

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Polimorfismo 38973231G>A do gene *PDK4* em equinos Quarto de Milha¹

Guilherme Luis Pereira², Rogério Abdallah Curi³, Luciana Correia de Almeida Regitano⁴, Flavia Aline Bressani⁴, Joseneudson Augusto II Vasconcelos Silva³, Marcílio Dias Silveira da Mota³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp, Jaboticabal. Bolsista do CNPq. email: guipicoia@hotmail.com

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

⁴Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos.

Resumo: Com cerca de 358.000 animais registrados no Brasil, a raça Quarto de Milha tem importante papel no agronegócio nacional, visto que rebanho brasileiro está avaliado em US\$ 758,5 milhões. Dentro da raça há segmentos de aptidão ou linhagens destinadas a diferentes modalidades de provas, que passaram por objetivos de seleção distintos, entre elas as de corrida e de trabalho. O gene *PDK4* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*) desenvolve importante papel na fisiologia do metabolismo energético muscular, controlando a oxidação de ácidos graxos e glicose durante atividades físicas. O polimorfismo 38973231G>A no gene *PDK4* foi significativamente associado ao desempenho em corridas de cavalos Puro-Sangue Inglês, os quais têm grande influência genética na raça Quarto de milha. Para estudo deste polimorfismo em cavalos Quarto de Milha foram genotipados, por meio de ARMS-PCR, 229 animais, dos quais 161 eram da linhagem de corrida (caso) e 68 da linhagem de trabalho (controle). Houve diferença significativa ($P<0,01$) das frequências alélicas e genotípicas entre grupos caso e controle, com maior frequência do alelo A na linhagem de corrida (0,32) do que na de trabalho (0,14). Os resultados deste trabalho sugerem a ação dominante e favorável do alelo A no desempenho em corridas.

Palavras-chave: corrida, desempenho, metabolismo muscular, trabalho

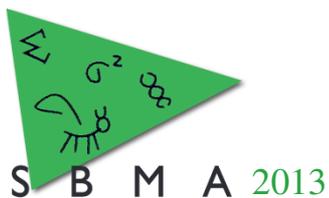
***PDK4* Polymorphism (38973231G>A) in the Quarter Horses**

Abstract: Having around 358,000 registered animals in Brazil the Quarter Horse breed has an important role in national agribusiness, considering that Brazilian herd is evaluated in US\$ 758.5 million. In this breed there are some lines or abilities that are used in different kinds of tests that were selected according to different objectives, such as races or work. The *PDK4* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*) gene has important role in the muscular energetic metabolism physiology, controlling fatty acid and glucose oxidation during physical activities. The polymorphism 38973231G>A on this gene was significantly associated to performance in races of Thoroughbred horses, a breed that has major influence on Quarter Horses' formation. To study this polymorphism in Quarter horses 229 animals, being 161 from the race line (case) and 68 from the work line (control), were genotyped by ARMS-PCR. Allele and genotype frequencies were significantly different ($P<0.01$) between case and control groups, with higher frequency of the A allele in the racing line (0.32) than in the work line (0.14). The dominant and favorable action of the A allele in race performance is suggested.

Keywords: muscle metabolism, performance, racing, work

Introdução

Equinos da raça Quarto de Milha são originários da América do Norte e tiveram sua formação a partir do século XVII, com a introdução de raças equinas de origem árabe e turca por colonizadores europeus (ABQM, 2012). Ao longo de várias décadas esta raça foi selecionada para provas de velocidade em pistas de curta distância com cerca de um quarto de milha (402m). Atualmente dentro da raça há pelos menos três segmentos de aptidão ou linhagens: corrida, trabalho e conformação. Tais linhagens, por serem destinadas a diferentes modalidades de provas, passaram e passam por objetivos de seleção distintos. Conhecidamente, a linhagem de corrida tem melhor desempenho que qualquer outra linhagem ou raça em corridas de curta distância. Animais com aptidão de trabalho podem competir em diversas provas, como balizas, tambores, apartação entre outras. Dentro da linhagem de trabalho, equinos



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

destinados a aptidão e rédeas não têm o seu principal objetivo na velocidade, mas agilidade e inteligência.

O gene *PDK4* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*) desenvolve importante papel na regulação do metabolismo energético muscular, na oxidação de glicose e ácidos graxos. O passo crítico limitante da velocidade de oxidação da glicose é a regulação da montagem do complexo piruvato desidrogenase (PDC), que é controlado pela piruvato desidrogenase quinase (PDK). A PDK bloqueia a formação do PDC, resultando na beta-oxidação de ácidos graxos para acetil-CoA como substrato para a fosforilação oxidativa. A oxidação de ácidos graxos é altamente eficaz na geração de ATP e é controlada pela expressão do *PDK4* no músculo esquelético durante e após o exercício (Pilegaard e Neuffer 2004). Em equinos Puro-Sangue Inglês (PSI) o *PDK4* teve sua expressão aumentada imediatamente após exercício físico de alta intensidade em um curto espaço de tempo, o que não ocorreu em exercícios de intensidade moderada (HILL et al, 2010b). Ainda em equinos PSI foi encontrada associação significativa do polimorfismo 38973231G>A no gene *PDK4* e desempenho em corridas, neste caso com ação dominante do alelo favorável A (HILL et al., 2010a).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo 38973231G>A nas linhagens de corrida e trabalho da raça Quarto de Milha, a fim de contribuir em programas de melhoramento que visem melhorar o desempenho em corridas de animais desta raça.

