

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS
AO DESENVOLVIMENTO MUSCULAR, FERTILIDADE E
TEMPERAMENTO EM EQÜINOS DA RAÇA MANGALARGA.**

Lidia Carolina Meira Arneiro

Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

FEVEREIRO - 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE GENES RELACIONADOS
AO DESENVOLVIMENTO MUSCULAR, FERTILIDADE E
TEMPERAMENTO EM EQÜINOS DA RAÇA MANGALARGA.**

Lidia Carolina Meira Arneiro

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Dias Silveira da Mota

Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

FEVEREIRO - 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LIDIA CAROLINA MEIRA ARNEIRO - nasceu em 31 de agosto de 1983, no município de Guaratinguetá-SP, filha de João Marcos Arneiro e Maria de Fátima Meira de Vasconcelos Arneiro. Em dezembro de 2008 obteve o título de zootecnista pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) e em agosto de 2009 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal - SP como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Marcílio Dias Silveira da Mota e co-orientação do Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi.

*Admíror nec rerum solidum, sed
verborum elegantiam*

"Admiro não só a elegância das coisas, mas também das palavras"

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais João Marcos Arneiro e
Maria de Fátima por guiarem sempre
os passos meus.*

*À minha avó Geralda Lopes, que mesmo
distante tão perto.*

*À Rafael Arneiro, mais que um irmão,
um parceiro.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcílio Dias, simplesmente por tudo.

Ao mais que co-orientador, um grande mestre Prof. Dr. Rogério Curi, pelas broncas e puxadas de orelha, mas que com isso me mostrou o caminho.

Ao grande amigo e professor de graduação Prof. Nicolau Puoli Filho, por sempre acreditar em mim e em meu potencial.

Ao meu sempre, grande e melhor amigo José Juber Justus Júnior (Jubinho), pelo amor, carinho, compreensão, fortíssimas baladas e incontáveis divertimentos e choros.

Aos meus grandes e tão amados amigos: Nelsinho, Xutinha, Voa, Andressa, entre outros, que mesmo não estando nesta pequena lista possam ter certeza que são muito queridos e por mim respeitados.

Ao meu “brother”, Rafael Loucurinha, pelas traduções para o inglês.

Às minhas mais que amigas, irmãs de república, em Botucatu e Jaboticabal. Em especiais: Punhets e Norréia.

A todos da minha família que sempre acreditaram na minha capacidade e esforço, á minha Tia Célia Maria por sempre me receber no lugar mais aconchegante do mundo, seu sítio em Guaratinguetá.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo fornecimento de parte da bolsa de mestrado.

Jamais poderia terminar este item sem agradecer fortemente ao único Ser que sem Ele jamais nada disto teria acontecido sem sua permissão: Deus!

Obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Os eqüinos no Brasil e no mundo	1
Origem e situação atual da raça Mangalarga	2
Melhoramento genético de eqüinos.....	3
Melhoramento genético de eqüinos Mangalarga	4
Marcadores moleculares.....	5
Características de interesse em eqüinos e genes relacionados	10
Desempenho muscular.....	10
Fertilidade de machos	11
Temperamento	13
Conceitos e parâmetros Genético-Populacionais.....	15
Frequências alélicas e genotípicas	15
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	16
Neutralidade seletiva de Ewens-Watterson	17
Objetivos	18
Referências	19
CAPÍTULO 2.....	24
TRABALHO 1 - Polimorfismos de genes candidatos para desempenho muscular e fertilidade de machos em eqüinos da raça brasileira Mangalarga	24
RESUMO	24
Abstract	24
Introdução	25
Material e métodos.....	26
Animais e genotipagem	26
Análise dos dados.....	27
Resultados e discussão.....	27
Polimorfismo do gene PRKAG3.....	27
Polimorfismo do gene SPATA1	29
Conclusões.....	30
Agradecimentos.....	30

Referências	31
FIGURAS	32
Figura 1 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% de alta resolução para o polimorfismo AY376689:c.773C>T do gene <i>PRKAG3</i> eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima <i>AluI</i> (182 pb) e CC o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima <i>AluI</i> . Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.	32
Figura 2 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AWR_02017454:g.121684T>C do gene <i>SPATA1</i> eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, N o controle negativo de amplificação e CC, CT e TT, os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima <i>RsaI</i> . Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.	33
TRABALHO 2 - Caracterização da variabilidade de genes relacionados à fertilidade de machos e ao temperamento em eqüinos da raça Mangalarga	34
RESUMO	34
Abstract	34
Introdução	35
Material e métodos.....	37
Animais e coleta de sangue	37
Extração do DNA e genotipagem	37
Análise dos dados.....	39
Resultados	39
Discussão	41
Polimorfismo do CRISP1	41
Polimorfismo do HTR1A	42
Polimorfismo do SLC6A4	43
Conclusões.....	44
Agradecimentos	45
Referências	45
TABELAS	47
Tabela 1 - Genes candidatos, sequência dos “primers” forward (F) e reverse (R) utilizados na amplificação das regiões de interesse, temperatura de anelamento dos “primers” (TA) na reação de PCR, enzimas de restrição utilizadas na detecção dos polimorfismos, número de acesso das sequências dos genes de interesse no GenBank, troca de nucleotídeos na sequência do DNA e troca de aminoácido na sequência da proteína.	47

Tabela 2 - Frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1*, AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* e AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* em amostra representativa da população de eqüinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.....48

Tabela 3 - Teste F de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e significância de Slatkin para os sítios polimórficos dos genes *HTR1A* e *SLC6A4* em amostra representativa da população de eqüinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.49

FIGURAS50

Figura 1 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *BseNI* (910 pb) e AA o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *BseNI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.50

Figura 2 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *AluI* (432 pb) e CG e GG os genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *AluI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.51

Figura 3 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% para o polimorfismo AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *HhaI* (359 pb) e AG e GG os genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *HhaI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.52

Caracterização da variabilidade de genes relacionados ao desenvolvimento muscular, fertilidade e temperamento em eqüinos da raça Mangalarga

Resumo - Em mamíferos, incluindo os eqüinos (*Equus caballus*), o gene *protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit (PRKAG3)* encontra-se relacionado ao desempenho muscular, os genes *cysteine-rich secretory protein 1 (CRISP1)* e *spermatogenesis associated 1 (SPATA1)* à fertilidade de machos e os genes *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (HTR1A)* e *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 (SLC6A4)* ao temperamento. Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs AY_376689:c.773C>T, AJ_315378:c.110A>G e AB_264325:c.771G>C dos genes eqüinos *PRKAG3*, *CRISP1* e *HTR1A*, respectivamente, bem como a caracterização em cavalos da raça brasileira Mangalarga destes e de outros polimorfismos, o AAWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* e o AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4*, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características de interesse na raça. Foram utilizados 151 animais Mangalarga, de ambos os sexos e de idades variadas, representativos da população do Estado de São Paulo. O método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem dos SNPs AY_376689:c.773C>T do *PRKAG3*, AJ_315378:c.110A>G do *CRISP1* e AB_264325:c.771G>C do *HTR1A*. Entretanto, os polimorfismos do *PRKAG3* e *CRISP1* provavelmente não ocorrem na Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com os marcadores. As estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidas para o polimorfismo AAWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* na amostra estudada demonstraram a possibilidade de realização de pesquisas visando a sua associação com fertilidade de machos. As mesmas estimativas obtidas para os polimorfismos AB_264325:c.771G>C do *HTR1A* e o AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* desencorajam a realização de pesquisas visando suas associações à características relacionadas ao temperamento.

Palavras chave: Marcadores moleculares, Genes candidatos, Eqüinos, Mangalarga

Variability characterization of genes related to muscular development, fertility and temper in Mangalarga breed equine.

Abstract – In mammals, including the equine (*Equus caballus*), the *protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit (PRKAG3)* gene is related to muscular development, the *cysteine-rich secretory protein 1 (CRISP1)* and *spermatogenesis associated 1 (SPATA1)* genes are related to male fertility and the *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (HTR1A)* and *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 (SLC6A4)* genes are related to temperament. The aims of the present study were to propose an alternative genotyping method for the AY_376689:c.773C>T, AJ_315378:c.110A>G and AB_264325:c.771G>C SNPs of the equine *PRKAG3*, *CRISP1* and *HTR1A* genes, respectively, as well as the characterization in Mangalarga Brazilian breed horses of these and other polymorphisms, the AAWR_02017454:g.121684T>C of the *SPATA1* gene and the AB_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* gene, in order to provide the necessary basis for future research towards associating the DNA markers and traits of interest in this breed. For this, 151 Mangalarga animals were used, from both sexes and random ages, representing the São Paulo state population. The PCR-RFLP methodology was found to be adequate for the genotyping of the SNPs AY_376689:c.773C>T of the *PRKAG3*, AJ_315378:c.110A>G of the *CRISP1* and AB_264325:c.771G>C of the *HTR1A*. Nevertheless, the *PRKAG3* and *CRISP1* polymorphisms probably do not occur in Mangalarga, making it impossible the association studies with these markers. The estimative of the population genetic parameters obtained for the AAWR_02017454:g.121684T>C polymorphism of the *SPATA1* gene in the sample studied showed the possibility of carrying out research towards its association with male fertility. On the other hand, the same estimatives obtained for the polymorphisms AB_264325:c.771G>C of the *HTR1A* and AB_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* discourage research towards their association to traits related to temperament.

Keywords: Molecular markers, Candidate genes, Equine, Mangalarga

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os eqüinos no Brasil e no mundo

Existem aproximadamente 62 milhões de cavalos no mundo, a maior parte vivendo na Ásia, América e alguns países da Europa (FAO, 2006). A China é o país com maior número de cabeças (oito milhões), seguido do México (pouco mais de seis milhões) e Brasil (pouco menos de seis milhões), sendo que estes três países apresentam aproximadamente 1/3 da população global.

Entre 1998 e 2003, a maioria dos países apresentou taxa de crescimento da população de cavalos estável ou diminuindo e, em apenas poucos países nórdicos, africanos e da América do Sul o rebanho cresceu. Brasil (0,1%) e México (0%) mostraram-se praticamente estáveis no período, ao passo que na China a taxa de crescimento foi negativa (-1,9%) (FAO, 2006).

O impacto do agronegócio do cavalo no Brasil é bastante expressivo, movimentando valor econômico superior a R\$ 7,5 bilhões ao ano e abrangendo cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA et al., 2006). Nesse sentido, considerando-se a estimativa de que o País possui 5.900.700 cabeças (FAO, 2006), constata-se que aproximadamente dois cavalos geram um emprego.

A utilização de animais na lida com rebanhos bovinos (aproximadamente 5 milhões) vem sendo o seguimento de maior destaque dentro do agronegócio do cavalo no Brasil, representando 52% da movimentação monetária e 78% dos empregos diretos gerados (LIMA et al., 2006). Esta intensa relação tem feito os cavalos acompanharem os bovinos em seu deslocamento para as regiões Centro-Oeste e Norte do País. Dados do IBGE (2007) indicam que, entre 1990 e 2004, dezenove estados brasileiros apresentaram taxa de crescimento anual negativa, justamente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Rondônia e Acre foram os estados onde o efetivo de cavalos mais cresceu (8,3% e 9,1%, respectivamente), os mesmos onde a taxa de crescimento dos bovinos também foi maior (15,1% e 13,5%). Por outro lado, Ceará e Maranhão foram os locais onde a diminuição da tropa foi mais acentuada (-3,86% e -3,73%, respectivamente), e

todos os estados do Sul e Sudeste apresentaram taxas de crescimento negativas (média de -1,06%).

