

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**INFLUÊNCIA DA MUTAÇÃO NO *EXON 2* DO GENE *SLC36A1*
(*Solute Carrier family 36 member 1*) NO FENÓTIPO *CHAMPANHE*
EM CAVALOS CRIoulos.**

Francine Bastos Maagh

Pelotas, 2014

Francine Bastos Maagh

**INFLUÊNCIA DA MUTAÇÃO NO *EXON 2* DO GENE *SLC36A1*
(*Solute Carrier family 36 member 1*) NO FENÓTIPO *CHAMPANHE*
EM CAVALOS CRIoulos.**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Dr. Heden Luiz Marques Moreira.

Orientadora de Estágio: Ma. Carla Giovane Ávila Moreira.

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M111i Maagh, Francine Bastos
Influência da mutação no Exon 2 do gene SLC36A1 (Solute Carrier family 36 member 1) no fenótipo champanhe em cavalos crioulos / Francine Bastos Maagh. – 49f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Heden Luiz Marques Moreira.

1.Biotecnologia. 2.Cavalo crioulo. 3.Loci Champanhe (CH). 4.Mutação. 5.Exon 2. 6.Diluição. 7.Gene SLC36A1. I.Moreira, Heden Luiz Marques. II.Título.

CDD: 636.1

Banca Examinadora:

Heden Luiz Marques Moreira - Dr - UFPel;

Carla Giovane Ávila Moreira – Doutoranda – PPG/UFRGS

Vinicius Farias Campos– Dr – UFPel;

“Dedico este trabalho de conclusão de curso a minha família que sempre esteve presente em todos os momentos e a todos os amigos que torceram pelo meu sucesso.”

Agradecimentos

Aos meus pais, Claudio José da Silva Maagh e Lúcia Regina Bastos Maagh, que foram a minha base sempre, apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida. Minha mãe, sempre presente e acompanhando esta fase da graduação e meu pai, espiritualmente acompanhando este processo e certamente feliz e torcendo pelo meu sucesso.

A minha irmã, Samanta Bastos Maagh, que sempre foi uma grande parceira e amiga que pude contar sempre, em todos os momentos e para qualquer coisa.

Ao meu namorado Marcos Britto da Silva, pelo carinho, companheirismo e paciência durante os momentos mais complicados que surgiram durante a graduação.

A minha madrinha, meu padrinho, tios, primos, vó, cunhado, sogros, enfim, a toda minha família pelo apoio, incentivo, preocupação e amor. Todos contribuíram e foram importantes em algum momento desta jornada acadêmica.

A minha concunhada Priscila e ao meu cunhado Mateus, pela boa vontade e ajuda no momento em que precisei de auxílio enquanto redigia o trabalho de conclusão de curso.

Ao meu orientador acadêmico, Heden Luiz Marquez Moreira, pela oportunidade de estágio, por participar de seus projetos, pelo incentivo, dedicação e ensinamentos, que contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação.

A minha orientadora de estágio, Carla Giovane Ávila Moreira, pela atenção, dedicação, paciência e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos de graduação, Bruna, Cintia, Fabrício, Filipe, Francine, Helene, Melina, Rafaela e Tatiane, por toda alegria e risadas que eram frequentes, pelo companheirismo nos momentos bons e de dificuldade, a amizade e o incentivo que sempre tive convivendo com essas pessoas que alegraram os meus dias acadêmicos e que pretendo levar para a vida toda.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Engenharia Genética Animal, Gabriella, Harold, Nati, Juan e Diones que sempre me auxiliaram ajudando nas práticas e esclarecendo dúvidas, pelas palavras de incentivo e por todos os momentos de descontração que contribuíram para que os dias fossem menos estressantes, o que comprova a grande família que é o LEGA.

A todos os meus amigos, principalmente, Bianca, Graciele, Cíntia, Liliam e Fernanda pelo incentivo, carinho, paciência em alguns momentos de reclamações, pelas risadas e apoio sempre que precisei.

Aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia, que com grande competência transmitiram o conhecimento e auxiliaram em todos os momentos em que foram solicitados, e que sem dúvida contribuíram para minha formação profissional e que sempre terei enorme respeito e carinho.

