the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. The abstract should be no longer than a single paragraph and should be structured, for example, according to the IMRAD format. For the specific structure of the abstract, authors should follow the requirements of the article type or journal to which they're submitting. Minimize the use of abbreviations and do not cite references, figures or tables. For clinical trial articles, please include the unique identifier and the URL of the publicly-accessible website on which the trial is registered.

Keywords

All article types require a minimum of five and a maximum of eight keywords.

Text

The entire document should be single-spaced and must contain page and line numbers in order to facilitate the review process. The manuscript should be written using either Word or LaTeX. See above for templates.

Nomenclature

The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and must be defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the acknowledgments.

Equations should be inserted in editable format from the equation editor.

Italicize gene symbols and use the approved gene nomenclature where it is available. For human genes, please refer to the HUGO Gene Nomenclature Committee ([HGNC](#)). New symbols for human genes should be submitted to the HGNC [here](#). Common alternative gene aliases may also be reported, but should not be used alone in place of the HGNC symbol. Nomenclature committees for other species are listed [here](#). Protein products are not italicized.

We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.

Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Astronomical objects should be referred to using the nomenclature given by the International Astronomical Union (IAU) provided [here](#).

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format: urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

For more information on LSIDs please see the 'Code' section of our [policies and publication ethics](#).

Sections

The manuscript is organized by headings and subheadings. The section headings should be those appropriate for your field and the research itself. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (i.e.,: 3.2.2.1.2 Heading Title).

For Original Research articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field.

Introduction Succinct, with no subheadings.

Materials and methods This section may be divided by subheadings and should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see the 'Bioethics' section of our [policies and publication ethics](#).)

Results This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and must be transferred to the main text.

Discussion This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior research related to the subject to place the novelty of the discovery in the appropriate context, discuss the potential shortcomings and limitations on their interpretations, discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views, speculate on the future direction of the research, and freely postulate theories that could be tested in the future.

For further information, please check the descriptions defined in the journal's 'Article types' page, in the 'For authors' menu on every journal page.

Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors. Should the content of the manuscript have previously appeared online, such as in a thesis or preprint, this should be mentioned here, in addition to listing the source within the reference list.

Contribution to the field statement

When you submit your manuscript, you will be required to briefly summarize in 200 words your manuscript's contribution to, and position in, the existing literature in your field. This should be written avoiding any technical language or non-standard acronyms. The aim should be to convey the meaning and importance of this research to a non-expert. While Frontiers evaluates articles using objective criteria, rather than impact or novelty, your statement should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings – whether positive or negative – contribute to progress in your research discipline. This will help the chief editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed statement will also facilitate the identification of the editors and reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration.

Example statement on: Markram K and Markram H (2010) The Intense World Theory – a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224

Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders that affect up to 1 in 100 individuals. People with autism display an array of symptoms encompassing emotional processing, sociability, perception and memory, and present as uniquely as the individual. No theory has suggested a single underlying neuropathology to account for these diverse symptoms. The Intense World Theory, proposed here, describes a unifying pathology producing the wide spectrum of manifestations observed in autists. This theory focuses on the neocortex, fundamental for higher cognitive functions, and the limbic system, key for processing emotions and social signals. Drawing on discoveries in animal models and neuroimaging studies in individuals with autism, we propose how a combination of genetics, toxin exposure and/or environmental stress could produce hyper-reactivity and hyper-plasticity in the microcircuits involved with perception, attention, memory and emotionality. These hyper-functioning circuits will eventually come to dominate their neighbors, leading to hyper-sensitivity to incoming stimuli, over-specialization in tasks and a hyper-preference syndrome. We make the case that this theory of enhanced brain function in autism explains many of the varied past results and resolves conflicting findings and views and makes some testable experimental predictions.

Figure and table guidelines

CC-BY license

All figures, tables, and images will be published under a Creative Commons [CC-BY license](#), and permission must be obtained for use of copyrighted

material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

For additional information, please see the 'Image manipulation' section of our [policies and publication ethics](#).

Figure requirements and style guidelines

Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript; the figures will then be automatically embedded at the end of the submitted manuscript. Kindly ensure that each figure is mentioned in the text and in numerical order.