Embora a utilização do cavalo na lida com bovinos seja marcante no contexto da equinocultura nacional, o seguimento que envolve os esportes eqüestres, acompanhando tendência mundial, tem crescido acentuadamente nos últimos anos. Nesse sentido, no período de 1999 a 2004 o número de eventos envolvendo as diversas modalidades eqüestres (salto, adestramento, enduro, concurso completo de equitação, etc.) cresceu 315%, ou seja, aumento médio de 15,3% ao ano.

Além da utilização do cavalo na lida da fazenda e nas provas eqüestres, a tendência de sua utilização para lazer vem aumentando significativamente. O cavalo também é utilizado na equoterapia, modalidade disponível há milhares de anos e, agora, reconhecida como de grande eficácia para o tratamento de inúmeros males físicos, psíquicos e comportamentais.

Origem e situação atual da raça Mangalarga

O cavalo Mangalarga originou-se a partir de animais introduzidos no Brasil pelos colonizadores portugueses, sendo que seu principal tronco formador deriva do cruzamento de cavalos Alter, vindos com a Família Real Portuguesa na ocasião das guerras Napoleônicas, com animais de mesma origem aqui trazidos no século XIX, mas que foram se transformando no processo de adaptação a um novo habitat (SIMÕES, 1983).

Selecionado desde o início de sua formação como animal de serviço em fazendas e de esporte (na época, caçada de veados) o Mangalarga, que apresenta andamento característico denominado marcha trotada, constitui-se em excelente ferramenta de auxílio aos trabalhos dentro da pecuária de corte, atividade que vem acompanhando nos seus deslocamentos pelo Brasil. No final do século XIX e início do século XX alguns cruzamentos com raças mais velozes foram realizados visando aumento na velocidade de galope (SIMÕES, 1983).

Segundo relatório acerca da situação dos recursos genéticos animais no País (MARIANTE et al., 2003), existem 23 raças de cavalos criadas no Brasil, 12

consideradas exóticas, quatro comerciais e sete “locais”. Dentre as raças comerciais (Brasileiro de Hipismo, Campolina, Mangalarga e Mangalarga Marchador), a Mangalarga é a que apresenta maior intensidade de uso nas diferentes regiões do País.

Fundada em 1934, a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga (ABCCRM) registrou, desde então, aproximadamente 170 mil animais, maioria deles no estado de São Paulo (ABCCRM, 2003). Ao longo de sua história, observou-se tendência de crescimento da raça até os anos 80, com auge no início dos anos 90, decrescendo notadamente de 1994 até 1998, ano a partir do qual esta tendência desacelera-se ligeiramente e tende a estabilidade (MOTA et al., 2006). A fase de decréscimo intenso (registra-se atualmente, ao ano, cerca de 20% dos animais que se registrava no início dos anos 90) coincide com a implantação do plano de estabilização econômico do governo federal (Plano Real), e parece existir relação de causa-efeito entre ambos. Tendência semelhante também foi reportada em eqüinos das raças Campolina (PROCÓPIO et al., 2003) e Brasileiro de Hipismo (DIAS, 1999).

Melhoramento genético de eqüinos

Embora algumas pesquisas publicadas em cavalos envolvam a área de melhoramento genético, ainda não existem, efetivamente, programas consistentes de seleção nas diferentes raças criadas no País.

Em relação a outras espécies de exploração zootécnica, as pesquisas na área de melhoramento genético são proporcionalmente menores em eqüinos, no mundo todo. No Brasil em particular, dada à grandeza de sua tropa, esta distância é ainda mais marcante. Pequenos grupos de pesquisadores ligados às universidades e institutos de pesquisa têm publicado na área, especialmente aspectos quantitativos de caracteres de interesse econômico ou conservacional, em raças nacionais.

Existem algumas vantagens quando se pesquisa na área de melhoramento genético de cavalos, utilizando-se princípios de genética quantitativa. A profundidade da genealogia na maioria das raças é alta, características de desempenho geralmente podem ser medidas em ambos os sexos, repetidamente, e em períodos de tempo relativamente curtos.

Dificuldades inerentes à espécie eqüina (baixos índices reprodutivos, altos intervalos de geração e parto, baixo número de progênes por parição, período de gestação relativamente longo), e em função de aspectos operacionais (informações escassas e imprecisas de caracteres reprodutivos, comportamentais e de desempenho em grande parte das raças, baixa receptividade das associações de criadores às tecnologias reprodutivas, relação superficial entre órgãos técnicos e criadores) têm sido algumas das dificuldades ao se pesquisar melhoramento genético de cavalos no Brasil.

Além disso, na raça Mangalarga, particularmente, o fato dos animais apresentarem uso bastante variado atualmente (trabalho em fazendas de bovinos, cavalgadas, enduro, equoterapia, turismo eqüestre e esportes hípicas não especializados) leva os criadores em busca de características bastante distintas, dependendo do objetivo de criação, dificultando a implantação de programas de melhoramento genético que englobem todos os seguimentos. Neste sentido, a caracterização da variabilidade de genes relacionados a características de interesse para todas as disciplinas contempladas pela raça é o primeiro passo em direção à seleção assistida por marcadores, a qual certamente auxiliará os criadores em suas tomadas de decisão acerca de quais animais encaminharem para reprodução.

Melhoramento genético de eqüinos Mangalarga

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

Normalmente, as pesquisas têm focado a estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos apenas de características contidas nas tabelas de pontuação - conformação e andamento, avaliadas subjetivamente, e de desenvolvimento, mensuradas na ocasião do registro (MOTA & GIANNONI, 1994, ALMEIDA PRADO, 2005, MOTA & ALMEIDA

PRADO, 2005, MOTA et al., 2006). Pouco se conhece acerca de caracteres reprodutivos, comportamentais e de desempenho dos animais.

As estimativas de herdabilidade têm variado de média (0,20 a 0,30, para características pontuadas) a alta (0,40 a 0,66, para caracteres mensurados), indicando que há variabilidade genética aditiva relativa suficiente para que a seleção baseada no fenótipo individual dos animais possa alcançar mudanças genéticas consideráveis na tropa.

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

Marcadores moleculares

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

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

Os polimorfismos ocorrem tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na seqüência protéica, são denominados não sinônimos,

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

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

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

Entre as várias classes de marcadores moleculares, estão os SSRs (*Single Sequences Repeats*) ou microssatélites e os RFLPs (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism). Marcadores microssatélites são pequenas seqüências, geralmente não codificadoras, de 2 a 6 pares de bases, repetidas em *tandem* (em seqüência) e, normalmente em número menor que 100 repetições. O polimorfismo de microssatélites é resultado da amplificação por PCR de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos em função do número variável de elementos repetitivos. Esses marcadores apresentam alto polimorfismo, codominância, facilidade de detecção por PCR, facilidade de determinação dos alelos e genótipos, ocorrendo com grande freqüência e ampla distribuição ao longo de todo o genoma da maioria dos organismos eucariotos.

Os marcadores de DNA conhecidos por RFLPs foram inicialmente aplicados na detecção de mutações no material genético de vírus e, posteriormente, em outros organismos (BOTSTEIN et al., 1980). O termo RFLP pode ser traduzido como polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por restrição da fita de DNA. Esta fragmentação ou corte é obtida por meio do uso de enzimas de restrição (KELLY & SMITH, 1970). Estas enzimas possuem sítios específicos de clivagem, de modo que um rearranjo da fita de DNA, por inserção, deleção ou mutações pontuais pode eliminar ou criar um novo sítio de restrição, modificando o tamanho dos fragmentos obtidos pela clivagem do DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A detecção dos fragmentos resultantes da digestão do DNA pode ser visualizada, após a separação por eletroforese, por meio da sua transferência e imobilização em uma membrana de nylon, técnica conhecida por *Southern Blot*, e hibridização com sondas de DNA homólogas ao DNA imobilizado. Uma vez que os RFLPs possuem ampla distribuição no genoma e codominância, esta categoria de marcadores genéticos abriu perspectiva relevante no estudo do genoma, contribuindo imensamente para o desenvolvimento dos mapas genômicos (BOTSTEIN et al., 1980), renovando o interesse no uso de marcadores genéticos em estudos de localização de QTL (*Quantitative Trait Loci*) e, conseqüentemente, na Seleção Assistida por Marcadores - MAS (WELLER et al., 1990; ROCHA et al., 1992).

Muitos dos polimorfismos descritos pelo método de *Southern Blot* têm sido transformados em marcadores baseados em PCR. Para a análise de RFLP por meio de PCR, a PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), as extremidades da sonda que revelou o polimorfismo são

seqüenciadas e essas seqüências são utilizadas para a síntese de *primers* complementares. Com o crescente desenvolvimento dos projetos de sequenciamento do genoma das principais espécies animais e vegetais, os *primers* podem também ser desenvolvidos a partir de seqüências publicadas, selecionando-se aquelas que delimitam polimorfismos descritos (REGITANO, 1996). Esses *primers* são utilizados para amplificar a região que contém os sítios polimórficos de restrição. Os fragmentos produzidos pela digestão dos produtos de amplificação podem ser então analisados em gel de agarose (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) ou em gel de poliacrilamida. A PCR-RFLP tem sido aplicada no diagnóstico de doenças hereditárias em humanos (SAIKI et al., 1985) e em animais, bem como na verificação de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de características de interesse econômico (COUTINHO & REGITANO, 1995).

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

Rocha et al. (1994) utilizaram o termo *Ilusão Aditiva* ao se referirem a um exagerado otimismo ao fácil emprego de marcadores com o propósito de seleção, considerando que genes isolados não podem ser classificados como bons ou ruins e que somente o genótipo como um todo pode receber este tipo de classificação, quando relacionado à determinada condição ambiental. Entretanto, Vaz Portugal (2002) considera que o futuro se inscreverá no domínio da identificação e expressão do DNA,

procurando assentar o melhoramento genético na seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Seletion* - MAS). O termo *Marcador Responsável por Expressões Fenotípicas* orientará o ganho genético, o mérito genético e a intensidade de seleção, otimizando a eficiência biológica em termos unitários e comparativos. Apesar da diferença de opiniões, a MAS está sendo empregada em animais de interesse zootécnico para a detecção de doenças hereditárias, para a orientação de acasalamentos e, ainda que de forma incipiente, para a identificação de genótipos superiores para características de heranças simples ou complexa.

Marcadores moleculares permitem que os genótipos dos indivíduos sejam determinados em muitos locos para várias espécies diferentes (O' BRIEN & GRAVES, 1991), possibilitando que parâmetros genético-populacionais como frequências alélicas e genotípicas sejam estimados. Estas informações permitem a comparação de frequências entre populações e revelam diferenças em suas composições genéticas que podem contribuir para variações fenotípicas (MOODY et al., 1996). Quando o acasalamento entre os indivíduos da população ocorre ao acaso, a probabilidade de que um indivíduo encontre um parceiro de um dado genótipo é igual à frequência relativa daquele genótipo na população. O acasalamento ao acaso, com respeito às combinações genotípicas, equivale à combinação aleatória dos gametas produzidos pela população (CROW & KIMURA, 1970). Nessa situação, existe uma relação simples entre as frequências alélicas e genotípicas, constante ao longo das gerações. Essa relação foi demonstrada independentemente por Hardy e Weinberg, em 1908, e é conhecida como Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dessa forma, o fato de polimorfismos de DNA não se encontrarem em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma determinada população, pode ser indicativo de que os mesmos estiveram sujeitos à seleção ou deriva genética ao longo das gerações.