A banca por ter aceitado o convite.

Por fim, a todos que contribuíram nessa fase da minha vida, que sem dúvida é a mais importante, se tratando da profissão que pretendo exercer,

Muito Obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

RESUMO

MAAGH, Francine Bastos. **Influência da mutação no exon 2 do gene *SLC36A1* (Solute Carrier family 36 member 1) no fenótipo *champanhe* em cavalos crioulos**. 2014. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso– Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A raça de cavalo crioulo possui grande importância para o agronegócio brasileiro. Sendo que estes animais possuem características significativas como rusticidade e fácil adaptação ao clima, nutrição e solo. Levando em consideração, que a característica fenotípica é um importante critério de seleção para os criadores de animais, é de grande valia o entendimento molecular que determina de que forma ocorre o controle genético para cor da pelagem em equinos. Sabe-se que para isso ocorre o envolvimento de genes que definem a capacidade de produzir pigmento melânico básico ou ainda que atuam diluindo a cor da pelagem. Essas variações no revestimento são provenientes de uma variedade de mutações que interferem na atuação normal do gene em diversas fases da produção de pigmento. Existem pelo menos três genes envolvidos nas variantes diluídas, entre eles, o gene responsável pela diluição *champanhe* que pertence à família *Solute Carrier family 36 member 1* (*SLC36A1*) envolvido na produção de pigmento em equinos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a existência da diluição *champanhe* e a base molecular que gera modificações fenotípicas para esta diluição em cavalos da raça crioula. Foram utilizadas dez amostras de cavalos de criadores registrados na Associação Brasileira de Cavalos Crioulos, dessa forma a partir das amostras de sangue foi realizada a extração de DNA e a amplificação *in vitro* da região de interesse com *primers* específicos para posterior sequenciamento. Os resultados obtidos com o alinhamento das sequências evidenciam que não há mutação na região analisada nas amostras de cavalo crioulo quando comparadas com a amostra controle para a mutação. Tal fato sugere que a análise pode não ter sido realizada em amostras com padrão *champanhe* ou a inexistência desta diluição na pelagem da raça crioula. Ainda, foi constatada a presença de dois pontos onde ocorreu troca de bases demonstrando a possibilidade de mutações na amostra referente a um cavalo Lobuno, o que pode ter relação com um padrão *champanhe* no cavalo crioulo em um ponto ainda não descrito. Dessa forma, são necessárias análises com um número maior de amostras de cavalos Lobunos para amplificação e análise do ponto onde ocorreu a mudança de bases, para verificar se realmente essa troca de bases é uma mutação recorrente ou somente uma mutação causal não codificante. Neste sentido, a pesquisa relacionada à pelagem pode contribuir para otimização ou criação de novos testes moleculares visando à seleção e melhoramento genético animal de acordo com as características desejadas pelo produtor.

Palavras-chave: Cavalo Crioulo; Mutação; Exon dois; Diluição; Gene *SLC36A1*; *Loci Champanhe* (*CH*).

ABSTRACT

MAAGH, Francine Bastos. **Mutation Influence on exon 2 of the gene *SLC36A1* (Solute Carrier family 36 member 1) on the phenotype champagne in *Crioulo* horses.** 2014. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso—Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The *Crioulo* horse breed has great importance to the Brazilian agribusiness as these animals have significant features, like hardiness and easy adaptation to climate, nutrition and soil. Taking into consideration that the phenotypic trait is an important selection criterion for animal breeders, it is of great value that the molecular understanding that determines how the genetic control occurs in the pelage color in equines. It is known that for this to happen occurs the involvement of genes that define the ability to produce the basic melanin pigment or that even act diluting the pelage color. These variations in the coating come from a variety of mutations which interfere with the normal role of the gene in various stages of pigment production. There are at least three genes involved in the diluted variants, among them there is the gene responsible for the champagne dilution and that belongs to the family *Solute Carrier family 36 member 1* (*SLC36A1*) involved in pigment production in equines. Thus, the aim of this study was to investigate the existence of champagne dilution and the molecular basis that generates phenotypic changes to this dilution in horses from the *Crioulo* breed. Ten samples of horses were used from the Brazilian Association of *Crioulo* Horses. Moreover, from the blood samples were performed the DNA extraction and the *in vitro* amplification of the region of interest with specific primers for further sequencing. The obtained results with the sequences alignment show that there is no mutation in the analyzed region in the *Crioulo* horses samples when compared to the control sample for the mutation. Such fact suggests that the analysis may not have been performed on samples with the champagne standard or the non-existence of this dilution in the *Crioulo* breed pelage. Furthermore, the presence of two points was found where occurred exchange of bases, demonstrating the possibility of mutations in the sample regarding a Lobuno horse, which may be related to a champagne standard in the *Crioulo* horse at a point not yet described. Therefore, analysis with a greater number of Lobuno horse samples are necessary for amplification and analysis of the point where the base change has occurred, to verify whether this exchange of bases is actually a recurrent mutation or only a non-coding casual mutation. In this regard, the research related to the pelage may contribute to the optimization or creation of new molecular tests aiming the selection and the improvement of animal genetics according to the desired characteristics by the animal breeder.