For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using labels (A), (B), (C), (D), etc. However, do not embed the part labels over any part of the image, these labels will be replaced during typesetting according to Frontiers' journal style. For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis.

For LaTeX files, figures should be included in the provided PDF. In case of acceptance, our production office might require high-resolution files of the figures included in the manuscript in EPS, JPEG or TIF/TIFF format.

To upload more than one figure at a time, save the figures (labeled in order of appearance in the manuscript) in a zip file and upload them as 'Supplementary Material Presentation.'

Please note that figures not in accordance with the guidelines will cause substantial delay during the production process.

Captions

Captions should be preceded by the appropriate label, for example 'Figure 1.' Figure captions should be placed at the end of the manuscript. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

Image size and resolution requirements

Figures should be prepared with the PDF layout in mind. Individual figures should not be longer than one page and with a width that corresponds to 1 column (85 mm) or 2 columns (180 mm).

All images must have a resolution of 300 dpi at final size. Check the resolution of your figure by enlarging it to 150%. If the image appears blurry, jagged, or has a stair-stepped effect, the resolution is too low.

The text should be legible and of high quality. The smallest visible text should be no less than eight points in height when viewed at actual size.

Solid lines should not be broken up. Any lines in the graphic should be no smaller than two points wide.

Please note that saving a figure directly as an image file (JPEG, TIF) can greatly affect the resolution of your image. To avoid this, one option is to export the file as PDF, then convert into TIFF or EPS using a graphics software.

Format and color image mode

The following formats are accepted: TIF/TIFF (.tif/.tiff), JPEG (.jpg), and EPS (.eps) (upon acceptance). Images must be submitted in the color mode RGB.

Chemical structures

Chemical structures should be prepared using ChemDraw or a similar program. If working with ChemDraw please use our [ChemDraw template](#). If working with another program please follow the guidelines below.

- Drawing settings: chain angle, 120° bond spacing, 18% width; fixed length, 14.4 pt; bold width, 2.0 pt; line width, 0.6 pt; margin width, 1.6 pt; hash spacing, 2.5 pt. Scale 100% Atom Label settings: font, Arial; size, 8 pt
- Assign all chemical compounds a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text.

Table requirements and style guidelines

Tables should be inserted at the end of the manuscript in an editable format. If you use a word processor, build your table in Word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. An empty line should be left before and after the table.

Table captions must be placed immediately before the table. Captions should be preceded by the appropriate label, for example 'Table 1.' Please use only a single paragraph for the caption.

Kindly ensure that each table is mentioned in the text and in numerical order.

Please note that large tables covering several pages cannot be included in the final PDF for formatting reasons. These tables will be published as supplementary material.

Tables which are not according to the above guidelines will cause substantial delay during the production process.

Accessibility

Frontiers encourages authors to make the figures and visual elements of their articles accessible for the visually impaired. An effective use of color can help people with low visual acuity, or color blindness, understand all the content of an article.

These guidelines are easy to implement and are in accordance with the W3C Web Content Accessibility Guidelines ([WCAG 2.1](#)), the standard for web accessibility best practices.

Ensure sufficient contrast between text and its background People who have low visual acuity or color blindness could find it difficult to read text with low contrast background color. Try using colors that provide maximum contrast.

WC3 recommends the following contrast ratio levels:

- Level AA, contrast ratio of at least 4.5:1
- Level AAA, contrast ratio of at least 7:1

You can verify the contrast ratio of your palette with these online ratio checkers:

- [WebAIM](#)
- [Color Safe](#)

Avoid using red or green indicators More than 99% of color-blind people have a red-green color vision deficiency.

Avoid using only color to communicate information Elements with complex information like charts and graphs can be hard to read when only color is used to distinguish the data. Try to use other visual aspects to communicate information, such as shape, labels, and size. Incorporating patterns into the shape fills also make differences clearer; for an example please see below:

Supplementary material

Data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because they are too large or the current format does not permit it (such as videos, raw data traces, PowerPoint presentations, etc.), can be uploaded as supplementary material during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to Figshare for permanent storage and receive a DOI.

Supplementary material is not typeset, so please ensure that all information is clearly presented without tracked changes/highlighted text/line numbers, and the appropriate caption is included in the file. To avoid discrepancies between the published article and the supplementary material, please do not add the title, author list, affiliations or correspondence in the supplementary files.