Entretanto, para a identificação das regiões do DNA responsáveis por características de interesse, geralmente, recorre-se a algumas estratégias diferentes, como a localização de QTL (*Quantitative Trait Loci*) pela análise de regiões microssatélites do maior número possível de indivíduos de grandes famílias, originárias de acasalamentos direcionados (HALEY, 1995). Porém, a aplicação dessa ferramenta esbarra na dificuldade de se constituir famílias para o estudo e no elevado custo para a

manutenção dos animais, principalmente em espécies cujo intervalo entre gerações é grande. Além disso, após a identificação de QTL ainda há um longo caminho a percorrer até a descoberta dos genes diretamente implicados com o fenótipo.

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

Características de interesse em eqüinos e genes relacionados

Desempenho muscular

A base de suporte e o movimento de um cavalo são realizados a partir dos esforços combinados dos sistemas esquelético e muscular. Informações a respeito do desenvolvimento do tecido muscular em cavalos têm especial relevância do ponto de vista prático, uma vez que é a partir do trabalho realizado pelos músculos que ocorre a conversão de energia química, estocada no organismo, em energia mecânica necessária para realização de quaisquer funções dos animais.

Entre os genes cujos produtos protéicos estão relacionados ao desempenho muscular, tem-se o *PRKAG3*. O gene *PRKAG3* codifica para uma isoforma músculo específica da subunidade regulatória γ da AMPK (*AMP-activated protein kinase*). A AMPK é alostericamente ativada pelo aumento da relação AMP para ATP que ocorre durante estresses metabólicos tais como falta de nutrientes e exercício físico (HARDIE & CARLING, 1997; NIELSEN et al., 2003), apresentando importante papel na regulação da homeostase energética em células de eucariotos (HARDIE et al., 1998; KEMP et al., 1999). A AMPK também é ativada pela contração muscular, levando à translocação do

transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, aumentando assim a percepção à glicose e a síntese de glicogênio (HOLMES et al., 1999).

Recentemente, várias mutações com efeitos fenotípicos sobre os músculos esquelético e cardíaco de mamíferos foram identificadas nos genes *PRKAG2* e *PRKAG3*, as quais codificam, respectivamente, as isoformas $\gamma 2$ e $\gamma 3$ da subunidade regulatória da AMPK. Nesses animais, a isoforma $\gamma 3$ é predominantemente expressa em fibras musculares esqueléticas brancas, sugerindo papel chave do gene *PRKAG3* nesse tecido (MILAN et al., 2000; MAHLAPUU et al., 2003). Alterações não silenciosas no gene *PRKAG3* de suínos, entre as quais a Arg200Gln, foram estreitamente relacionadas ao acúmulo de glicogênio no músculo esquelético, bem como à qualidade da carne produzida (MILAN et al., 2000; CIOBANU et al., 2001). Com relação ao *PRKAG2*, mutações no gene humano podem causar cardiomiopatias (GOLLOB et al., 2001; HAMILTON et al., 2001). A mutação missense Arg302Gln, que interessantemente ocorre na posição correspondente à Arg200Gln do gene *PRKAG3* de suínos, provoca a cardiomiopatia Wolff-Parkinson-White em humanos.

Park et al. (2003) identificaram sete SNPs no gene *PRKAG3* de eqüinos, entre os quais, cinco causadores de substituição de aminoácidos. Entre esses destaca-se o polimorfismo AY_376689:c.773C>T, responsável pela troca de um aminoácido prolina por um leucina na posição 258 da cadeia polipeptídica (Leu258Pro), cujos alelos genotipados pelo pirosequenciamento de produtos de PCR, apresentaram-se com distribuição distinta entre raças com fenótipos contrastantes para desenvolvimento muscular e desempenho.

Fertilidade de machos

Ao longo de sua evolução os eqüinos adaptaram-se a um modelo reprodutivo que lhes garantisse a sobrevivência eficiente na natureza. No entanto, a domesticação exerceu forte influência nesta espécie, e boa parte da atenção dos criadores foi direcionada ao desempenho esportivo, tendo a fertilidade pouca ou nenhuma pressão de seleção ao longo do tempo. Pilar fundamental em qualquer sistema de criação animal, características reprodutivas têm se mostrado difíceis de selecionar a partir de

métodos quantitativos em todas as espécies, especialmente em eqüinos, devido suas estimativas relativamente baixas de herdabilidade e dificuldades na avaliação dos dados (TAVEIRA & MOTA, 2007). Apesar disso, a fertilidade nos machos é uma característica econômica de larga importância devido ao crescente aumento do uso da técnica de inseminação artificial na indústria de reprodutores de elevado valor genético.

Segundo Giese et al. (2002) os espermatozóides não possuem motilidade e precisam passar por um processo de maturação antes de se tornarem móveis e adquirirem capacidade de se vincular e fundir aos oócitos. Importantes modificações nos espermatozóides ocorrem no interior do epidídimo, órgão secretor ativo de líquido seminal. Neste líquido, diversas proteínas de associação às membranas das células do espermatozóide podem ser identificadas, entre as quais as de secreção ricas em cisteína (CRISPs - *cysteine-rich secretory proteins*), atualmente categorizadas em três subtipos. A CRISP1 (*cysteine-rich secretory protein 1*), também conhecida como a AEG1 (*acidic epididymal glycoprotein1*), é membro da família de proteínas CRISP, sendo caracterizada pela presença de 16 resíduos de cisteína na região C-terminal. As proteínas CRISP, expressas no trato genital masculino, estão supostamente relacionadas ao processo de fusão entre espermatozóide e óvulo, o que torna seus genes codificadores candidatos para a característica fertilidade de machos (COHEN et al., 2000).

Giese et al. (2002) analisaram por meio de sequenciamento direto de produtos de PCR a ocorrência de diversidade no gene *CRISP1* de eqüinos de diferentes raças e encontraram vários polimorfismos, incluindo um de maior potencial para alterações fenotípicas por modificar a seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Este sítio polimórfico, AJ_315378:c.110A>G, está localizado no exon 3 e é responsável pela troca não conservativa de um glutamato por uma glicina na posição 37 (Glu37Gli) da proteína CRISP1.

Outro gene potencialmente candidato para a característica fertilidade de machos é o *SPATA1* (*spermatogenesis associated 1*). Embora a função detalhada do produto codificado pelo *SPATA1* (*spermatogenesis associated 1 protein*) permaneça desconhecida, acredita-se que tenha envolvimento na espermatogênese. O gene apresenta perfil de expressão testículo-específico, sendo considerado forte candidato a

influenciar a forma da cabeça dos espermatozoides ao longo da espermatogênese. Em roedores, além de funcional é considerado candidato posicional para fertilidade de machos (L'HÔTE et al., 2007).

Giesecke et al. (2009) encontraram em garanhões da raça Hanoveriana associação entre genótipos do polimorfismo AAWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* (BIEC2-968854) e diferentes taxas de prenhez por estro, característica relacionada à fertilidade de machos. Apesar de localizado em região de intron, análise *in silico* demonstrou que o SNP BIEC2-968854 apresenta potencial para afetar a regulação gênica, uma vez que a substituição do nucleotídeo T por C (T>C) cria sítio de ligação para o fator de transcrição SP1.

Temperamento

Definido como o conjunto de características comportamentais estáveis ao longo do tempo e entre situações, o temperamento geral é uma qualidade fundamental no cavalo de sela. Animais com bom temperamento são obedientes, fáceis de treinar, calmos, e confiantes (EVANS, 1996). Segundo Lansade et al. (2006), o temperamento é o critério mais importante a se considerar na compra de cavalos quando se pretende utilizá-los em eventos esportivos e lazer.

Acredita-se que, ao menos em parte, diferenças de temperamento entre indivíduos da mesma espécie surjam em decorrência de polimorfismos em genes cujos produtos estejam envolvidos em vias metabólicas de neurotransmissores, tais como transportadores e receptores. Estes, por sua vez, influenciam a atividade e o *turnover* de neurotransmissores, como a dopamina, serotonina, e noradrenalina (CLONINGER, 1987). Neste sentido, polimorfismos em genes relacionados à neurotransmissores têm sido identificados e suas associações com várias características de comportamento em humanos (REIF & LESCH, 2003) e em cães (TAKEUCHI et al., 2003; ITO et al., 2004) relatadas. Em cavalos, Momozawa et al. (2005) relataram a associação entre SNP no gene receptor de dopamina D4 (*DRD4*) e características de temperamento como curiosidade e vigilância.

O gene codificador de transportador de serotonina (*SLC6A4*) apresenta-se como candidato a influenciar características de comportamento em animais ao atuar no controle da reabsorção da serotonina nas fendas sinápticas (MOMOZAWA et al., 2006). Em humanos, um polimorfismo comumente encontrado na região promotora do gene foi associado à características como pessimismo, timidez, aflição e excesso de medo (LESCH et al., 1996). Posteriormente, estas associações foram confirmadas em estudos conduzidos por Murphy et al. (2004).

Em eqüinos, Momozawa et al. (2006) determinaram a seqüência e a localização cromossômica do gene *SLC6A4*, identificaram quatro SNPs, incluindo o AB_098561:c.1470G>A, entre as seqüências de uma dezena de cavalos Puro Sangue Inglês não relacionados. Os autores realizaram ainda estudos de associação entre os polimorfismos identificados e a característica ansiedade utilizando a mesma raça. Segundo estes, a característica ansiedade é considerada particularmente importante para eqüinos em diversas situações, incluindo equitação, treinamento e trabalho diário. Os resultados obtidos não indicaram associação entre os polimorfismos do gene *SLC6A4* e ansiedade na raça estudada. Entretanto, a não detecção de efeitos dos SNPs pode ter ocorrido em função do pequeno número de animais estudados (n= 67) e/ou da inadequada metodologia estatística empregada. Ademais, em razão de perdas de associação entre os marcadores e as características de interesse ao longo das gerações (já que muitas vezes os polimorfismos estudados não são os responsáveis diretos por alterações fenotípicas), de interações epistáticas diferentes entre o gene candidato e as bases genéticas de populações e raças distintas e da magnitude do efeito do gene candidato, resultados de associação não podem ser extrapolados para raça diferente da qual o efeito foi detectado. Antes disso, os resultados precisam ser confirmados ou validados na raça de interesse.

Em espécies como cães e humanos, genes do grupo HTR, entre os quais o *HTR1A* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A*), vêm se mostrando envolvidos em disfunções emocionais. Em eqüinos, estes genes são de especial interesse devido a sua suposta relação a distúrbios gastrointestinais decorrentes de alterações no sistema nervoso central e periférico, uma das principais causas de morte, levando a perdas econômicas consideráveis dentro de sistemas de produção (MOMOZAWA et al., 2007).

O produto codificado pelo gene *HTR1A* pertence a um grupo de receptores de proteínas e canais iônicos encontrados no sistema nervoso central e periférico, os quais medeiam tanto a neurotransmissão excitatória como a inibitória (HOYER et al., 1994). Os receptores de serotonina são ativados pelo neurotransmissor serotonina, que atua como seu ligante endógeno. Este receptor modula a liberação de vários neurotransmissores, incluindo a dopamina, adrenalina/noradrenalina e acetilcolina, assim como outros hormônios como ocitocina, vasopressina, cortisol e substância P. Tais receptores influenciam vários processos biológicos e neurológicos, como agressividade, ansiedade, aprendizagem, memória e termorregulação (NICHOLS & NICHOLS, 2008).

Em revisão bibliográfica (DRAGO et al., 2008) foram encontrados 27 SNPs associados ao gene *HTR1A* humano, sendo alguns destes causadores de trocas sinônimas e não sinônimas. Estas variações têm sido estudadas em transtornos psiquiátricos, todavia ainda sem resultados definitivos (DRAGO et al., 2008). Neste sentido, o polimorfismo AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* eqüino, identificado por meio de sequenciamento direto de produtos de PCR, pode apresentar alguma importância fisiológica em relação às características de comportamento ao ser responsável pela troca conservativa de um ácido glutâmico por ácido aspártico na posição 257 (Glu257Asp) da seqüência presumida de aminoácidos da cadeia polipeptídica do receptor de serotonina (MOMOZAWA et al., 2007).