Keywords: *Crioulo* horse; Mutation; Exon two; Dilution; *SLC36A1* gene; *Loci Champagne (CH)*.

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem referente ao Cavalo Crioulo	18
Figura 2 – Processo bioquímico da síntese de melanina	22
Figura 3 – Localização do gene SLC36A1 no cromossomo 14	28
Figura 4 – Posição da proteína transmembrana no melanossomo	30
Figura 5 – As diferentes pelagens de cavalos crioulos escolhidas para a análise molecular	32
Figura 6 – Alinhamento da sequência controle com as amostras de cavalo Crioulo	36
Figura 7 – Possível mutação evidenciada com <i>SNPs</i> após o alinhamento.....	38
Figura 8 – Presença de dois picos (Timina e Guanina) sugerindo mutação em um possível heterozigoto	39
Figura 9 – Presença de picos (Timina e Adenina) sugerindo mutação em um possível heterozigoto	39

Lista de Abreviaturas e Siglas

A - Adenina

ABCC - Associação Brasileira de Cavalo Crioulo

ASIP - Agouti Signalling Peptide

C – Citosina

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CH - Champanhe

CR – Cream

DCT - Dopacromo Tautomerase

DHI - Diidroxiindol

DHICA - Diidroxiindol-ácido carboxílico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

DOPA – Dihidroxifenilalanina

EDN3 - Endotelina 3

EDNRB - Endothelin Receptor Type B

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid

G - Guanina

KIT - v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

KITL - KIT ligand

LAMP1- Lysosomal Associated Protein 1

LEGA - Laboratório de Engenharia Genética Animal

LYAAT1- Lysosomal Amino acid Transporter 1

MC1R - Melanocortin 1 receptor

MITF - Microphthalmia-associated transcription factor

MLPH - Melanophilin

mM – milimolar

MYO5A - Myosin VA

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ng – nanogramas

PAT1 – Proton/Amino acid Transporter 1

pb - pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - potencial Hidrogeniônico

PKA - Proteína Quinase A

PMEL17 - Melanocyte protein 17 precursor

pmol – picomolar

POMC - Proopiomelanocortin

SNP - Single-Nucleotide Polymorphism

T - Timina

TYR - Tyrosinase

TYRP1- Tyrosinase Related Protein 1

TYRP 2 - Tyrosinase Related Protein 2

U – Unidade

UFPeI - Universidade Federal de Pelotas

Z – Silver

α-MSH- Melanocyte-Stimulating Hormones

°C - Graus Celsius

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. Revisão de Literatura.....	18
3.1. Cavalo crioulo.....	18
3.2. A formação da cor da pelagem em equinos.....	19
3.2.1. Melanócitos e Biogênese do Melanossoma.....	19
3.2.2. Melanogênese e tipos de Melanina	21
3.3. Classificação da Pelagem e Controle Gênico	23
3.4. Pelagens de diluição	25
3.4.1. Diluição Champanhe	26
3.4.2. Família SLC- gene SLC36A1.....	27
4. Materiais e Métodos	31
4.1. Coleta de amostras	31
4.2. Extração de DNA.....	32
4.3. Escolha do primer e Gradiente de Temperatura	33
4.4. PCR e Purificação do Produto.....	33
4.5. Sequenciamento	35
5. Resultados e Discussão	36
6. Conclusão.....	41
7. Referências.....	42

1. Introdução

A raça de cavalo crioulo é muito conhecida e possui grande importância no agronegócio brasileiro, em especial, no Rio Grande do Sul. O cavalo crioulo teve sua origem a partir de animais de sangue Andaluz, Berbere e do Árabe trazidos por espanhóis, durante a colonização das Américas. São animais rústicos, ágeis e que se adaptam a diversos fatores, entre eles, clima, nutrição e o solo (GIACOMONI, 2007).

