

Segregação do polimorfismo T133C (AX463789) do gene *Cε* do sistema imune em cavalos (*Equus caballus*) da raça Mangalarga¹

Renato Alves Prioli², Lídia Carolina Meira Armeiro³, Marcilio Dias Silveira da Mota³, Luis Artur Loyola Chardulo⁴, Rogério Abdallah Curi³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela FAPESP

²Mestrando do Programa de Genética e Melhoramento Animal – Unesp/Jaboticabal. Bolsista da FAPESP. renatouem@yahoo.com.br

³Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ – Unesp/Botucatu

⁴Departamento de Química e Bioquímica – IBB – Unesp/Botucatu

Resumo: O objetivo da presente pesquisa foi caracterizar por meio de estimação de frequências alélicas e genotípicas, o polimorfismo de DNA do gene *Cε* em eqüinos (*Equus caballus*) da raça Mangalarga utilizando-se da técnica de PCR-RFLP. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue de 151 cavalos em seis fazendas do estado de São Paulo. O DNA foi extraído das amostras de sangue e um fragmento do gene *Cε* foi amplificado por PCR. O produto amplificado foi digerido pela enzima *Eco47I* e o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3%. O padrão de bandas obtido foi visualizado em luz UV e fotodocumentado em sistema digital. Na análise estatística foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas, além das heterozigosidades observada e esperada. O equilíbrio de Hardy-Weimberg foi testado por meio do teste de Qui-quadrado. As frequências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *Cε* foram 0,53 para o alelo T e 0,47 para o alelo C. Com respeito às frequências genotípicas observou-se 0,34 para TT, 0,38 para CT e 0,28 para CC. A segregação do polimorfismo T133C (GenBank: AX463789) do gene *Cε* eqüino em confluência com a ausência de equilíbrio genotípico na população estudada, mostrou a possibilidade de realização de pesquisas visando a associação entre o marcador e características relacionadas ao sistema imune na raça Mangalarga.

Palavras-chave: Eqüino, Mangalarga, PCR-RFLP, polimorfismo, *Cε*

Segregation of the polymorphism T133C (AX463789) of *Cε* gene of immune system in Mangalarga horse breed (*Equus caballus*)¹

Abstract: The objective of this work was to characterize DNA polymorphisms in the *Cε* gene of the Mangalarga Brazilian horse (*Equus caballus*) breed by estimating allelic and genotypic frequencies using PCR-RFLP. Genomic DNA was extracted from blood samples of 151 horses from six farms in the state of São Paulo and the *Cε* DNA sequence was amplified by PCR. The amplified DNA sequence was treated with the restriction endonuclease *Eco47I* and the fragments were separated on 3% agarose gel. Electrophoresis profiles of the digested DNA fragments were visualized under UV radiation and photodocumented in a digital system. Gene and genotypic frequencies, as well as the observed and expected heterozygosities, were estimated by statistical analysis. The Hardy-Weimberg equilibrium was tested by the Chi-square test. The allelic frequencies estimated for the nucleotide site polymorphism of the *Cε* gene were 0,53 for the T allele and 0,47 for the C allele. As for genotypic frequencies, they were 0,34 for TT, 0,38 for CT and 0,28 for CC. The segregation of the T133C polymorphism (GenBank: AX463789) in the *Cε* equine gene, in conjunction with the absence of genotypic equilibrium in the studied population, demonstrated its feasibility for a further investigation aiming at finding association between the molecular marker and characteristics related to the immune system of the Mangalarga horse breed.

Keywords: Equine, Mangalarga, PCR-RFLP, polymorphism, *Cε*

Introdução

Em relação a outras espécies de exploração zootécnica, as pesquisas na área de melhoramento genético são proporcionalmente menores em eqüinos no mundo todo, inclusive no Brasil.

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. Por outro lado, dificuldades inerentes à espécie eqüina (baixos índices reprodutivos, altos intervalos de geração e parto, baixo número de progênies por parição, período de gestação relativamente longo), têm sido alguns dos contratempos encontrados 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 equestre 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. Pesquisas objetivando caracterizar a variabilidade de genes relacionados a características de interesse zootécnico são o primeiro passo em direção à seleção assistida por marcadores, a qual auxiliaria os criadores em suas tomadas de decisão acerca de quais animais devem ser encaminhados para a reprodução.

Nesse sentido o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar, por meio de estimação de frequências alélicas e genotípicas, o polimorfismo T133C (GenBank: AX463789) do gene *Cε* do sistema imune de cavalos (*Equus caballus*) da raça Mangalarga.

Materiais e métodos

Foram utilizados 151 cavalos da raça Mangalarga de ambos os sexos e de idade variada, oriundos de fazendas localizadas nos municípios de Itu, Guariba, Orlândia, Severínia, Catanduva e Botucatu no estado de São Paulo. Amostras de 5 mL de sangue total de cada um dos animais foram colhidas por venipuntura da jugular esquerda utilizando-se tubos a vácuo contendo 7,5 mg de EDTA. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado ao EDTA e mantido sob refrigeração em gelo. Na seqüência, as amostras de sangue foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

Os processos de extração do DNA e genotipagem foram realizados nas estruturas do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP. Após a remoção das hemácias das amostras de sangue, a extração do DNA dos leucócitos foi realizada pelo método não fenólico, utilizando digestão com proteinase K e precipitação com NaCl e álcool (Sambrook, 1989). Ao final do procedimento de extração de DNA, o mesmo foi quantificado em gel de agarose a 1% e diluído para a concentração de trabalho de 10ng/μL.