Conceitos e parâmetros Genético-Populacionais

Freqüências alélicas e genotípicas

Para descrever a constituição genética de um grupo de indivíduos, seria necessário especificar seus genótipos e saber em que freqüência estes genótipos estariam representados. Esta seria uma descrição completa, se a natureza das diferenças fenotípicas entre os genótipos não fosse de interesse. Para simplificar, suponha-se que há interesse em certo loco autossômico A e que existam dois diferentes alelos para este loco, A_1 e A_2 , presentes entre os indivíduos. Então haveria,

considerando-se organismos diplóides, três genótipos possíveis A_1A_1 , A_1A_2 e A_2A_2 . A constituição genética do grupo seria completamente descrita pela proporção ou percentagem de indivíduos que pertencem a cada genótipo ou, em outras palavras, pelas freqüências dos três genótipos entre os indivíduos. Estas proporções ou freqüências são chamadas de freqüências genotípicas, mas a freqüência de um genótipo particular é a proporção ou percentagem desse genótipo entre os indivíduos. Uma população, no sentido genético, não é apenas um grupo de indivíduos, mas um grupo de indivíduos que se acasalam, e a genética de uma população refere-se não só à constituição genética dos indivíduos, mas também à transmissão dos genes de uma geração para a seguinte. Os genótipos dos pais são desfeitos, e um novo grupo de genótipos é constituído na progênie proveniente dos genes transmitidos pelos gametas. Os genes encontrados em populações têm, portanto, continuidade de geração para geração, o que não acontece com os genótipos nos quais eles aparecem. A constituição genética da população, com relação aos genes, que ela transporta, é descrita pela relação das freqüências alélicas, ou seja, pela especificação dos alelos presentes em cada loco. Se, por exemplo, A_1 é um alelo no loco A, a freqüência de A_1 é a proporção ou percentagem de A_1 , entre todos os alelos deste loco. A soma das freqüências de todos os alelos em loco qualquer perfaz a unidade, ou seja, 100%. As freqüências alélicas para um loco particular, em um grupo de indivíduos, podem ser determinadas por meio do conhecimento de suas freqüências genotípicas. Tome-se um exemplo hipotético, no qual são considerados dois alelos, A_1 e A_2 , e classificados 100 indivíduos, sendo 30 de genótipo A_1A_1 , 60 de genótipo A_1A_2 e 10 de genótipo A_2A_2 . Como cada indivíduo apresenta dois alelos, existem 200 alelos representativos nesse loco. Cada indivíduo A_1A_1 apresenta dois alelos A_1 , e cada indivíduo A_1A_2 apresenta um alelo A_2 . Desta forma, existem 120 alelos A_1 e 80 alelos A_2 na amostra. A freqüência de A_1 é, portanto 60% ou 0,6 e a freqüência de A_2 é 40% ou 0,4 (FALCONER, 1987).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O primeiro e mais simples modelo sobre o comportamento dos genes nas populações foi proposto em 1908, independentemente, por Hardy e Weinberg. Esse

modelo é conhecido como lei de Hardy-Weinberg e é aplicável a populações grandes de espécies de reprodução sexuada cruzada. As premissas são acasalamentos ao acaso e exclusão de fatores que alteram as frequências alélicas populacionais, como seleção, migração, deriva genética e mutação. Como consequência, as frequências genotípicas serão determinadas pelas frequências gênicas e, ambas, permanecerão constantes geração após geração, indefinidamente. Desta forma, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é a constância de frequências gênicas e genotípicas na população ao longo das gerações. A relação entre as frequências alélicas e frequências genotípicas é descrita matematicamente pela lei de Hardy-Weinberg. Sob as premissas de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas podem ser previstas a partir das frequências alélicas, pela expansão do binômio $(p + q)^2$ em que p é a frequência do alelo A_1 e q é a frequência do alelo A_2 . Assim, na condição de equilíbrio a frequência do genótipo A_1A_1 é igual a p^2 , do A_1A_2 é igual a $2pq$ e do A_2A_2 é igual a q^2 (FALCONER, 1987).

Neutralidade seletiva de Ewens-Watterson

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

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

Como as populações reais são finitas, pode haver perdas de alelos por deriva genética. O balanço entre esta e a mutação pode ser expresso pela proporção de homozigotos, pela soma de quadrados das frequências alélicas, ou pelo índice de

fixação. O modelo IAM admite que os homozigotos são autozigotos, em um genótipo homozigoto, as duas cópias do alelo têm origem em um único evento mutacional anterior. Então, para n alelos na população, tem-se:

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

Em que, F é o índice de fixação e N é o tamanho da população e μ é a taxa de mutação de alelos neutros (KIMURA, 1983, citado por HARTL & CLARK, 2006; NEI, 1973, 1987; WRIGHT, 1969, 1978).

Watterson (1978) mostrou que o índice de fixação F , definido como soma de quadrados das frequências alélicas, pode ser usado para teste estatístico. Primeiramente, é determinada a configuração esperada de frequências alélicas de k alelos e amostra de tamanho n . Depois, por processo de amostragem com modelo IAM, amostras são geradas aleatoriamente, e com os valores de F das amostras aleatórias é definido intervalo de confiança para o F esperado. Se o valor de F observado estiver dentro do intervalo de confiança, será considerado em concordância com o esperado na condição de seletividade neutra.

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

Objetivos

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

(1) A padronização de metodologia alternativa de genotipagem por PCR-RFLP para polimorfismos dos genes *PRKAG3* (AY_376689:c.773C>T), *CRISP1* (AJ_315378:c.110A>G) e *HTR1A* (AB_264325:c.771G>C) em detrimento do pirosequenciamento de produtos de PCR e sequenciamento direto de produtos de PCR,

de modo que possam ser realizados em laboratórios de Genética Molecular dotados de estrutura básica e tenham custos de genotipagem mais baixos, permitindo a democratização da utilização desses polimorfismos em trabalhos científicos que visem o melhoramento genético de eqüinos.

(2) A determinação do potencial de uso de polimorfismo de DNA de genes relacionados ao desenvolvimento muscular (AY_376689:c.773C>T - *PRKAG3*), fertilidade de machos (AJ_315378:c.110A>G - *CRISP1* e AAWR_02017454:g.121684T>C - *SPATA1*) e temperamento (AB_264325:c.771G>C - *HTR1A* e AB_098561: c.1470G>A - *SLC6A4*) em estudos de associação entre marcadores moleculares e características de interesse econômico na raça brasileira Mangalarga, por meio da estimativa de parâmetros genético-populacionais (frequências alélicas e genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg e neutralidade seletiva de Ewens-Watterson).

Referências

- ABCCRM – Associação Brasileira dos Criadores do Cavallo Mangalarga. **Ficha de registro dos animais** - CD – Rom, Dezembro de 2003.
- ALMEIDA PRADO, R. S. 2005. **Parâmetros populacionais em cavalos da raça Mangalarga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; et al. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CIOBANU, D.; BASTIAANSEN, J.; MALEK, M.; et al. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. **Genetics**, v. 159, p. 1151– 1162, 2001.
- CLONINGER, C.R. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. **Science**, v. 236, p. 410-416, 1987.
- COHEN, D.J.; ELLERMAN, D.A.; CUASNICU , P.S. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 462–468, 2000.
- COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 195-205.
- CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper International Edition, 1970. 591p.

- DIAS, I. M. G. 1999. **Formação e estrutura populacional em eqüinos da raça Brasileiro de Hipismo**. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- DRAGO, A.; RONCHI, D.D.; SERRETTI, A. 5-HT_{1A} gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 5, p. 701-21, 2008.
- EVANS, J.W. **Horses: a guide to selection, care and enjoyment**. Ed. WH Freeman and company, EUA, 2a. edição, 1996. 797p.
- EWENS, W. J. The sampling theory of selectively neutral alleles. **Theoretical Population Biology**, v. 3, p. 87-112. 1972.
- FAO - GLIPHA, 2006 – Global Livestock Production and Health Atlas. Disponível em www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp . Acesso janeiro de 2008.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Tradução por Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, 1987. 279p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.
- FUERST, P. A.; CHAKRABORTY, R.; NEI, M. Statistical studies on protein polymorphism in natural populations i. distribution of single locus heterozygosity. **Genetics** , v.86, p. 455-83, 1977.
- GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; et al. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. **Gene**, v. 292, p. 65–72, 2002.
- GIESECKE, K.; HAMANN, K.; STOCK, K. F. Evaluation of *SPATA1*- associated markers for stallion fertility. **Animal Genetics**, v.40, p.359–365, 2009.
- GOLLOB, M. H.; GREEN, M. S.; TANG, A. S. et al. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1823–1831, 2001.
- GUIMARÃES, P.E.M.; COSTA, M.C.R. SNPs: Surtis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.
- HAMILTON, S. R.; STAPLETON, D.; O'DONNELL, J. B.; et al. An activating mutation in the gamma1 subunit of the AMP-activated protein kinase. **FEBS Lett** v. 500, p. 163–168, 2001.
- HALEY, C.S. Livestock QTL - bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, v. 11, n. 12, p. 488-492, 1995.
- HARDIE, D. G.; CARLING, D.; CARLSON M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 821–855, 1998.
- HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell? **European Journal Biochemistry**, v. 246, p. 259–273, 1997.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. 2006. **Principles of Population Genetics**. 4th ed. Sanderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2006, 517p, ISBN: 9780878933068.
- HOLMES, B. F.; KURTH-KRACZEK, E. J.; WINDER, W.W. Chronic activation of 5)-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, p. 1990–1995, 1999.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacology Review**, v. 46, n. 2, p. 157-203, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário. Disponível em www.ibge.gov.br, acesso em dezembro de 2007.

ITO, H., NARA, H., INOUE-MURAYAMA, M., et al. Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, p. 815-820, 2004.

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

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

KEMP, B. E.; MITCHELHILL, K. I.; STAPLETON, D.; et al. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. **Trends Biochemistry Science**, v. 24, p. 22–25, 1999.

LANSADE, L., BOUISSOU, M.F., BOIVIN, X. 2006. Predicting the temperament of horse. INRA-CNRS-haras nationaux, Université de Tours Joint Research, Unit for reproductive and behavioural physiology. Disponível em www.international.inra.fr/layout/set/print/press/predicting_the_temperament_of_horse Acesso em março de 2008.

LESCH, K.P.; BENGEL D.; HEILS, A.; et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, v. 274, p. 1527-31, 1996.

L'HÔTE, D.; SERRES, C.; LAISSUE, P.; et al. Centimorgan-range onestep mapping of fertility traits using interspecific recombinant congenic mice. **Genetics**, v. 176, p. 1907–1921, 2007.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, ESALQ/USP, 250 p., 2006.

MAHLAPUU, M.; JOHANSSON, C.; LINDGREN, K.; et al. Expression profiles representing the α -subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggest a major role for $\alpha 3$ in white skeletal muscle fibers of mammals. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 02, p. 194-200, 2003.

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

MILAN, D.; JEON, J. T.; LOOFT, C.; et al. A Mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. **Science**, v. 288, p. 1248-1251, 2000.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; KUSUNOSE, R.; et al. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 538–544, 2005.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; et al.; Polimorphism identification, RH mapping, and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (*SLC6A4*) gene. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 68, n. 6, p. 619-621, 2006.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T. et al. SNP detection and radiation hybrid mapping horses of nine candidate genes for temperament. **Animal Genetics**, v. 38, p. 81-91, 2007.