Com relação à pelagem, o cavalo crioulo do Brasil, possui uma grande variedade, as quais são classificadas em 55 subdivisões, relacionadas a tipo de pelagem, variações de tonalidade e particularidades (MOREIRA *et al.*; 2010). Ainda, existem mais de 150 genes identificados que influenciam de diversas formas a pigmentação, atuando na formação de células especializadas na produção de melanina e distribuição da mesma (CIESLAK *et al.*; 2011; HUBBARD *et al.*; 2010).

A determinação genética para cor da pelagem em equinos tem o envolvimento de no mínimo 30 genes identificados que definem a capacidade de produzir pigmento melânico para coloração básica (baia, castanha ou preta), que atuam produzindo manchas ou pigmentação específica e ainda diluindo a cor da pelagem, ou seja, modificando a cor base, diminuindo sua intensidade. Tais variações no revestimento são ocasionadas por uma variedade de mutações, incluindo, *Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)*, duplicações, inserções e deleções que interferem na atuação normal do gene em diversas fases da produção de pigmento (SPONENBERG, 2003; CIESLAK *et al.*; 2011; VALLE; LEON, 2012).

Na literatura, são descritos pelo menos três genes de diluição em equinos, controlados pelo *loci Champanhe (CH)*, *Silver ou (Z)* e *Cream (CR)* (THIRUVENKADAN *et al.*; 2008). O gene responsável pela diluição champanhe pertence à família *SLC36A1 (Solute Carrier 36 family A1)*, sendo que este gene codifica uma proteína simportadora que atua no transporte de próton/aminoácido através do movimento transmembrana (THWAITES; ANDERSON, 2011; COOK *et al.*; 2008).

Segundo, COOK *et al.* (2008) em sua pesquisa, uma mutação não sinônima no segundo exon do gene *SLC36A1* mostrou associação completa

com fenótipo de diversas raças de equinos para pelagem denominada champanhe.

Desta forma, torna-se relevante realizar investigações relacionadas com a base molecular que gera modificações fenotípicas para a pelagem diluída champanhe em cavalos da raça crioula. Assim, contribuindo para otimização ou criação de novos testes moleculares visando à seleção e melhoramento genético animal de acordo com as características desejadas pelo produtor a partir desta raça que tem evidente importância econômica para o país.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar a ocorrência de mutação no *exon 2* do gene *SLC36A1* e sua relação com as características fenotípicas de diluição champanhe na pelagem de cavalos da raça crioula.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar a ocorrência de mutação no gene *SLC36A1* em diversas pelagens possivelmente diluídas de cavalos da raça crioula.

Analisar comparativamente a ocorrência de outras alterações nucleotídicas nas sequências das amostras de cavalos crioulos quando comparadas com uma sequência controle sem mutação.

3. Revisão de Literatura

3.1. Cavalo crioulo

A criação de equinos tem uma significativa importância comercial, sendo o Brasil um dos países que se encontra em evidência neste mercado. De acordo com o Ministério da Agricultura, até o presente ano, o Brasil possui o maior rebanho na América Latina e o terceiro na classificação mundial, com aproximadamente oito milhões de animais, movimentando R\$ 7,3 bilhões somente com a produção de cavalos.

