

Segregação do polimorfismo A1636G (AY005808) do gene *TLR4* 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 *TLR4* 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 *TLR4* foi amplificado por PCR. O produto amplificado foi digerido pela enzima *BssSI* 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 *TLR4* foram 0,69 para o alelo G e 0,31 para o alelo A. Com respeito as frequências genotípicas observou-se 0,47 para GG, 0,09 para AA e 0,44 para AG. Embora a população de Mangalarga estudada esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências alélicas encontradas demonstram o seu potencial de aplicação em estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça.

Palavras-chave: Eqüino, Mangalarga, PCR-RFLP, polimorfismo, *TLR4*

Segregation of the polymorphism A1636G (AY005808) of *TLR4* gene of immune system in Mangalarga horse breed (*Equus caballus*)¹

Abstract: The objective of this work was to characterize DNA polymorphisms in the toll-like receptor 4 (*TLR4*) 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 *TLR4* DNA sequence was amplified by PCR. The amplified DNA sequence was treated with the restriction endonuclease *BssSI* 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 Qui-square test. The allelic frequencies estimated for the nucleotide site polymorphism of the *TLR4* gene were 0.69 for the G allele and 0.31 for the A allele. As for genotypic frequencies, they were 0.47 for GG, 0.09 for AA and 0.44 for AG. Even though the studied Mangalarga population is in Hardy-Weimberg equilibrium, the observed allelic frequencies demonstrate the potential of this polymorphism as a useful tool for studies of association of the molecular marker with important traits in this horse breed.

Keywords: Equine, Mangalarga, PCR-RFLP, polymorphism, *TLR4*

Introdução

Ao longo da última década várias pesquisas desenvolvidas no mundo procuraram identificar em cavalos SNPs que potencialmente poderiam estar associados a doenças, cor de pelagem, reprodução, desempenho e temperamento (Chowdhary & Raudsepp, 2008). Além disso alguns SNPs foram identificados em genes do sistema imune, incluindo *CD14*, *TLR4*, *Cε* e *FcεR1 alpha* (Vychondilova-Krenkova *et al.* 2005). Em cavalos, distúrbios neste sistema normalmente resultam em fadiga, infecções frequentes, perdas de apetite e peso (Marvin e Haisman, 2008), levando a perdas econômicas consideráveis dentro do sistema de produção.

Nesse sentido o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar, por meio de estimação de frequências alélicas e genotípicas, o polimorfismo de DNA do gene *TLR4* em equinos 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, na região do pescoço, 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 e analisado quanto a sua integridade em gel de agarose a 1%. Após a diluição para a concentração de trabalho (10ng/uL), as amostras de DNA foram estocadas em mini-tubos de 1,7mL e armazenadas a -20°C.

A análise do polimorfismo do gene *TLR4* 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' GGC CTC AAC CAT CTC TCC ACC T 3' e *Reverse* – 5' CCA CGG TTT ACC ATC CAG CAA G 3' descritos por Vychondilova-Krenkova *et al.*, 2005), 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,32 mM de cada dNTP e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, EUA). As amplificações foram feitas em termociclador e consistiram de 5 passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 95°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 94°C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* 64°C, por 40 segundos; (4) extensão a 72°C por 2 minutos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituíram um ciclo, que foi repetido por 40 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 12 µL de produto de PCR e 5 U da enzima de restrição *BssSI* (New England Biolabs, EUA), de acordo com Vychondilova-Krenkova *et al.*, (2005). 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 duas horas. 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 numero de heterozigotos observados dividido pelo numero total de animais e a heterozigosidade esperada foi obtida pelo calculo 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 A e G do polimorfismo do gene *TLR4*, já descritos anteriormente por Vychondilova-Krenkova *et al.* (2005). O genótipo AA foi caracterizado pela presença de um fragmento de 2172 pb. O genótipo GG apresentou fragmentos de 1638 e 534 pb. Os heterozigotos (AG) foram caracterizados pela presença de três fragmentos, correspondentes à combinação dos dois padrões homozigotos. Na Figura 1 está apresentado o padrão de bandas obtido para o três genótipos do polimorfismo *TLR4*, após a eletroforese em gel de agarose.

