

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE EDNRB COM A PELAGEM OVEIRA EM CAVALOS DA RAÇA CRIOULA

**OLIVEIRA, Gabriella Borba¹; MOREIRA, Carla G.A.²; DULAC, Camila F.³;
MUNDSTOCK, Cristina P.³; DUARTE, Rodrigo T.³;**

¹UFPEl, Biotecnologia (Bacharelado); ²UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, carlafarma@gmail.com; ³UFPEl, Medicina Veterinária (Bacharelado).

1 INTRODUÇÃO

A raça de cavalos Crioula se mostra como uma das mais importantes raças de equinos no Rio Grande do Sul, principalmente pela sua importância na atividade pecuária, devido à sua rusticidade e adaptabilidade ao campo. Já é historicamente bem consolidada na região sul do Brasil e vem crescendo ano a ano segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC).

O cavalo Crioulo criado no Brasil possui uma grande variedade de pelagens, as quais são classificadas em 55 subdivisões, sendo 19 de capa/pelagem, 18 tonalidade/variações e 18 particularidades. Muitas destas variações não possuem equivalentes em classificações internacionais, mostrando, portanto, aspectos regionais da própria criação e desenvolvimento desta raça no Brasil. Entre as pelagens classificadas como manchadas, como o padrão oveiro, ocorrem não por alterações dos pigmentos básicos, mas sim pela ausência dos pigmentos em determinadas áreas do corpo do animal (Moreira, 2010).

Em outras raças de cavalos a pelagem oveira já está caracterizada molecularmente como sendo, também, causada por uma mutação de caráter heterozigoto no gene do receptor tipo B de endotelina (EDNRB) (Finno, 2009 *apud* Santschi, 1998). Este gene apresenta sete éxons e é responsável pela formação do receptor tipo B de endotelina, uma proteína transmembrana com sete alças, a qual interage com outras proteínas chamadas endotelinas exercendo sua função de sinalização celular e regulando inúmeros processos biológicos, principalmente durante o desenvolvimento embrionário onde desempenham um papel importante nas células da crista neural. Quando ocorre a interação específica do receptor com a endotelina-3, há a sinalização para a migração e diferenciação das células da crista neural para a formação normal de nervos entéricos e melanócitos, os quais são responsáveis pela pigmentação da pele (Finno, 2009 *apud* Baynash, 1994).

Uma mutação no primeiro éxon deste gene, a qual troca uma timina e citosina por uma guanina e adenina, alterando a proteína no códon 118 através de uma substituição de uma. Esta alteração quando em heterozigose produz a pelagem oveiro (Metallinos, 1998). Porém na raça crioula ainda não foi comprovado está mutação como responsável por esse padrão de pelagem. Em outro trabalho já havíamos estudado a possível mutação em todos os sete éxons do gene, através de sequenciamento, e não foi encontrada nenhuma alteração nos éxons, podendo concluir que o padrão oveiro dos cavalos da região do Rio Grande do Sul é diferente do descrito na literatura.

Dessa forma foi proposta a caracterização da pelagem oveira em cavalos crioulos a fim de agregar conhecimento e informações mais aprofundadas em relação a esse tema, sabendo da importância da raça para a nossa região sul. Visto que a mutação nos éxons não foi encontrada, optou-se por estudar variações na

região dos íntrons em relação ao tamanho da sequência que possa ter sofrido alteração. Isso porque já foi relatado que para outras pelagens de equinos as mutações nas regiões intrônicas causariam modificações na formação da proteína final (Brooks & Bailey, 2005), que no caso do gene EDNRB poderia afetar a migração de melanócitos e acarretar no padrão ovelo.

2 METODOLOGIA

Foi realizado extração de DNA a partir de amostras de sangue de dois equinos da raça Crioula, um apresentando pelagem ovelo tostado e outro com pelagem baio ruano. Estes animais são filhos do mesmo pai, cuja pelagem é baia bragada. A extração foi realizada através do protocolo fornecido pelo kit da Axygen® – AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit.