A América do Sul possui umas das raças de cavalos mais vigorosas do mundo, o cavalo crioulo, observado na (Fig.1). Existem variações na estatura e requinte dependendo da região. Embora, alguns tipos sejam bastante diferenciados do crioulo básico, como crioulo da Argentina e do Uruguai, todos descendem da mesma criação espanhola sendo introduzidos pelos colonizadores no século XVI (SILVER, 2000). A origem desses animais se dá principalmente, a partir de animais de sangue Andaluz, Berbere e do Árabe tendo como característica a fácil adaptação ao clima, nutrição e o solo além de possuir grande resistência e agilidade (GIACOMONI, 2007). Existem afirmações de que a distribuição de cores nas pelagens do tipo baia e ruiva evoluiu como coloração conferindo proteção natural ao animal (SILVER, 2000).



Figura 1 - Imagem referente ao Cavalo Crioulo.
Foto: Francine Maagh.

Com o crescimento econômico relacionado com a reprodução de cavalos e a procura por animais com alto valor genético, estudos feitos visando o melhoramento podem auxiliar na obtenção de animais não só com morfologia e fisiologia desejada para o desempenho esportivo, mas também, características fenotípicas específicas visadas pelo criador (LEON; COLLARES, 2012). Dessa forma, a pelagem merece destaque, tanto por seu valor estético de coloração quanto por muitas vezes determinar patologias relacionadas com um padrão de cor de pelos. Assim, pesquisas moleculares relacionadas à pelagem podem contribuir na identificação de genes e mutações responsáveis pelas variantes na cor do pelo, podendo aprimorar ou desenvolver novos testes de diagnóstico molecular e de seleção genética (THIRUVENKADAN *et al.*; 2008).

3.2.A formação da cor da pelagem em equinos

A formação do pigmento que confere a coloração na pelagem de cavalos ocorre principalmente com o desenvolvimento de células especializadas na produção/distribuição de melanina e através de enzimas envolvidas nas cascatas bioquímicas para formação de melanina (eumelanina ou feomelanina) nos melanossomos. Sendo necessário, para que ocorra este processo, o envolvimento de genes que comandam estas etapas que vão desde a migração e desenvolvimento dos melanócitos, a formação de melanossomos, melanogênese até a transferência do melanossomo para queratinócitos ou folículo piloso em determinadas regiões (OLIVEIRA *et al.*; 2003; SPONENBERG, 1997; THIRUVENKADAN *et al.*; 2008).

3.2.1. Melanócitos e Biogênese do Melanossoma

A melanina é um pigmento sintetizado em pequenas vesículas intracitoplasmáticas chamadas melanossomas que são produzidas dentro de melanócitos, sendo estes, células dendríticas embriologicamente derivadas dos melanoblastos (provenientes da crista neural) e especializadas na biossíntese desse pigmento (SULAIMON *et al.*; 2003; THIRUVENKADAN *et al.*; 2008).

Inúmeras citocinas, fatores de transcrição e de crescimento estão envolvidos como suporte para diferenciação de melanócitos e síntese de melanossomos. Uma vez estabelecido o destino desta célula que pode ser disposta em diversos locais, como exemplo, olhos (epitélio pigmentar retiniano, coróide e íris), matriz dos pelos e pele, começam a serem produzidos os melanossomos (BOISSY, 1988; SULAIMON *et al.*; 2003). Os melanossomos são organelas especializadas na síntese e armazenamento de melanina e depósito de tirosinase, enzima produzida pelos ribossomos e que possui papel fundamental na síntese de melanina (KUSHIMOTO *et al.*; 2001; MOSHER *et al.*; 1999).

O desenvolvimento e diferenciação de melanócitos, a síntese de melanossomos e migração ocorrem através de uma cascata de sinalização molecular que envolve diversos receptores de melanócitos que desempenham papéis cruciais nestas etapas. Como exemplo, *Endothelin Receptor Type B* (EDNRB) juntamente com seu ligante *Endothelin 3* (EDN3), *v-kit Hardy-Zuckerman4 feline sarcoma viral oncogene homolog* (KIT) com seu ligante *KIT ligand* (KITL) e fatores de transcrição como, *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) que atua no processo de diferenciação dos melanócitos, na regulação da expressão de proteínas envolvidas na síntese de melanina e ainda aciona uma via de sobrevivência dos melanócitos (CIESLAK *et al.*; 2011; REID *et al.*; 1995; VIDEIRA *et al.*, 2013). Os melanossomos possuem proteínas estruturais como a *Melanocyte protein 17 precursor* (PMEL17/ SILV), proteínas relacionadas com a regulação do potencial Hidrogeniônico (pH) atuando na forma de canais de transporte de membrana, como a Proteína P (*P-Protein*) também conhecida por OCA2, proteínas de membrana da superfamília transportadora de soluto como, SLC36A1 e ainda enzimas relacionadas com a melanogênese e tipo de melanina produzida, como exemplo, *Tyrosinase* (TYR), *Tyrosinase Related Protein 1 e 2* (TYRP1 - TYRP2) e *Dopachrome Tautomerase* (DCT) (CIESLAK *et al.*; 2011; COSTIN *et al.*; 2007).