Material e Métodos

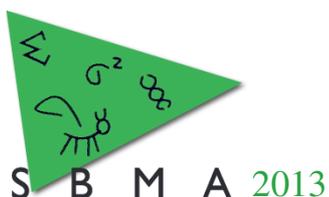
Foram utilizados 229 animais da raça Quarto de Milha, dos quais 68 eram de trabalho destinados a aptidão e rédeas e 161 eram da linhagem de corrida. Também foram utilizados 36 equinos da raça Mangalarga, a fim de verificar o comportamento do polimorfismo em uma raça com diferente finalidade. Animais escolhidos fazem parte da população efetiva, visando obter amostras representativas das raças.

Foram coletadas amostras de 5mL de sangue total de cada animal, por meio de tubos a vácuo contendo 7,5mg de EDTA. O processo de extração de DNA foi realizado no Laboratório de Genética e Melhoramento Animal (LGMA) da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP, utilizando o *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação dos genótipos do SNP *g.38973231A>G* do gene *PDK4* foi realizada por meio da técnica de ARMS-PCR utilizando os *primers PDK4 - F inner 5' GCA GCA GTA AAG ACT ATG GAT TGA CTG 3'*, *PDK4 - R inner 5' CCA TTA AAC AAT GAC AAT CTG AAA CAA AT 3'*, *PDK4 - F outer 5' GAT GCA ACT TTA ACC CTC AAC TTT CTA A 3'*, e *- R outer 5' CAG ATT TTC AGA GAA TAG AGC CAG GAT A 3'*. Os fragmentos de DNA obtidos por ARMS-PCR foram separados em gel de agarose a 3%, em um sistema de eletroforese horizontal. Para obtenção dos genótipos, os fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta.

Foram avaliados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) por meio do teste exato por permutação e teste qui-quadrado. As diferenças nas frequências alélicas e genóticas entre as duas linhagens foram avaliadas pelo teste qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade, respectivamente, e significância a 1%. Para estas análises foi utilizado o pacote *genetics* do software R.

Resultados e Discussão

Embora não tenham sido encontrados desvios em HWE, foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($P < 0,001$) para as frequências alélicas ($P = 0,0001$) e genóticas ($P = 0,0007$) entre as linhagens de corrida e trabalho (Tabela 1). Tais resultados concordam com estudos realizados por Hill et al. (2010), onde encontrou-se diferença significativa das frequências alélicas e genóticas de animais PSI que nunca venceram uma prova e de animais vitoriosos em provas de curtas distâncias. Na raça Mangalarga o locus não se apresentou polimórfico, com o alelo G fixado. Tais resultados confirmam a ação favorável do alelo A para desempenho em corridas, visto que esta raça nunca teve como objetivo de seleção a velocidade, e sim o andamento, uma atividade física moderada. Ao considerar o alelo A dominante ($A_ \times GG$), a diferença entre linhagens se manteve significativa ($P = 0,0006$), o que não ocorreu quando o alelo A foi considerado recessivo ($G_ \times AA$ $P=0,0298$) (Tabela 1). A ação dominante do alelo A e sua maior frequência na linhagem de corrida, sugere que os genótipos AA e AG são



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

favoráveis ao desempenho em corridas, como indicam os resultados obtidos por HILL *et al.* (2010a) em equinos PSI.

Tabela 1. Análise de frequências genóticas e alélicas entre linhagens de equinos Quarto de Milha

		Corrida (n=161)		Trabalho (n=68)		G.L.	χ^2	P-value
		n	frequências	n	frequências			
Genótipos	GG	77	0,48	50	0,74	2	14,501	0,0007
	GA	66	0,41	17	0,25			
	AA	18	0,11	1	0,01			
Alelos	G	220	0,68	117	0,86	1	14,523	0,0001
	A	102	0,32	19	0,14			
Dominante	A_	84	0,53	18	0,26	1	11,766	0,0006
	GG	77	0,47	50	0,74			
Recessivo	AA	18	0,11	1	0,01	1	4,716	0,0298
	G_	143	0,89	67	0,99			

G.L. = graus de liberdade, n= numero de indivíduos, genótipos e alelos

Conclusões

O polimorfismo 38973231G>A do gene *PDK4* mostrou grande potencial para ser utilizado como marcador na diferenciação das linhagens de trabalho e corrida da raça Quarto de Milha, podendo ajudar a prever, de forma mais acurada, a aptidão de um animal. Embora estudos anteriores associem este polimorfismo ao desempenho em corridas, se faz necessária a realização de estudos de associação para confirmar esta ação na raça Quarto de Milha.

Literatura citada

- ABQM. Associação brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha [2012]. Disponível em <<http://www.abqm.com.br/item1.htm>> acesso em: 22/05/2013.
- HILL, E.M.; GU, J.; MCGIVENY, B.A.; MACHUGH, D.E. Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance. *Animal Genetics*, v.41, p.56-63, 2010(a).
- HILL, E.M.; EIVERS, S.S.; MCGIVENY, B.A.; FONSECA, R.G.; GU, J. SMITH, N.A.; BROWNE, J.A.; MACHUGH, D.E.; KATZ, L.M. Moderate and high intensity sprint exercise induce differential responses in COX4I2 and *PDK4* gene expression in Thoroughbred horse skeletal muscle. *Equine veterinary Journal*, v.42(Suppl. 38), p.576-581, 2010(b).
- PILEGAARD, H.; NEUFER, P.D. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proceedings of the Nutrition Society*, V.63, p.221-226, 2004.