Com as amostras de DNA da extração foram feitas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificar as regiões dos seis íntrons, separadamente, do gene EDNRB. Foram utilizados os *primers* que já haviam sido construídos para os éxons em um trabalho anterior, como já citado na introdução. Na mesma reação de PCR utilizou-se o *primer Forward* do primeiro éxon e o *Reverse* do segundo éxon para possibilitar a amplificação da região entre os éxons que contêm o íntron, assim foi o procedimento para todos íntrons utilizando para cada um o conjunto de *primers* específico (Tab. 1). Para amplificar o íntron um, cuja sequência possuía tamanho de 15.694Kb foi utilizada a KAPA Long Range HotStart DNA Polymerase da Kapabiosystems®, para as demais reações utilizou-se a DreamTaq™ DNA Polymerase da Fermentas®. Todos os outros reagentes utilizados eram da Fermentas®.

Tabela 1 - Tamanho esperado do produto de PCR que corresponde a cada íntron.

Intron	Primers	Sequencia (5'-3')	Tamanho esperado
1	F éxon 1	TCCTTCCCTTGCGGATGTCCAGA	15.694 Kb
	R éxon 3	ACCCGGCTTCCTGCAGCTTG	
2	F éxon 2	AGGGCGCCTCATGAAAGTCT	684 Kb
	R éxon 3	ACCCGGCTTCCTGCAGCTTG	
3	F éxon 3	GCTCTGCCAGCTTGGCAAACAAT	2.947 Kb
	R éxon 4	GCAAGAAAGGGAAATATGCTTTGGT	
4	F éxon 4	GGGGATGCTTTCCTTTGTTATGC	792 Kb
	R éxon 5	ACCTCAAAGTTCACATCTATGGGG	
5	F éxon 5	TGCTTAGCAAGGATAATGCCGTGA	993 Kb
	R éxon 6	TCATCCATGATGTAATGCAAGGGA	
6	F éxon 6	GCTCAGAGCAGCATATTTTTCACA	1.876 Kb
	R éxon 7	GTTTTGTTTTGGCAAATGCCTCAC	

F: Forward; R: Reverse. Baseado na sequência Genbank ID: 100033875

Foi realizado um gradiente de temperatura no termociclador GeneTouch – Bioer® com doze temperaturas diferentes para cada conjunto de *primers*, os quais

correspondiam a cada um dos seis íntrons. Foram utilizadas duas amostras para o PCR com doze repetições, sendo cada repetição uma temperatura diferente de anelamento, totalizando 24 amostras, além do controle negativo. Posteriormente foi analisado o fragmento amplificado correspondente a melhor temperatura de anelamento de ambas as amostras em cada íntron separadamente, comparando seu tamanho através de eletroforese das amostras em gel de agarose 1% e visualização pelo equipamento de captura de imagem L-PIX HE da empresa Loccus tecnologia.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma adição ou deleção de vários pares de bases (pb) na região do íntron pode ocasionar uma mudança na fase de leitura dos éxons pela modificação no momento do *splicing*, provocando a má formação da proteína final (Brooks & Bailey, 2005). Através da amplificação dos fragmentos que contenham os íntrons é possível observar se há diferença entre o tamanho dos fragmentos obtidos em relação ao tamanho dos fragmentos esperados (Tab. 1), pois essa modificação no receptor tipo B de endotelina pode afetar a migração dos melanócitos e acarretar no padrão oveiro de pelagem. Para isso foi utilizado uma amostra controle correspondendo ao equino de pelagem baia ruano, que apresentaria o tamanho esperado de fragmento e uma amostra de um equino com pelagem oveira tostada, o qual poderia apresentar diferença de tamanho no fragmento amplificado, confirmando a mutação na região dos íntrons como causadora do padrão de pelagem oveiro. Porém, não foi identificada nenhuma alteração em relação ao tamanho dos fragmentos em nenhum dos seis íntrons (Fig. 1), os quais apresentaram o tamanho já esperado de acordo com o previsto na Tab. 1.