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

- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S. Estudo genético da pontuação total em equinos da raça Mangalarga. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 205, p. 25-30, 2005.
- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S.; MADUREIRA, D. G. F. Estimativa de parâmetros genéticos para deslocamento em cavalos da raça Mangalarga. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, p. 207-210, 2006.
- MOTA, M. D. S.; GIANNONI, M. A. Efeitos genéticos e de ambiente sobre alguns caracteres de locomoção e desenvolvimento em equinos da raça Mangalarga. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 512, p. 191-196, 1994.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MURPHY, D. L.; LERNER, A.; RUDNICK, G.; et al. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. **Molecular Interventions**, v. 4, n. 02, p. 109-123, 2004
- NAKAYA, H. L.; AMARAL, P. P.; LOURO, R.; et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. **Genome Biology**, v. 8, p. 43, 2007.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.
- NICHOLS, D.E.; NICHOLS, C.D. Serotonin receptors. **Chemical Review**, v. 108, n. 5, p. 1614-1641, 2008.
- NIELSEN, J. N.; MUSTARD, K. J.; GRAHAM, D. A.; et al. AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, p. 631-641, 2003.
- O'BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 58, p. 1124-1151, 1991.
- PARK, H. B.; MARKLUND, S.; JEON, J. T.; MICKELSON, J. R.; et al. Molecular characterization and mutational screening of the PRKAG3 gene in the horse. **Cytogenetic Genome Research**, v. 102, p. 211-216, 2003.
- PROCÓPIO, A. M.; BERGMANN, J. A. G.; COSTA, M. D. Formation and demographic structure of the Campolina horse breed. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n.3, 2003.
- REGITANO, L. C. A. **Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim**. 1996. 132p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- REIF, A. ; LESCH, K. P. Toward a molecular architecture of personality. **Behavioural Brain Research**. v. 139, p. 1-20, 2003.
- ROCHA, J. L.; BAKER, J. F.; WOMACK, J. E.; et al. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3360-3370, 1992.
- ROCHA, J.L.; SANDERS, J.O.; TAYLOR, J.F. Genetic markers to manipulate QTL: The additive illusion. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 72. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 250, 1994.

STICKBERGER, M.W. Genetics. 3rd. Macmillan, New York. ISBN 978-0-02-418070-4 em: Allele frequency: Allele frequency, 1985

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

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

TAKEUCHI, Y.; HOUP, K. A. Sequences and polymorphisms of the canine monoamine transporter genes SLC6A2, SLC6A3, and SLC6A4 among five dog breeds. **Veterinary Clinics of North America**, v. 33, p. 345-363, 2003.

TAVEIRA, R. Z.; MOTA, M. D. S. Genetic and quantitative evaluation of breeding traits in Thoroughbred mares. **Revista electronica de veterinaria**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2007.

VAZ PORTUGAL, A. Sistemas de produção de alimentos de origem animal no futuro. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 63-70, 2002.

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

TRABALHO 1 - Polimorfismos de genes candidatos para desempenho muscular e fertilidade de machos em eqüinos da raça brasileira Mangalarga

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem do SNP AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3* eqüino, relacionado a performance muscular, por PCR-RFLP, bem como a caracterização em eqüinos da raça brasileira Mangalarga deste e de outro polimorfismo, o AAWR_02017454:g.121684T>C do *SPATA1*, relacionado à fertilidade de machos, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características de interesse na raça. Para tanto, foram utilizados 151 animais Mangalarga, de ambos os sexos e de idades variadas, representativos da população do Estado de São Paulo. O método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem do SNP AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3* eqüino. Entretanto, tal polimorfismo provavelmente não ocorre em eqüinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador. As estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para o polimorfismo AAWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* na amostra estudada demonstraram a possibilidade de realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao sistema reprodutivo masculino.

Palavras-chaves: *Equus caballus*, *PRKAG3*, SNP, *SPATA1*

Abstract

The aims of the present study were to propose an alternative genotyping method for the AY_376689:c.773C>T SNP in the equine *PRKAG3* gene, related to muscle performance, by PCR-RFLP, as well as to characterize this SNP and a second

polymorphism, AAWR_02017454:g.121684T>C (or BIEC2-968854) of the *SPATA1* gene, related to male fertility, in Mangalarga horses, in order to provide a basis for future studies investigating the association between markers and traits of interest in this breed. For this, 151 Mangalarga horses of both sexes, representatives of the population of the State of São Paulo, Brazil, were used. PCR-RFLP was found to be adequate for the genotyping of the AY376689:c.773C>T SNP of the *PRKAG3* gene. However, this polymorphism probably does not occur in Mangalarga horses, a fact impairing association studies with muscle performance traits. The estimative of the population genetic parameters obtained for the AAWR_02017454:g.121684T>C polymorphism of the equine *SPATA1* gene in the sample studied demonstrated the possibility of association studies between this marker and traits related to male fertility.

Key-words: *Equus caballus*, *PRKAG3*, SNP, *SPATA1*

Introdução

O diversificado uso dos cavalos da raça brasileira Mangalarga (trabalho com fazenda de gado, enduros, esportes eqüestres não especializados, equoterapia, enduro eqüestre) de certa maneira dificultou a clara definição dos critérios a serem incluídos em programas de seleção. Entretanto, independentemente da modalidade contemplada algumas características serão sempre importantes, entre as quais a musculosidade e a fertilidade.

Neste sentido, a caracterização da variabilidade de genes relacionados a estas características é o primeiro passo em direção à seleção assistida por marcadores, a qual certamente auxiliaria os criadores em suas tomadas de decisão acerca de quais animais encaminhar para reprodução. Em eqüinos, trabalhos têm reportado a relação dos genes *protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit (PRKAG3)*, localizado no cromossomo eqüino 6, e *spermatogenesis associated 1 (SPATA1)*, localizado no cromossomo eqüino 5, com as fisiologias do desempenho muscular (PARK et al., 2003) e da fertilidade de machos (GIESECKE et al., 2009), respectivamente.

Os objetivos do presente trabalho foram a proposição de método alternativo de genotipagem do SNP AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3* eqüino por meio da técnica de PCR-RFLP, bem como a caracterização em eqüinos Mangalarga deste e de um segundo, o AAWR_02017454:g.121684T>C (ou BIEC2-968854) do gene *SPATA1*, a fim de que se tenha o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores e características de interesse na raça.

Material e métodos

Animais e genotipagem

Amostras de cinco mL de sangue total, de 151 cavalos da raça Mangalarga de ambos os sexos, representativos da população do Estado de São Paulo/Brasil, foram colhidas de acordo com a legislação brasileira para o bem-estar animal (protocolo nº 111/2008 expedido pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu/SP – Brasil). Após a remoção das hemácias das amostras de sangue, a extração do DNA dos leucócitos foi realizada pelo método não fenólico, utilizando digestão com proteinase K e precipitação com NaCl e álcool (SAMBROOCK et al., 1989).

As genotipagens dos polimorfismos dos genes *PRKAG3* e *SPATA1* foram conduzidas por meio da técnica de PCR-RFLP. A amplificação de um fragmento de 182 pares de bases do éxon oito do gene *PRKAG3* foi realizada com os *primers* descritos por Park et al. (2003). As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer*, 1x PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 50 mM KCl], 1,2 mM MgCl₂, 0,24 mM de dNTPs e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). Após desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, a amplificação foi realizada em 34 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 66 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi conduzida a 72 °C por 5 minutos. Alíquotas de 10µL de produtos de amplificação foram digeridas com 5,5 U da enzima de restrição *AluI* (New England Biolabs, EUA) a 37 °C por 16 horas. A análise do polimorfismo do gene *SPATA1*, a qual envolveu a amplificação de fragmento de 523

pares de bases do intron seis e digestão com a enzima *RsaI* (New England Biolabs, EUA), foi realizada de acordo com Giesecke et al., (2009). Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA dos genes *PRKAG3* e *SPATA1* foram separados em géis de agarose a 3% de alta resolução e em géis de agarose a 2%, respectivamente. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases foi utilizado para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos, os quais foram visualizados por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. Os genótipos dos indivíduos foram determinados por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Análise dos dados

Com base nos genótipos identificados, frequências alélicas e genotípicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg foram obtidos para cada polimorfismo usando o programa PopGene 1.32 (YEH et al., 1999). A neutralidade seletiva foi avaliada de acordo com o teste do parâmetro F de Ewens-watterson, com os programas PopGene 1.32 e Pypop (LANCASTER et al., 2007). O PopGene 1.32 estabeleceu um intervalo de confiança para F e o Pypop verificou a significância do desvio-padrão entre os valores de F , esperado e observado, pelo teste exato de Slatkin (SLATKIN, 1996).

Resultados e discussão

Polimorfismo do gene PRKAG3

Com respeito ao polimorfismo AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3*, o genótipo CC evidenciou-se como único na população, sendo caracterizado pela presença de três fragmentos de 118, 45 e 19 pb. Entretanto, nas condições de eletroforese utilizadas, não foi possível a visualização do fragmento de 19 pb. De acordo com o mapa de restrição, o genótipo TT seria caracterizado pela presença de quatro fragmentos de 79, 45, 39, e 19 pb, e o heterozigoto pela presença de cinco fragmentos correspondentes à combinação dos dois padrões homozigotos.

Na Figura 1, página 32, está apresentado o padrão de bandas observado para os indivíduos de genótipo CC do SNP do gene *PRKAG3*, após eletroforese em gel de agarose.

A provável inexistência do SNP na Mangalarga indica que polimorfismos que segregam com alta frequência do alelo menor em determinadas raças podem segregar com baixa frequência do alelo menor ou não segregar em outras. De acordo com Van Eenennaam et al. (2007), as distribuições alélicas são tão importantes quanto o tamanho da amostra na detecção dos efeitos de polimorfismos gênicos sobre características de interesse. Isto decorre do fato de que nos estudos de associação o número de indivíduos dos grupos a serem comparados, ou seja, de genótipos diferentes, está relacionado com as frequências alélicas. Além disto, a ocorrência do alelo favorável de um polimorfismo em uma população tem relação inversa com o seu potencial de incremento em programas de melhoramento.

Em razão da ausência do polimorfismo na amostra de animais estudados, não foi possível a realização das análises estatísticas propostas.

O método de PCR-RFLP apresentou-se eficaz, de baixo custo e apropriado para laboratórios dotados de estrutura básica em equipamentos e reagentes quando comparado ao método utilizado por Park et al. (2003), o que permitirá a expansão da análise desse polimorfismo nas raças em que ocorra. Estes autores encontraram o alelo T do SNP AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3* apenas em animais de raças pesadas (Belga) e moderadamente pesadas (Trotador Suéco, Fjord e Warmblood Suéco), mas não em cavalos de raças leves selecionadas para performances de velocidade (Standardbred, Puro Sangue Inglês e Quarto de Milha). Assim, a sua não ocorrência na amostra de animais estudados era esperada.

O fato da ausência do SNP na Mangalarga inviabilizará estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça, fazendo-se necessária a utilização de outros polimorfismos já descritos para o gene ou a busca por novos na sequência de DNA da raça. Embora o polimorfismo AY_376689:c.773C>T mereça destaque por ser responsável pela troca de um aminoácido prolina por leucina na posição 258 (Pro258Leu) da cadeia polipeptídica em região altamente conservada entre genes AMPK γ , não foi o único identificado por Park et al. (2003). Outros seis, sendo

quatro também causadores de substituição de aminoácidos, foram encontrados em prospecção em raças com fenótipos contrastantes para desenvolvimento muscular e desempenho.

Polimorfismo do gene SPATA1

Com respeito ao SNP BIEC2-968854 do gene *SPATA1* eqüino, foram detectados, na amostra de animais estudada, os alelos T e C. Indivíduos de genótipo TT foram caracterizados pela presença de três fragmentos de restrição com 266, 177 e 80 pb, e de CC pela presença de dois fragmentos com 444 e 80 pb. Por sua vez, os heterozigotos (CT) apresentaram fragmentos com 444, 266, 177 e 80 pb, (Figura 2, página 33).