A formação do melanossomo passa por estágios de maturação, sendo basicamente, quatro níveis de diferenciação de acordo com a sua estrutura, quantidade e arranjo de melanina produzida. Desta maneira, a evolução morfológica começa com estruturas despigmentadas sem atividade da

tirosinase e sem elementos estruturais internos, apenas, uma matriz filamentososa pouco definida (estágio I ou pré-melanossomo), posteriormente é detectada a presença e atividade de tirosinase e da proteína estrutural *PMEL17*, sendo que esta confere a formação de fibras alongadas ao melanossoma (estágio II), no estágio (III e IV) o pigmento passa a ser depositado nas fibrilas internas e por fim as organelas ficam altamente preenchidas de melanina e com baixa atividade de tirosinase. Assim a melanogênese nos mamíferos é dependente de componentes funcionais e estruturais, sendo estes, as enzimas e matriz, respectivamente (BERSON *et al.*; 2001; CIESLAK *et al.*; 2011; KUSHIMOTO *et al.*, 2001; MACHADO, 2006).

3.2.2. Melanogênese e tipos de Melanina

Um aspecto importante para que ocorra a melanogênese é o desencadeamento do processo de síntese do tipo de melanina. Os melanócitos possuem o receptor de superfície chamado *Melanocortin 1 receptor (MC1R)* ao qual se liga o hormônio pituitário *Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH)* para síntese de eumelanina ou ainda pode ocorrer a ligação da proteína de sinalização ASIP (*Agouti Signalling Peptide*), que atua bloqueando a ligação do α -MSH no mesmo receptor, acarretando na produção de feomelanina (THIRUVENKADAN *et al.*; 2008). Além disso, existe a proteína β -Defensina 103 B (CBD103) que atua alternando a produção de eumelanina e feomelanina (CIESLAK *et al.*; 2011). Assim a pigmentação é principalmente determinada pela quantidade relativa de duas melaninas básicas, a eumelanina, envolvida com a pigmentação preta e marrom e a feomelanina, com a pigmentação vermelha e amarela (LE PAPE *et al.*; 2008). Em geral, a morfologia do melanossoma tem relação com o tipo de melanina produzida. Sendo que o eumelanossoma é elíptico e contém matriz fibrilar, enquanto o melanossoma que produz feomelanina tem formato variável, contudo, apresenta normalmente uma estrutura vesiculoglobular (SLOMINSKI *et al.*, 2003).

Ambos os pigmentos são sintetizados a partir da tirosina que é obtida através da conversão da fenilalanina por ação da enzima fenilalanina hidroxilase. A tirosina é um aminoácido que é convertido através da enzima

tirosinase em subprodutos que participam de cascatas bioquímicas para geração de ambos os pigmentos (HEARING *et al.*; 1991). A síntese de tirosinase ocorre nos ribossomos que se encontram aderidos à membrana da superfície do retículo endoplasmático rugoso, sendo então, transferida para o complexo de Golgi ocorrendo assim à formação de uma vesícula formada a partir de um precursor endossomal/ lisossomal, sendo esta a etapa de transição do estágio I para o estágio II de formação do melanossomo onde, começa o processamento da tirosina para gerar o pigmento. Sendo que, este processo de formação vesicular e constituintes deste processo ainda não são totalmente compreendidos (ANCANS *et al.*; 2001; CIESLAK *et al.*; 2011; KUSHIMOTO *et al.*; 2001; NICOLETTI *et al.*; 2002).

A atividade bioquímica da tirosinase para obtenção da eumelanina e feomelanina ocorre nas etapas demonstradas a seguir, conforme a (Fig. 2).