A análise do polimorfismo do gene *Cε* foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP. Cada reação, com volume final de 25 μL, foi constituída de 50 ng de DNA genômico, 0,24 μM de cada *primer* (*Forward* – 5' GTC TCC AAG CAA GCC CCA TTA T 3' e *Reverse* – 5' TTT ACC AGG GTC TTT GGA CAC CTC 3' descritos por Vychondilova-Krenkova *et al.*, 2005), 10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50mM de KCl; 1,6mM de MgCl₂; 0,32 mM de cada dNTP e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). Após desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, a amplificação foi realizada por meio de 44 ciclos de 95°C por 1 minuto, 68°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 12μL de produto de PCR e 3U da enzima de restrição *Eco47I* (Fermentas, EUA). As misturas para digestão foram incubadas em termociclador a 37°C por 12 horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose a 3%, a 100V por 1 hora e 45 minutos. Um padrão de peso molecular de 100pb foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. Esses fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. Após o processo de genotipagem, a documentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi realizada utilizando-se um sistema digital de fotodocumentação. Os genótipos dos indivíduos foram determinados por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Na análise estatística dos dados foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas por meio de contagem direta. A heterozigosidade observada foi calculada a partir do número de heterozigotos observados dividido pelo número total de animais e a heterozigosidade esperada foi obtida pelo cálculo frequência esperada de heterozigotos na população. O equilíbrio de Hardy-Weimberg foi avaliado por meio do teste de Qui-quadrado com 1 grau de liberdade e 5% de confiabilidade.

Resultados e Discussão

Na amostra de animais estudados, foram detectados os alelos T e C do polimorfismo do gene *Cε*, já descritos anteriormente por Vychondilova-Krenkova *et al.* (2005). O genótipo CC foi caracterizado pela presença de fragmentos de 754, 310, 228, 214, 37, 35 e 23 pb. O genótipo TT apresentou fragmentos de 623, 310, 228, 214, 131, 37, 35 e 23 pb. Os heterozigotos (CT) foram caracterizados pela presença de nove fragmentos, correspondentes à combinação dos dois padrões homozigotos. Entretanto, nas condições protocolares aqui utilizadas, não foi possível a visualização dos fragmentos com tamanho inferior a

duzentos pares de bases. Na Figura 1 está apresentado o padrão de bandas obtido para os três genótipos do polimorfismo *Cε*, após a eletroforese em gel de agarose.

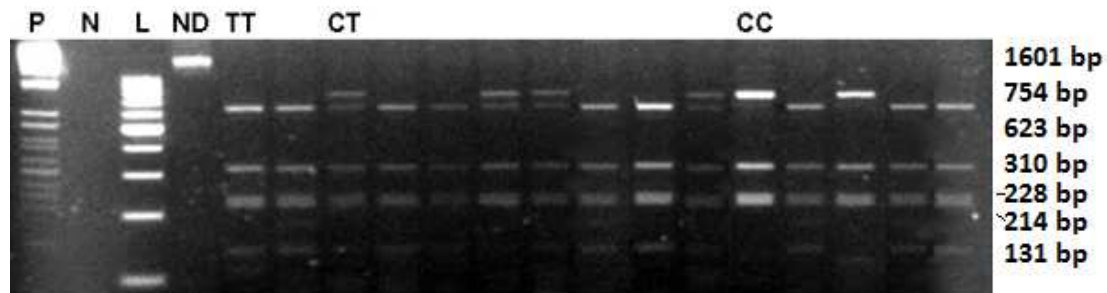


Figura 1 padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo T133C (GenBank: AX463789) do gene *Cε* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *Eco47I*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *Eco47I* (1601 pb) e TT, CT e CC indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *Eco47I*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

As frequências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *Cε* foram 0,53 para o alelo T e 0,47 para o alelo C, valores diferentes dos obtidos por Vychondilova-Krenkova *et al.* (2005) em cavalos de raça não especificada (0,87 e 0,13 respectivamente). Com respeito às frequências genotípicas observou-se 0,34 para TT, 0,38 para CT e 0,28 para CC, as quais diferiram das relatadas pelos últimos autores (0,74 para TT e 0,26 para CT). Essas desigualdades de frequências alélicas e genotípicas podem decorrer da pequena amostragem (19 animais) e da provável diferente raça estudada por Vychondilova-Krenkova *et al.* (2005). A heterozigosidade observada (0,38) apresentou valor inferior à esperada (0,50). Tal condição pode ser indício da ocorrência de seleção a favor dos genótipos homocigotos em detrimento aos heterocigotos. O valor do Qui-quadrado calculado (9,28) foi maior que o tabelado (3,84), indicando que a população estudada não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weimberg. A falta de equilíbrio aliada às frequências alélicas encontradas para o polimorfismo do gene *Cε* equino demonstram a sua aplicabilidade em estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça. Ressalta-se o fato desse polimorfismo, que ocorre no exon 1 do gene *Cε*, apresentar grande potencial para modificações fisiológicas uma vez que acarreta a troca de um aminoácido serina por um prolina na sequência proteica traduzida.

Conclusão

A segregação do polimorfismo T133C (GenBank: AX463789) do gene *Cε* equino em confluência com a ausência de equilíbrio genotípico na população estudada, mostrou a possibilidade de realização de pesquisas visando a associação entre o marcador e características relacionadas ao sistema imune na raça Mangalarga.

Agradecimentos

A FAPESP e a FUNDUNESP pelo suporte financeiro concedido. Aos criadores, representados na pessoa de Raul Sampaio Almeida Prado, pela disponibilização dos animais para a pesquisa.

Literatura Citada

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

VYCHODILOVA-KRENKOVA L, MATIASOVIC J, HORIN P. Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: *CD14*, *TLR4*, *Cepsilon*, and *Fepsilon RI alpha*. **Int J Immunogenetics** 32:277–283, 2005.