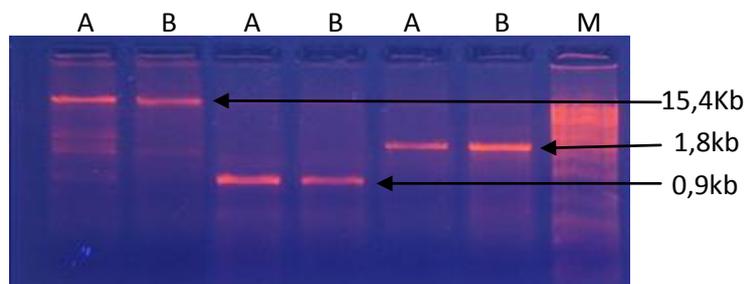


Figura 1 – Resultado da amplificação das amostras, visualizadas em gel de agarose para os íntrons 1, 5 e 6. Sendo A para animal oveiro e B para não oveiro para cada íntron e M para marcador.

Na imagem acima (Fig. 1) é observado o resultado de um dos géis de agarose com os produtos do PCR correspondente as íntrons 1, 5 e 6, respectivamente, com duas repetições cada, sendo a primeira correspondente ao oveiro tostado e a segunda ao baio ruano.

Tanto as amostras correspondentes ao equino de pelagem oveira quanto às amostras do equino de pelagem não oveiro apresentaram o mesmo padrão de bandas (Fig. 1). Isso sugere que a mutação que ocasiona o padrão de pelagem oveira em cavalos crioulos poderia ser de poucos pares de bases e não pode ser identificada apenas em gel de agarose. Contudo não é possível descartar que alterações no primeiro éxon não estejam relacionadas com a pelagem oveira. Isso decorre do fato que foi identificada um *enhancer* transcricional no primeiro *íntron* do gene ERBB3 de zebrafish (Prasad et al. 2011). Segundo esses autores, estudos *in*

vivo com zebrafish transgênico este *enhancer* dirige os mais altos níveis de expressão do gene repórter. Além disso, foi identificado dentro deste *enhancer* um sítio de ligação para o gene Sox10. O gene Sox10 é indispensável para o adequado desenvolvimento da crista neural. Os melanócitos também se desenvolvem a partir das células provenientes da crista neural. Portanto, mutações neste primeiro *intron* do gene EDNRB, poderiam estar relacionadas com a pelagem ovejuna.

4 CONCLUSÃO

O padrão de ovejuna encontrado na raça crioula é diferente do relatado na literatura e ainda não foi confirmado o gene ou mutação que está diretamente ligada a esse padrão. Portanto, do exposto anteriormente é necessário caracterizar a identidade das sequências intrônicas, uma vez que neste estudo fizemos apenas a caracterização do tamanho dos *introns*.

5 REFERÊNCIAS

BROOKS, S.A.; BAILEY, E. Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 893– 902, 2005.

FINNO, C.J., *et al.* Review: Equine diseases caused by known genetic mutations. **The Veterinary Journal**, v. 19, n. 3, p. 336-347, 2009.

METALLINOS, D.L., *et al.* A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 426-431, 1998.

MOREIRA, C.G.A., *et al.* Mutação na região regulatória do gene KIT associado com a pelagem tobiana na raça Crioula. In: **VII ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL**, São João do Polêsine, 2010. Resumos Genética Animal, p. 26-27.

SANTSCHI, E.M., *et al.* Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 306-309, 1998.

VROTSOS, P.D., *et al.* The Impact of the Mutation Causing Overo Lethal White Syndrome on White Patterning in Horses. **Pediatric Medicine**, v. 47, p. 385-391, 2001.

PRASAD, K.M., *et al.* SOX10 directly modulates ERBB3 transcription via an INTRONIC neural crest ENHANCER. **BMC developmental Biology**, v. 11, p. 40, 2011