As distribuições alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *SPATA1* na Mangalarga foram 0,64 para o alelo C e 0,36 para o T. Estes resultados divergem dos relatos por Giesecke et al. (2009) que, em eqüinos da raça Hanoveriana, encontraram menor freqüência do alelo C (0,41) em comparação ao T. Em relação às freqüências genotípicas observou-se 0,40 para CC, 0,48 para CT e 0,12 para TT. As freqüências alélicas distintas observadas para o polimorfismo do gene *SPATA1* entre a Mangalarga e a Hanoveriana podem ser decorrentes da seleção para fenótipos divergentes. Em contrapartida à seleção indireta, podem representar apenas efeito de deriva genética. Da mesma forma que no trabalho de Giesecke et al. (2009) com população da raça Hanoveriana, o valor do Qui-Quadrado calculado (0,18) foi menor que o tabelado (3,84), indicando que a população em estudo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco em questão. No teste de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson, o valor de F observado (0.537), foi não significativo a 5% ($p= 0.089$), estando dentro do intervalo de 0.5-0.99 (intervalo de F com 95% de confiança, obtido com um milhão de simulações), indicando ausência de indício forte de acasalamentos preferenciais ou de seleção em favor de um dos alelos. No entanto, este valor está muito próximo ao limite inferior e foi significativo a 10%. Neste sentido, embora a população de Mangalarga estudada esteja em equilíbrio para o loco *SPATA1*, o teste de neutralidade seletiva não

excluiu definitivamente o potencial de aplicação do marcador em estudos de associação com características de importância na raça.

Apesar de localizado em região de íntron, análise *in silico* demonstrou que o SNP BIEC2-968854 apresenta potencial para afetar a regulação gênica, uma vez que a substituição do nucleotídeo T por C (T>C) cria um sítio de ligação para o fator de transcrição SP1 (GIESECKE et al., 2009). Mesmo que, por meio de ensaios biológicos, ocorra a confirmação *in vivo* do efeito regulatório da alteração do gene *SPATA1*, devido à interações epistáticas diferentes entre genes candidatos e as bases genéticas de populações e raças distintas, os resultados de associação encontrados na Hanoveriana por Giesecke et al. (2009) não podem ser imediatamente extrapolados para as demais. Neste sentido, antes de transpor marcadores das populações em que foram identificados, é fundamental a corroboração dos seus efeitos sobre as características de interesse em diferentes raças e ambientes (BARENDSE, 2005), em processo conhecido como validação. Esta necessidade abre a possibilidade de estudos futuros na raça Mangalarga, entre outras.

Conclusões

O método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem do SNP AY_376689:c.773C>T do gene *PRKAG3*. Entretanto, tal polimorfismo provavelmente não ocorre na Mangalarga, inviabilizando estudos de associação com características de desempenho muscular na raça.

Em conjunto, as estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidas para o polimorfismo AAWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* eqüino na amostra estudada evidenciou a possibilidade de realização de pesquisas objetivando a associação entre o marcador e características de interesse na raça Mangalarga.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Fundunesp pelo suporte financeiro concedido. Aos criadores, representados na pessoa de Raul Sampaio Almeida Prado, pela disponibilização dos animais para a pesquisa.

Referências

- BARENDSE, W. J. The transition from quantitative trait loci to diagnostic test in cattle and other livestock. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, p. 831-836, 2005.
- GIESECKE, K., HAMANN, K., and STOCK, K.F. Evaluation of *SPATA1*- associated markers for stallion fertility. **Animal Genetics**, v.40, p. 359–365, 2009.
- LANCASTER, A. K., SINGLE, R. M., SOLBERG O. D., et al. PyPop update - a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. **Tissue Antigens**, v.69, s. 1, p. 192-197, 2007.
- PARK, H. B., MARKLUND, S., JEON, (2003). Molecular characterization and mutational screening of the PRKAG3 gene in the horse. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 211–216, 2003.
- SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **New York: Cold Spring Harbor laboratory Press**, 545 p, 1989.
- SLATKIN, M. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. **Genetic Research**, v. 68, p. 259-260, 1996.
- VAN EENENNAAM, A.L., LI, J., THALLMAN, R.M. et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 891–900, 2007.
- YEH, F. C., YANG, R. C., BOYLE, T. Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada, 1999.

FIGURAS

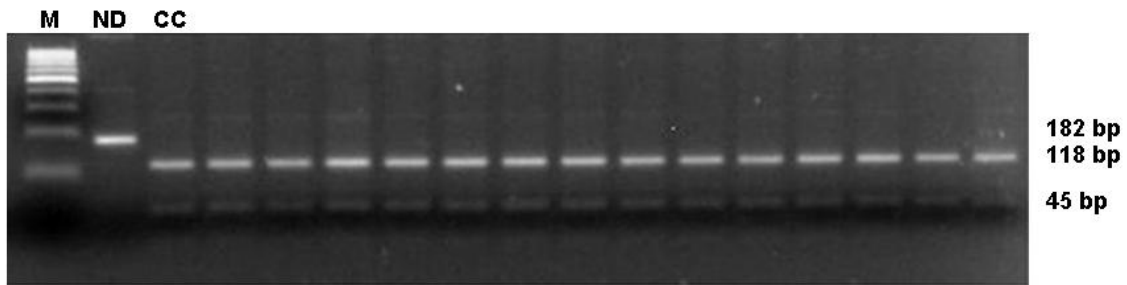


Figura 1 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% de alta resolução para o polimorfismo AY376689:c.773C>T do gene *PRKAG3* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *AluI* (182 pb) e CC o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *AluI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

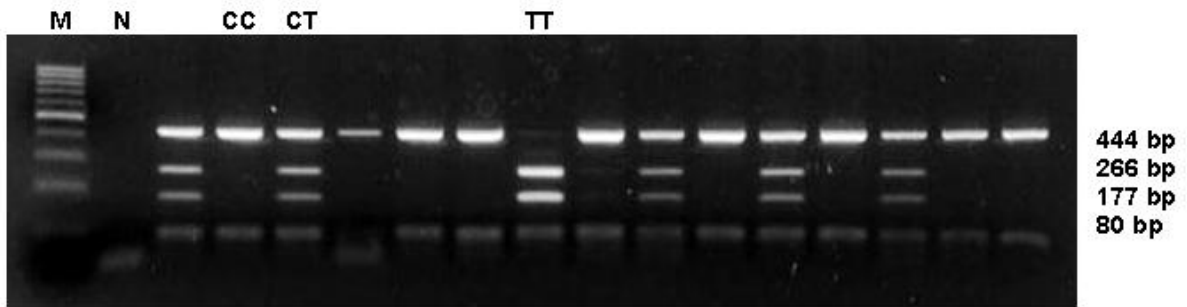


Figura 2 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AWR_02017454:g.121684T>C do gene *SPATA1* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, N o controle negativo de amplificação e CC, CT e TT, os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *RsaI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

TRABALHO 2 - Caracterização da variabilidade de genes relacionados à fertilidade de machos e ao temperamento em eqüinos da raça Mangalarga

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs AJ_315378:c.110A>G e AB_264325:c.771G>C dos genes *CRISP1* e *HTR1A* eqüino, respectivamente, bem como a caracterização em eqüinos da raça Mangalarga destes e de outro polimorfismo, o AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4*, a fim de promover o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características de interesse na raça. Para tanto, foram utilizados 151 animais Mangalarga, de ambos os sexos e de idades variadas, representativos da população do estado de São Paulo. O método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem dos SNPs AJ315378:c.110A>G do *CRISP1* e AB_264325:c.771G>C do *HTR1A*. Entretanto, o polimorfismo do *CRISP1* provavelmente não ocorre em eqüinos Mangalarga, impossibilitando estudos de associação do marcador com características relacionadas à fertilidade de machos. As estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AB_264325:c.771G>C do *HTR1A* e o AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* na amostra de animais estudados desencorajam a realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao temperamento.

Palavras- chaves: cavalos, *CRISP1*, *HTR1A*, polimorfismos, *SLC6A4*

Abstract

The aims of the present study were to propose a PCR-RFLP genotyping method for the AJ_315378:c.110A>G and AB_264325:c.771G>C SNPs in the equine *CRISP1* and *HTR1A* genes, respectively, as well as to characterize these and another polymorphism, AB_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* gene, in order to provide a basis for future studies investigating the association between DNA markers and traits of interest in this

breed. For this, 151 Mangalarga horses of both sexes, representatives of the population of the State of São Paulo, Brazil, were used. PCR-RFLP was found to be adequate for the genotyping of the SNPs AJ_315378:c.110A>G of the *CRISP1* and AB_264325:c.771G>C of the *HTR1A*. However, the polymorphism of the *CRISP1* probably does not occur in Mangalarga horses, a fact impairing association studies of this marker with traits related to male fertility. The estimative of the population genetic parameters obtained for the polymorphisms AB_264325:c.771G>C of the *HTR1A* and AB_098561:c.1470G>A of the *SLC6A4* in the studied sample discourage the conduct of research addressed the association between markers and traits related to temperament.

Keywords: *CRISP1*, horses, *HTR1A*, polymorphisms, *SLC6A4*

Introdução

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

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

codificadores, entre os quais o *CRISP1* (*cysteine-rich secretory protein 1 gene* – também conhecido como *AEG1*), mapeado no cromossomo eqüino 20, candidatos para a característica fertilidade de machos (GIESE et al., 2002).

Definido como o conjunto de características comportamentais estáveis ao longo do tempo e entre situações, o temperamento geral é qualidade fundamental no cavalo de sela. Animais com bom temperamento são obedientes, fáceis de treinar, calmos e confiáveis (EVANS, 1996). De acordo com Murphy et al. (2008), a literatura científica recente vem explicando os importantes papéis dos receptores e do transportador de serotonina nas funções que esta desempenha como neurotransmissor e neuromodulador nos processos neuroquímicos, fisiológicos, farmacológicos e comportamentais. Em espécies como a humana e a canina, genes do grupo de receptores de serotonina (HTR), localizado no cromossomo eqüino 21, entre os quais o *HTR1A* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A gene*), vêm se mostrando envolvidos em disfunções emocionais. Em eqüinos, estes genes são de especial interesse devido à suposta relação entre seus produtos protéicos e distúrbios gastrointestinais decorrentes de alterações no sistema nervoso central e periférico, uma das principais causas de morte, levando a perdas econômicas consideráveis dentro de sistemas de produção (MOMOZAWA et al., 2007). Por sua vez, o gene *SLC6A4* (*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 gene*), mapeado no cromossomo eqüino 11, codificador do transportador de serotonina, é forte candidato a influenciar características de temperamento em animais ao atuar no controle da reabsorção da serotonina nas fendas sinápticas (MOMOZAWA et al., 2006).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram a padronização de metodologia alternativa de genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs AJ_315378:c.110A>G e AB_264325:c.771G>C dos genes *CRISP1* e *HTR1A* eqüino, respectivamente, bem como a caracterização em eqüinos da raça Mangalarga destes e de outro polimorfismo, o AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4*, a fim de que se tenha o embasamento necessário para futuras pesquisas visando associação entre marcadores de DNA e características relacionadas à fertilidade de machos e de temperamento na raça.

Material e métodos

Animais e coleta de sangue

Foram utilizados 151 cavalos da raça Mangalarga registrados na Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga (ABCCRM), de ambos os sexos e de idades variadas, representativas da população do Estado de São Paulo/Brasil. Amostras de cinco mL de sangue total de cada indivíduo foram colhidas por venipunctura da jugular esquerda utilizando tubos a vácuo com EDTA. Os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira para o bem-estar animal (protocolo nº 111/2008 expedido pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu/SP – Brasil).