As frequências alélicas obtidas para o polimorfismo do gene *TLR4* foram 0,69 para o alelo G e 0,31 para o alelo A, valores divergentes dos obtidos por Vychondilova-Krenkova *et al.* (2005) em cavalos de raça não especificada (0,44 e 0,56 respectivamente). Com respeito as frequências genotípicas observou-se 0,47 para GG, 0,09 para AA e 0,44 para AG as quais diferiram das relatadas pelos últimos autores (0,375 para AA, 0,375 para AG e 0,25 para GG). Essas desigualdades de frequências alélicas e genotípicas podem decorrer da pequena amostragem (8 animais) e da provável diferente raça estudada por Vychondilova-

Krenkova *et al.* (2005). A heterozigidade observada (0,44) apresentou valor muito próximo à esperada (0,43). O valor do Qui-quadrado calculado (0,029) foi menor que o tabelado (3,84), indicando que a população estudada se encontra em equilíbrio de Hardy-Weimberg.

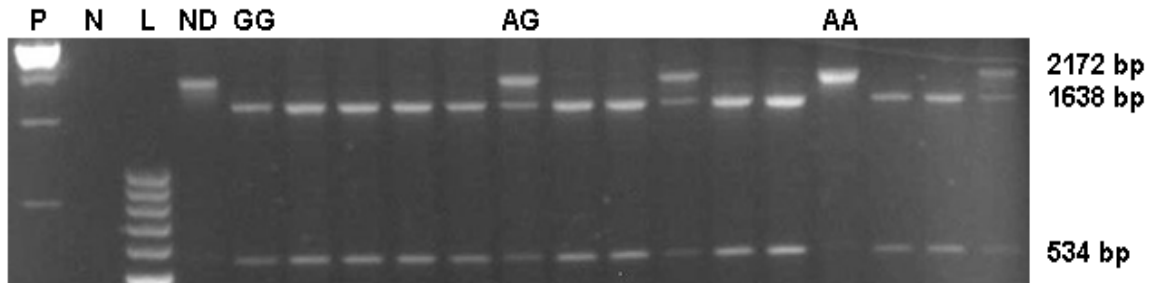


Figura 1 Padrão de bandas obtido na análise por PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo A1636G (GenBank: AY005808) do gene *TLR4* equino. P indica digestão de DNA viral pela enzima *BssSI*, N indica o controle negativo de amplificação, L indica o padrão de peso molecular de 100 pb, ND indica DNA amplificado não digerido pela enzima *BssSI* (2172 pb) e GG, AG e AA indicam os diferentes genótipos decorrentes da digestão dos produtos amplificados pela enzima *BssSI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de bases.

Embora a população de Mangalarga estudada esteja em equilíbrio, as frequências alélicas encontradas demonstram o seu potencial de aplicação em estudos de associação entre o marcador e características de importância na raça. Esse polimorfismo pode ser de grande importância fisiológica uma vez que é não sinônimo, acarretando a troca de um aminoácido metionina por um valina na sequência protéica codificada a partir do exon 3 do gene *TLR4*. Essa troca abre possibilidades para diferenças no mecanismo de reconhecimento de lipopolissacarídeos alterando o sistema imune.

Conclusão

A segregação do polimorfismo A1636G (GenBank: AY005808) do gene *TLR4* equino 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

- CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. The Horse Derby: racing from map to whole genome sequence. **Chromosome Research** 16:109-127, 2008
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor**, 1989. v. 1.
- MARVIN, S., HAISMAN, M.D. [2008]. **Immune system may help explain fatigue in horses and human**. Disponível em <www.dressagedaily.com/2008/dd_200802/20080218.htm> acessado em março de 2008.
- 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.