

## **PADRÃO DE PELAGEM SABINO-1 CAUSADA POR MUTAÇÃO NO GENE KIT EM CAVALOS CRIoulos.**

**MUNDSTOCK, Cristina P<sup>1</sup>; DULAC, Camila F<sup>1</sup>; DUARTE, Rodrigo T<sup>1</sup>; DODE, Maria Eduarda Bicca<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Gabriella Borba<sup>2</sup>; MOREIRA, Carla G. A.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas / Medicina Veterinária,; <sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas / Biotecnologia,; <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBM.  
Email: carlafarma@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

Cavalos Crioulos apresentam algumas características bem marcadas e fundamentadas pela sua associação (ABCCC), como morfologia e função, e, mais recentemente, com exames de paternidade, agregando mais valor a esta raça. Além destas características, a pelagem é um outro fator descrito e utilizado para catalogar os animais, porém, até o momento, não se tem uma análise dentro da raça crioula que determine estas variações na pelagem. Mutações no gene KIT, descritos para outras raças, são responsáveis por padrões de manchas brancas em cavalos. Este gene possui 21 exons e desempenha papel importante na sobrevivência dos melanócitos durante o desenvolvimento embrionário (Hasse e Brooks, 2007), que migram distalmente até as extremidades e colonizam a epiderme. A existência de mutação no gene KIT, resulta em fenótipos de despigmentação, como os padrões de pelagem Tobiano, Ruão, Branco Dominante e Sabino-1.

O padrão de pelagem Sabino-1 (SB1) caracteriza-se por modificações na cor causadas por uma mutação no intron 16 do gene KIT, onde ocorre a substituição da base T(timina) por uma base A(adenina). Esta mutação resulta em uma alteração no *splice* feito normalmente para a retirada do *intron*, acarretando em um escape do exon 17 (Brooks, 2005). Cavalos heterozigotos para a mutação Sabino-1 (SB1/sb1) se caracterizam por manchas brancas e irregulares na porção inferior das patas, na face, geralmente combinadas com manchas brancas ao longo do corpo e áreas ruas. Cavalos homozigotos (SB1/SB1) são parcialmente ou totalmente brancos, com pele rosada (Castle, 2009).

Os animais que possuem manchas brancas irregulares nas patas, face, são reconhecidos como Sabino (Sponenberg 2003). Embora Brooks e Bailey (2005) tenham encontrado uma ampla distribuição de KI16+1037 associado com padrão Sabino-1 em diversas raças, nem todos os fenótipos do tipo Sabino são explicados por esta mutação.

Com base no exposto acima o objetivo do trabalho é verificar se todos os animais que possuem o padrão de manchas Sabino-1 representam mutações na região do intron 16 do gene KIT.

### **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o Kit Blood Genomic DNA Miniprep® de acordo com as instruções do fabricante (Axygen Bioscience, USA). Para verificar o polimorfismo no intron 16 do gene KIT, foram amplificados a porção da extremidade 3' do intron 16

até o início do exon 17 usando a técnica da PCR descrita por (Brooks, 2005) . As amplificações foram realizadas usando uma temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 3', seguidos por 35 ciclos com desnaturação a 94°C, anelamento 57°C por 35 segundos e extensão a 72°C também por 35 segundos. Foram utilizados os primers KITi16aF ( 5'- GGT CCT GAC GAT GAG AAA CAC AAG T- 3') e KITE17-117R ( 5'- TTT GAC CAC ATA ATT AGA ATC ATT C- 3'). Os produtos foram checados em Gel de Agarose 1%, corado com Gelgreen e visualizado em transluminador de luz branca. O produto da PCR foi digerido adicionando-se a enzima de restrição MnII e colocado em Banho Maria a 37°C "overnight" conforme (Brooks, 2005). Em seguida, os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%, que foi corado com nitrato de prata para a visualização das amostras.

### 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, 2005). A partir da amplificação do *intron* 16 até os primeiros 290 pb do *intron* 17, é possível verificar se o tamanho dos fragmentos obtidos está de acordo com o tamanho dos fragmentos esperados (Figura 1), pois a modificação no *exon* 17 pode alterar a migração dos melanócitos e resultar no padrão de pelagem Sabino-1. Para isso, foram utilizadas amostras de cavalos sem as características fenotípicas Sabino-1, considerados homocigotos não Sabino (*sb1/sb1*) e amostras de cavalos com fenótipo de despigmentação característico do padrão de pelagem, com manchas brancas nas patas, na face (Figura 2), considerados heterocigotos Sabino-1 (*SB1/sb1*).

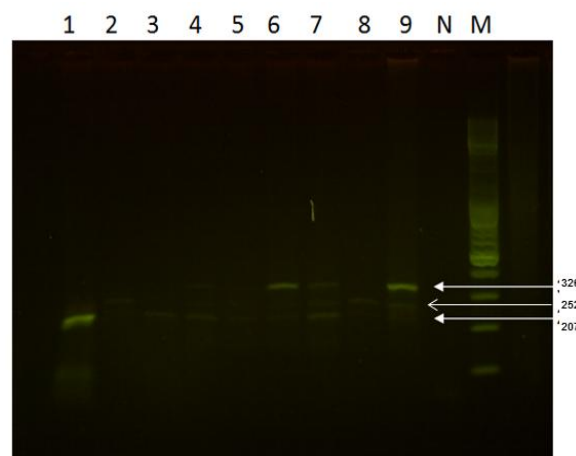


Figura 1: As amostra 1, 3 e 5 homocigotos não Sabino (*sb1/sb1*). Amostra 2,4,6,7,8 e 9 heterocigotos para sabino (*SB1/sb1*). N para controle negativo e M marcador de peso molecular (GeneRuler®).

Na imagem acima (Figura 1) é observado o resultado de um dos géis de agarose com os produtos correspondentes a amostras tanto de equinos com fenótipo compatível a Sabino-1 como de equinos sem o padrão de manchas característico. Animais sem o padrão de pelagem Sabino-1 (*sb1/sb1*) apresentam as bandas 207, 74 e 47 pb além da banda com 356pb. Animais homocigotos para Sabino-1

(SB1/SB1) apresentam somente as bandas 252 e 74 pb, enquanto que animais heterozigotos (SB1/sb1) possuem bandas 252, 207, 74 e 47 pb. As bandas de 74 e 47 pb não são observadas no gel de agarose, mas foram observadas no gel de poliacrilamida 10%.



Figura 2: Animal colorado mostrando as manchas características do animal sabino.

Estes resultados estão de acordo com a literatura descrita por Brooks e Bailey(2005) confirmando a presença do SNP na região do 16º *intron* que resulta no fenótipo sabino. Os animais apresentados foram classificados pela ABCCC e, até o momento, nenhum dos animais testados foi homozigoto para a mutação Sabino-1.

#### 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados até o momento, a mutação descrita na literatura para outras raças, também está presente no cavalo crioulo.

#### 5 REFERÊNCIAS

BROOKS, S.A.; BAILEY, E. Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. **Mammalian Genome**, vol.16, p893-902, 2005

CASTLE, N. Equine KIT Gene Mutations. **Dun Central Station Web Site**.

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

HASSE, B.; BROOKS, S.A.; SCHLUMBAUM, A.; *et al.* Allelic Heterogeneity at the Equine KIT Locus in Dominant White (W) Horses. **PLoS Genetics**, vol.3, e.195., 2007

SPONENBERG, D.P. **Equine color genetics**. 3a ed. Editor Wiley-Blackwell, Iowa. 2009. 277p.