Extração do DNA e genotipagem

Após a remoção das hemácias das amostras de sangue, a extração de DNA dos leucócitos foi realizada pelo método não fenólico, utilizando digestão com proteinase K e precipitação com NaCl e álcool (SAMBROOCK, 1989). Ao final do procedimento, o DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1% e diluído para a concentração de trabalho de 10 ng/uL.

A genotipagem dos polimorfismos AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1*, AB_264325:c.771G>C do *HTR1A* e AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* foram realizadas por meio da técnica de PCR-RFLP, sendo que para os dois primeiros de forma inédita. Os *primers* necessários à amplificação das regiões gênicas de interesse, as enzimas de restrição utilizadas na detecção dos polimorfismos, bem como outras informações de relevância encontram-se apresentados na Tabela 1, página 47.

Na análise do SNP AJ_315378:c.110A>G do *CRISP1*, fragmento de 910 pares de bases contendo seqüência do exon 3 foi amplificado de acordo com Giese et al. (2002). A análise *in silico* do mapa de restrição da região amplificada, realizada por

meio do programa *online* Webcutter 2.0, mostrou a possibilidade de genotipagem do polimorfismo utilizando a endonuclease *BseNI*. Neste sentido, os amplificadores foram digeridos em meio de reação contendo 12µL de produto de PCR e 5U da enzima *BseNI* (Fermentas, EUA). As misturas para digestão foram incubadas em termociclador a 65 °C por 14 horas.

Após análise *in silico* do mapa de restrição da seqüência que contém o polimorfismo AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* eqüino, realizada com o Webcutter 2.0, constatou-se a possibilidade de sua genotipagem por meio da endonuclease *AluI*. Fragmento de 432 pares de bases da região codificante do gene foi amplificado utilizando par de *primers* confeccionados com auxílio do programa Primer 3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000). A averiguação da qualidade dos óligos em relação à formação de *hairpins*, dímeros e dímeros cruzados foi realizada utilizando o programa NetPrimer *online*. A confirmação de que cada seqüência iniciadora era única para o gene alvo na espécie de interesse foi realizada utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI. Cada PCR, com volume final de 25 µL, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,24 µM de cada *primer*, 1,6mM de MgCl₂; 0,24 mM de cada dNTP e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Após desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, a amplificação foi realizada em 36 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 54 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi conduzida a 72 °C por 5 minutos. Alíquotas de 10µL de produtos de amplificação foram digeridas com 4 U da enzima *AluI* (New England Biolabs, EUA) a 37 °C por 16 horas.

Em relação à análise do polimorfismo AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4*, fragmento de 359 pares de bases da região codificante do gene foi amplificado e digerido com a enzima de restrição *HhaI* (New England Biolabs, EUA), como em Momozawa et al. (2006).

Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA dos genes *CRISP1*, *HTR1A* e *SLC6A4* foram separados em géis de agarose a 2, 2 e 3%, respectivamente. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. A visualização das bandas foi realizada por meio de coloração com brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para

cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Análise dos dados

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

Resultados

Considerando-se o polimorfismo AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* eqüino, apenas o alelo A foi encontrado. O genótipo AA foi caracterizado pela presença de três fragmentos de 761, 85, 64 pb, sendo que a visualização do fragmento menor não foi possível na condição de eletroforese realizada. Com base no mapa de restrição do fragmento amplificado, o genótipo GG seria caracterizado pela presença de quatro bandas com 552, 209, 85 e 64 pb, e o heterozigoto (AG) pela presença de cinco fragmentos, correspondentes à combinação dos padrões dos homozigotos. Na Figura 1, página 50, está apresentado o padrão de bandas observado para os indivíduos de genótipo AA.

Para o polimorfismo AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A*, foram encontrados os alelos C e G. O genótipo GG foi caracterizado pela presença de dois fragmentos com 268 e 164 pb. Por sua vez, o genótipo heterozigoto CG foi caracterizado pela presença de três fragmentos com 432, 268, 164 pb. De acordo com o mapa de restrição, o genótipo CC, não identificado no conjunto de animais analisado, seria caracterizado pela presença de um fragmento contendo 432 pb. Na Figura 2, página 51,

está apresentado o padrão de bandas obtido para os genótipos encontrados para o polimorfismo do *HTR1A*.

Em relação ao polimorfismo AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4*, foram detectados os alelos A e G. O genótipo GG foi caracterizado pela presença de dois fragmentos com 302 e 57 pb. O genótipo heterozigoto AG foi caracterizado pela presença de três fragmentos de 359, 302 e 57 pb, e o genótipo AA, não identificado na população estudada, seria, de acordo com o mapa de restrição, caracterizado pela presença de fragmento único contendo 359 pb. Na Figura 3, página 52, encontra-se apresentado o padrão de bandas obtido para os dois genótipos identificados do polimorfismo do *SLC6A4*.

Na Tabela 2, página 48, estão apresentadas as frequências alélicas e genotípicas observadas para os três polimorfismos analisados. O alelo A do polimorfismo do gene *CRISP1* equino apresentou-se fixo na amostra de animais estudada, em que apenas animais de genótipo AA foram encontrados. Em relação ao polimorfismo do *HTR1A*, o alelo G, quase fixado, prevaleceu sobre o C. De forma semelhante, o alelo maior (G) do SNP do *SLC6A4* apresentou frequência extremamente alta quando comparado ao alelo menor (A). Assim, para ambos os polimorfismos, os genótipos GG apresentaram frequências altas em relação aos genótipos heterozigotos. Os homozigotos para os alelos menores (CC e AA para os polimorfismos do *HTR1A* e *SLC6A4*, respectivamente) não foram observados.

Com respeito ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores de Qui-quadrado calculado para os genótipos dos polimorfismos do *HTR1A* e *SLC6A4* (0,034 e 1,075, respectivamente) foram menores que o tabelado (3,84), não apresentando significância a 5%.

Os resultados obtidos para o teste de significância de Slatkin para a neutralidade seletiva de Ewens-Watterson para os polimorfismos dos genes *HTR1A* e *SLC6A4* encontram-se apresentados na Tabela 3, página 49. Para ambos os polimorfismos o resultado foi não significativo ($p = 0,666$ para AB_264325:c.771G>C do *HTR1A*; $p = 0,386$ para AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4*).

Discussão

Polimorfismo do CRISP1

Giese et al. (2002) analisaram por meio de seqüenciamento direto de produtos de PCR a ocorrência de diversidade no gene *CRISP1* de eqüinos em 16 cavalos de nove raças (Hanoveriana, Haflingo, Shire-Horse, Knabstrupper, Shagya Árabe, Pôneis, Pôneis Shetland, Irish Tinker e Lusitano) e encontraram vários polimorfismos, incluindo o AJ_315378:c.110A>G, estudado no presente trabalho, o qual apresenta potencial para provocar alterações fenotípicas por acarretar modificação não conservativa na seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Este sítio polimórfico está localizado no éxon 3 e é responsável pela troca de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 37 (Glu37Gli) da proteína CRISP1.

Não foram encontrados na literatura relatos de freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* em eqüinos Mangalarga ou de qualquer outra raça, impossibilitando a comparação com os dados obtidos no presente trabalho. Os resultados aqui apresentados demonstraram a provável ausência do polimorfismo do gene *CRISP1* em eqüinos Mangalarga. Entre as possíveis explicações para o fato tem-se que a população fundadora da raça poderia ser homozigota para este loco em particular, ou que a fixação do alelo A possa ter ocorrido posteriormente em razão de seleção indireta. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da rara ocorrência do alelo G na raça, o que poderia ser confirmado com amostragens mais amplas.

Embora a provável inexistência do SNP na Mangalarga não permita estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça, o método de PCR-RFLP mostrou-se eficaz, de baixo custo e apropriado para laboratórios dotados de estrutura básica em equipamentos e reagentes, o que permitirá a expansão da análise desse polimorfismo nas raças em que ocorra. Entretanto, para a realização de estudos de associação com o *CRISP1* na Mangalarga, faz-se necessário o estudo da segregação de outros polimorfismos já descritos para o gene ou a busca por novos na seqüência de DNA da raça. Apesar de gene candidato para a característica fertilidade

de machos, não foram encontrados na literatura resultados de estudos de associação entre polimorfismos do gene *CRISP1* e aspectos reprodutivos em eqüinos. Por outro lado, outros genes da mesma família foram recentemente estudados com relação à suas associações com fertilidade em eqüinos e em humanos. Hamann et al. (2007) identificaram SNP não sinônimo no gene *CRISP3*, com efeito significativo sobre a fertilidade de garanhões. Em humanos, Jamsai et al. (2008) identificaram três SNPs não sinônimos no gene *CRISP2*. Embora nenhum dos polimorfismos identificados tenha mostrado associação significativa com infertilidade, estudos funcionais sugerem que o polimorfismo responsável pela troca de aminoácidos na posição 196 possa comprometer a função protéica.

Polimorfismo do HTR1A

Na busca por polimorfismos no gene *HTR1A* eqüino, Momozawa et al. (2007) seqüenciaram o cDNA proveniente do cérebro de 10 cavalos Puro Sangue Inglês não relacionados geneticamente e encontraram duas trocas não sinônimas de nucleotídeos com algum potencial de provocar alterações fenotípicas, entre as quais a conservativa AB_264325:c.771G>C, aqui estudada. Este polimorfismo do *HTR1A* pode apresentar importância fisiológica em relação às características de comportamento ao ser responsável pela troca de um ácido glutâmico por ácido aspártico na posição 257 (Glu257Asp) da seqüência presumida de aminoácidos da cadeia polipeptídica do receptor de serotonina de eqüinos.

Da mesma forma que para o polimorfismo do *CRISP1*, o método de PCR-RFLP apresentou-se apropriado para a genotipagem do SNP AB_264325:c.771G>C do *HTR1A*, o que permitirá a expansão da análise desse polimorfismo em cavalos.

Não foram encontrados relatos de freqüências alélicas e genotípicas para o SNP AB_264325:c.771G>C do *HTR1A* em eqüinos. A extremamente alta freqüência do alelo G deixa evidente o pequeno potencial de aplicação deste marcador em estudos de associação. Isto se deve ao fato de que caso o alelo G fosse favorável para características de temperamento, já estaria muito perto de estar fixado. Se, por outro lado, o alelo C trouxesse alguma vantagem, provavelmente se encontraria em

freqüência mais elevada devido à seleção indireta. O teste do Qui-quadrado envolvendo as freqüências genóticas observadas e esperadas mostrou que a população estudada de Mangalarga encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco que contém o polimorfismo do gene *HTR1A*. O resultado não significativo dos testes de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e de Slatkin demonstraram que não há indicativo de acasalamentos preferenciais ou de seleção em favor de um dos alelos. Neste sentido, as estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para o SNP AB_264325:c.771G>C do *HTR1A* na amostra estudada de Mangalarga desestimulam a sua aplicação em estudos de associação com características de importância na raça.

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

Polimorfismo do SLC6A4

Em eqüinos, Momozawa et al. (2006) determinaram a seqüência e a localização cromossômica do gene *SLC6A4* e identificaram quatro SNPs, incluindo o AB_098561:c.1470G>A, analisado no presente trabalho, entre as seqüências de cDNA de uma dezena de cavalos Puro Sangue Inglês não relacionados geneticamente. Embora este polimorfismo esteja localizado em região gênica codificante, não é responsável por alteração de aminoácidos na cadeia peptídica. Mesmo assim, pode ser responsável por alterações fenotípicas, uma vez que tem a possibilidade de modificar a estrutura secundária do RNA mensageiro e conseqüentemente a expressão gênica. Por outro lado, pode estar em desequilíbrio de ligação com a variação funcional.