The supplementary material can be uploaded as:

- data sheet (Word, Excel, CSV, CDX, FASTA, PDF or Zip files)
- presentation (PowerPoint, PDF or Zip files)
- image (CDX, EPS, JPEG, PDF, PNG or TIF/TIFF),
- table (Word, Excel, CSV or PDF)
- audio (MP3, WAV or WMA)
- video (AVI, DIVX, FLV, MOV, MP4, MPEG, MPG or WMV).

Technical requirements for supplementary images:

- 300 DPIs
- RGB color mode.

For supplementary material templates (LaTeX and Word), see our [supplementary material templates](#).

References

Frontiers' journals use one of two reference styles, either Harvard (author-date) or Vancouver (numbered). Please check our [help center](#) to find the correct style for the journal to which you are submitting.

- All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa
- The names of the first six authors followed by et al. and the DOI (when available) should be provided
- Given names of authors should be abbreviated to initials (e.g., Smith, J., Lewis, C.S., etc.)
- The reference list should only include articles that are published or accepted

- Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for article types that allow such inclusions
- For accepted but unpublished works use 'in press' instead of page numbers
- Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list. Include the version and unique identifier when available
- Personal communications should be documented by a letter of permission
- Website URLs should be included as footnotes
- Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source
- Preprints can be cited as long as a DOI or archive URL is available, and the citation clearly mentions that the contribution is a preprint. If a peer-reviewed journal publication for the same preprint exists, the official journal publication is the preferred source. See the preprints section for each reference style below for more information.

Harvard reference style (author-date)

Many Frontiers journals use the Harvard referencing system; to find the correct reference style and resources for the journal you are submitting to, please visit our [help center](#). Reference examples are found below, for more examples of citing other documents and general questions regarding the Harvard reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

In-text citations

- For works by a single author, include the surname, followed by the year
- For works by two authors, include both surnames, followed by the year
- For works by more than two authors, include only the surname of the first author followed by et al., followed by the year
- For humanities and social sciences articles, include the page numbers.

Reference examples

Article in a print journal Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

Article in an online journal Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

Book Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

Abstract Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

Website World Health Organization. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Accessed March 15, 2018].

Patent Marshall, S. P. (2000). Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Data Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and dissertations Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

Preprint Smith, J. (2008). Title of the document. Preprint repository name [Preprint]. Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

Vancouver reference style (numbered)

Many Frontiers journals use the numbered referencing system; to find the correct reference style and resources for the journal you are submitting to, please visit our [help center](#).

Reference examples are found below, for more examples of citing other documents and general questions regarding the Vancouver reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

In-text citations

- Please apply the Vancouver system for in-text citations
- In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis (use square brackets for physics and mathematics articles).

Reference examples

Article in a print journal Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* (2000) 5:163-72.

Article in an online journal Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

Book Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

Abstract Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. *Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

Website World Health Organization. *E. coli* (2018). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Accessed March 15, 2018].

Patent Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly. United States patent US 20020103498 (2002).

Data Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular

tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and dissertations

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

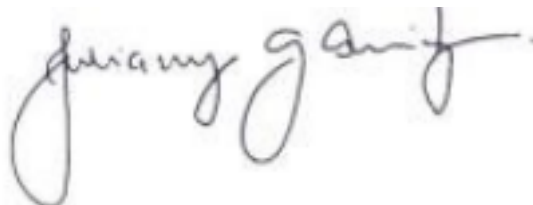
Preprint Smith, J. Title of the document. Preprint repository name [Preprint] (2008). Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Estudo clínico e molecular da mutação DMRT3_chr23:g.22999655C>A em asininos e muares" Protocolo CEUA 0064/2020 , a ser conduzido por Jose Paes de Oliveira Filho, responsável/orientador Jose Paes de Oliveira Filho, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/06/2020 a 31/12/2021
Nome Comum/ Espécie / Linhagem	MUAR / EQUUS ASINUS / não se aplica
Raça	não se aplica
Nº de animais machos	30
Nº de animais fêmeas	180
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	300
Peso médio de animais fêmeas	300
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	4 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Haras Comerciais

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em
17/06/2020



JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br