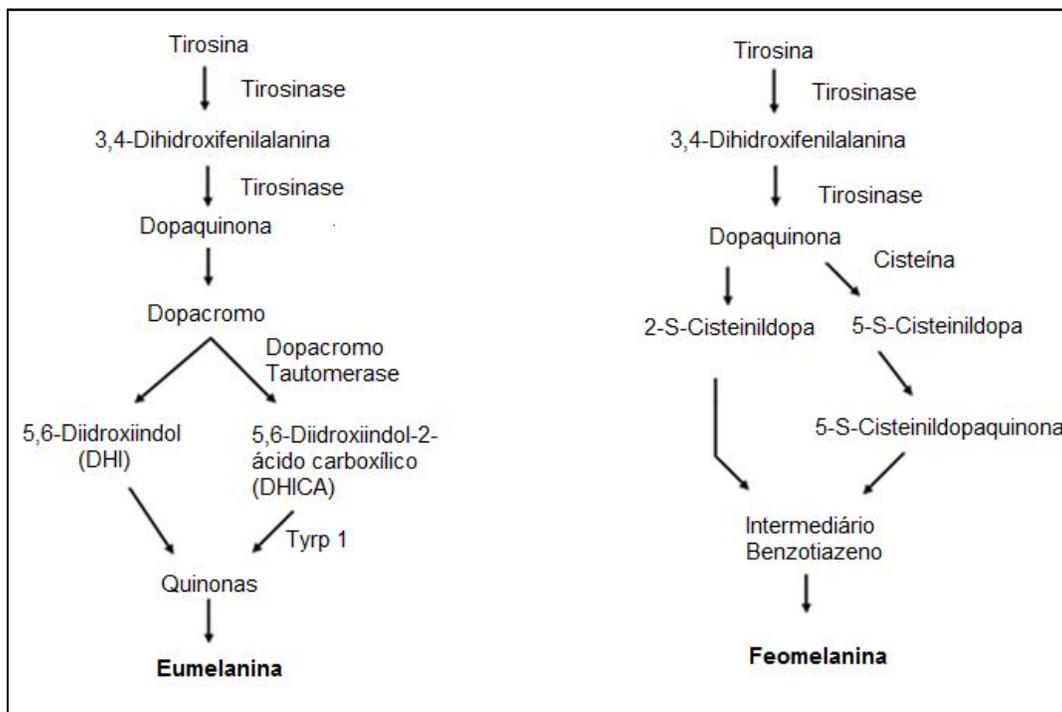


Figura 2 - Processo bioquímico da síntese de melanina.
Fonte: Adaptado de THIRUVENKADAN *et al.*; 2008.

A tirosinase catalisa a hidroxilação da tirosina para 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e a posterior oxidação para dopaquinona, sendo esta etapa comum a formação das duas melaninas (ANCANS, J. *et al.*, 2001; FULLER, B. B. *et al.*, 2001). A partir desta etapa, para a síntese de eumelanina,

dopaquinona é convertida em dopacromo, sendo que existem duas vias de degradação de dopacromo. A primeira via forma 5,6- diidroxiindol (DHI) e a segunda forma 5,6-diidroxiindol-2-ácido-carboxílico (DHICA), tal processo catalisado pela proteína relacionada com a tirosinase 2 (Tyrp 2) que tem atividade funcional como dopacromo tautomerase (*Tyrp 2-Dct*), oxidando dessa forma, diidroxiindois a quinonas. Já a proteína relacionada com a tirosinase 1 (Tyrp 1) está envolvida com o processo de oxidação da DHICA até a formação de eumelanina. No entanto, para formação de feomelanina, a atividade enzimática da cisteína a partir da dopaquinona resulta em 5-S-cisteinildopa e, em menor proporção, a 2-S-cisteinildopa. Em seguida, as cisteinildopas são oxidadas em intermediários benzotiazínicos produzindo feomelanina (HEARING, 1999; ITO, 2003; JACKSON, 1994; SEARLE, 1968).