As frequências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *SLC6A4* equino na amostra estudada estão muito próximas das encontradas por Momozawa et al. (2006) em cavalos da raça Puro Sangue Inglês (0,09 para o alelo A e 0,91 para o G). Da mesma forma que para o polimorfismo do *HTR1A*, a não significância estatística dos testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson e de Slatkin para o loco que contém o polimorfismo do gene *SLC6A4* apontaram para a sua não aplicabilidade em estudos de associação entre marcadores e características de interesse na Mangalarga. Estes resultados, assim como os obtidos para os outros dois SNPs analisados neste trabalho, demonstram a importância de estudos de caracterização de parâmetros genético-populacionais de polimorfismos em diferentes raças da espécie de interesse, previamente aos estudos de associação entre marcadores moleculares e características de importância, a fim de que não ocorra consumo de recursos sem proveito na medição de fenótipos que não poderão ser confrontados com variações específicas do DNA.

No único trabalho de associação realizado com o polimorfismo AB_098561:c.1470G>A do *SLC6A4* em eqüinos, Momozawa et al. (2006) não encontraram resultados positivos ao analisarem o efeito de haplótipos formados pelos SNPs identificados no gene sobre a característica ansiedade na raça Puro Sangue Inglês. Em cães Golden Retriever, Van den Berg et al. (2008) não identificaram relação entre variantes do gene e agressividade. De forma diferente, variações no *SLC6A4* humano têm sido associadas à depressão, ansiedade, transtorno bipolar, suicídios, distúrbios alimentares e de abuso de substâncias, autismo, déficit de atenção/hiperatividade e distúrbios neurodegenerativos (MURPHY & LESCH, 2008).

Conclusões

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que: (1) o método de PCR-RFLP mostrou-se adequado para a genotipagem dos SNPs AJ_315378:c.110A>G e AB_264325:c.771G>C dos genes *CRISP1* e *HTR1A* equino, respectivamente. Entretanto, o polimorfismo do *CRISP1* provavelmente não ocorre em eqüinos

Mangalarga, impossibilitando estudos de associação com o marcador de DNA na raça; (2) as estimativas dos parâmetros genético-populacionais obtidos para os polimorfismos AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* e AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* na amostra de animais analisada desencorajam a realização de pesquisas visando a associação entre os marcadores e características relacionadas ao temperamento na raça estudada.

Agradecimentos

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

Referências

- ABCCRM – Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga. **Ficha de registro dos animais** - CD – Rom, Dezembro de 2003.
- ALMEIDA PRADO, R. S. 2005. **Parâmetros populacionais em cavalos da raça Mangalarga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- DRAGO, A.; RONCHI, D. D.; SERRETTI, A. 5-HT_{1A} gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 5, p. 701-21, 2008.
- EVANS, J.W. **Horses: a guide to selection, care and enjoyment**. Ed. WH Freeman and company, EUA, 2a. edição, 1996. 797p.
- GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; et al. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. **Gene**, v. 292, p. 65–72, 2002.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacology Review**, v. 46, n. 2, p. 157-203, 1994.
- HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME, H.; et al. A polymorphism within the equine *CRISP3* gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**, v. 38, p. 259-264, 2007.
- JAMSAI, D.; REILLY, A.; SMITH, S. J.; et al. Polimorfisms in the human cysteine-rich secretory protein 2 (*CRISP2*) gene in Australian men. **Human Reproduction**, v. 23, n. 9, p. 2151-2159, 2008.

- LANCASTER, A. K.; SINGLE, R. M.; SOLBERG O. D.; et al. PyPop update - a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. **Tissue Antigens**, v.69, s. 1, p. 192-197, 2007.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; et al. Polimorphism identification, RH mapping, and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (*SLC6A4*) gene. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 68, n. 6, p. 619-621, 2006.
- MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; et al. SNP detection and radiation hybrid mapping horses of nine candidate genes for temperament. **Animal Genetics**, v. 38, p. 81-91, 2007.
- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S. Estudo genético da pontuação total em eqüinos da raça Mangalarga. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 205, p. 25-30, 2005.
- MOTA, M. D. S.; ALMEIDA PRADO, R. S.; MADUREIRA, D. G. F. Estimativa de parâmetros genéticos para deslocamento em cavalos da raça Mangalarga. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, p. 207-210, 2006.
- MOTA, M. D. S.; GIANNONI, M. A. Efeitos genéticos e de ambiente sobre alguns caracteres de locomoção e desenvolvimento em eqüinos da raça Mangalarga. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 512, p. 191-196, 1994.
- MURPHY, L. D.; MEREDITH, A. F.; KIARA, R. T.; et al. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to *SLC6A4*, the serotonin transporter gene, wich functions to influence all cellular serotonin systems. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 932-960, 2008.
- MURPHY, L. D.; LESCH, K. P. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. **Neuroscience**, v. 9, p. 85-96, 2008.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.
- SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **New York: Cold Spring Harbor laboratory Press**, 545 p, 1989.
- SLATKIN, M. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. **Genetic Research**, v. 68, p. 259-260, 1996.
- TAVEIRA, R. Z.; MOTA, M. D. S. Genetic and quantitative evaluation of breeding traits in Thoroughbred mares. **Revista electronica de veterinaria**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2007.
- VAN DEN BERG, L. Evaluation of the serotonergic genes *HTR1A*, *HTR1B*, *HTR2A*, and *SLC6A4* in aggressive behavior of Golden Retriever, **Behavior Genetic**, v. 38, p. 55-66, 2008.
- YEH, F. C., YANG, R. C., BOYLE, T. Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada, 1999.

TABELAS

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

Gene	Sequência dos “primers” 5'- 3'	TA (°C)	Enzima (fabricante)	Número GenBank	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido
<i>CRISP1</i>	F - CCC CAA TCA CAG AAT ATC C R - TCA GCT AGC CTA GAA TCT G	52	<i>Bse</i> NI (Fermentas, USA)	AJ315378	c.110A>G	E37G (não conservativa)
<i>HTR1A</i>	F - CTT TCT ACA TCC CGC TGC TG R - TCT TCA CCG TCT TCC TTT CG	54	<i>Alu</i> I (New England Biolabs, USA)	AB264325	c.771G>C	E257D (conservativa)
<i>SLC6A4</i>	F - CTA TGT GGT GAA GCT GCT GG R - GCT TCC TCC TGT CTC CAC TG	60	<i>Hha</i> I (New England Biolabs, USA)	AB098561	c.1470G>A	não ocorre

Tabela 2 - Frequências alélicas e genóticas obtidas para os polimorfismos AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1*, AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* e AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* em amostra representativa da população de eqüinos da raça Mangalarga do Estado de São Paulo.

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

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

Polimorfismo	N	N ² alelos	Interv. Conf. de F		F obs.	F esp. ±0,167	Fnd ^b	P
			Inf.	Sup.				
AB_264325:c.771 G>C (<i>HTR1A</i>)	302	2	0,500	0,993	0,967	0,841 ±0,167	0,754	0,666
AB_098561:c.147 0G>A (<i>SLC6A4</i>)	302	2	0,500	0,993	0,848	0,841 ±0,167	0,039	0,386

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

FIGURAS

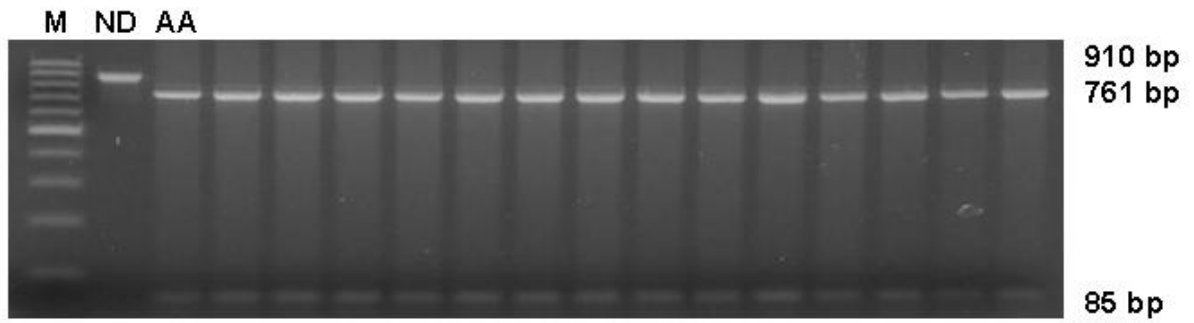


Figura 1 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AJ_315378:c.110A>G do gene *CRISP1* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *BseM* (910 pb) e AA o genótipo decorrente da digestão dos produtos amplificados pela enzima *BseM*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

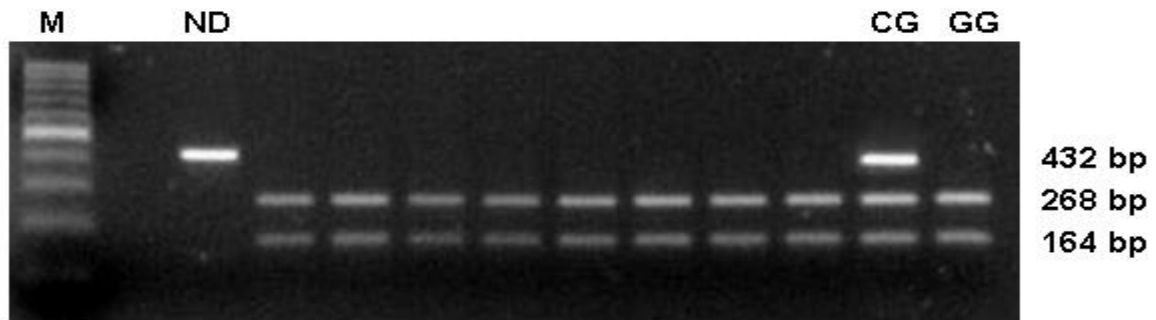


Figura 2 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 2% para o polimorfismo AB_264325:c.771G>C do gene *HTR1A* eqüino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *AfuI* (432 pb) e CG e GG os genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *AfuI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

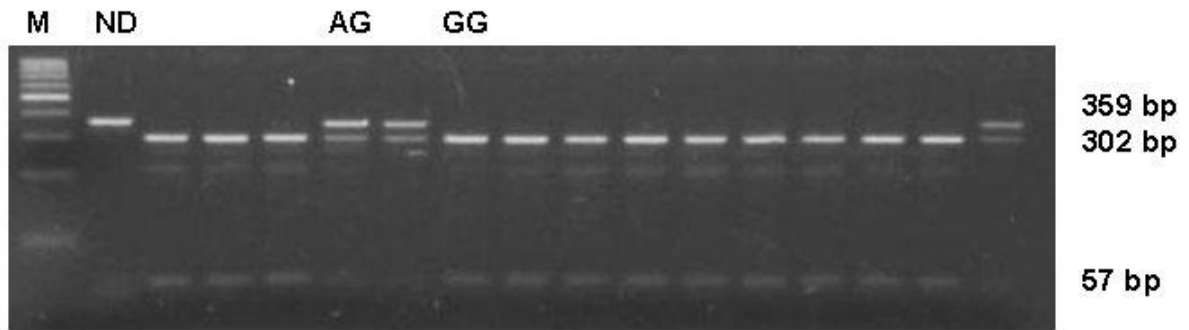


Figura 3 - Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% para o polimorfismo AB_098561:c.1470G>A do gene *SLC6A4* equino. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND DNA amplificado não digerido pela enzima *HhaI* (359 pb) e AG e GG os genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *HhaI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.