Dessa forma, após a pigmentação do melanossomo, os mesmos são transportados, através de microtubulos, a partir da região perinuclear para a região dos prolongamentos (dendritos) do melanócito. Este transporte ocorre via cinesina ao longo da rede microtubular, através de um complexo de proteínas motoras como exemplo, *Melanophilin (MLPH)* e *Myosin VA (MYO5A)*. Assim, por exocitose, o pigmento é transferido para células da epiderme (queratinócitos) e podem permanecer na mesma ou migrar para o folículo piloso conferindo coloração específica através do pigmento (CIESLAK *et al.*; 2011; OLIVEIRA *et al.*; 2003; SPONENBERG, 1997).

3.3. Classificação da Pelagem e Controle Gênico

As cores preta, castanha e baia são as cores básicas da maioria dos cavalos (SPONENBERG, 2003). As pelagens podem ser classificadas, de uma forma geral, como simples, compostas e justapostas. As pelagens simples são as formadas por pelos e crinas de uma só cor dispostos de maneira uniforme, são exemplos as pelagens de cor branca (evento raro), preta e castanha. As pelagens consideradas como compostas são formadas por duas ou três cores diferentes de pelos, ou até mesmo, variação de cores no mesmo pelo, como a pelagem tordilha. Ao passo que, as pelagens conjugadas ou justapostas são diferenciadas pela presença de manchas brancas ou despigmentadas como, overo e tobiano (REZENDE; COSTA, 2007). Além disso, a pelagem pode variar

de acordo com a intensidade de cor produzida, como as diluídas ou ainda, com a incapacidade de formar pigmentos melânicos, relacionada com a homozigose recessiva de alelos do gene responsável pela pigmentação gerando animais albinos (THIRUVENKADAN *et al.*; 2008).

Uma série de genes tem envolvimento em diversas etapas da pigmentação na pelagem, codificando proteínas que estão envolvidas no desenvolvimento embrionário, migração e diferenciação de melanoblastos, proliferação de melanócitos, formação do melanossoma (integridade estrutural), síntese de melanina e distribuição do pigmento. Dessa forma, alterações nesses genes implicam em variadas desordens que interferem no resultado do processo de pigmentação (HEARING *et al.*; 2006).

Os alelos de variados genes causam determinadas características fenotípicas na pelagem de equinos e em alguns momentos interferem um na ação do outro. Como exemplo, temos o locus A (*agouti*) e E (*extension*) que controlam as duas proteínas mais importantes na melanogênese e ainda o loci D (*dilution*) que é fundamental para a compreensão molecular das variantes de que interferem na intensidade de coloração no pelo (VOISEY; DAAL, 2002).

O Loci *Extension* (E) codifica o receptor *MC1R* e o seu antagonista peptídico *ASIP* é codificado pelo Loci *Agouti* (A) e controlam as quantidades e tipo de melanina sintetizada pelos melanócitos (RIEDER, 2009).

O *MC1R* é um receptor associado à proteína *Ge* localiza-se na superfície de melanócitos. A atividade melanogênica do *MC1R* é ativada, após a tradução de peptídeos derivados de *propiomelanocortin* (POMC), como exemplo, o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) que foi o primeiro peptídeo proveniente da POMC a ser identificado na pele. A ação do hormônio ocorre com o aumento da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), dessa forma, a proteína quinase A (PKA) é ativada, aumentando a expressão do Fator de Transcrição Associado a Microftalmia (MITF). Tal fator é fundamental para regulação dos processos que envolvem o melanócito, como síntese de melanina e regula ainda a tirosinase e proteínas relacionadas além de proteínas estruturais (BERTOLOTTO *et al.*, 1998; BUSCÀ, BALLOTTI.; 2000). Com isso, a sinalização pelo α -MSH ou *ASIP* através do *MCR1* regula o tipo de melanina produzida, sendo que a interação do α -MSH com *MCR1* ativa a via

conduzida pela tirosinase e resulta na produção de eumelanina (CIESLAK *et al.*; 2011; THODY *et al.*; 1998; VOISEY *et al.*; 2003).

A proteína de sinalização ASIP, participa significativamente na via de sinalização por MC1R. O resultado da atuação desta proteína é aumento da feomelanina e na diminuição da síntese de eumelanina, através do bloqueio da via de sinalização MC1R (CIESLAK *et al.*; 2011; RIDER *et al.*; 2001). O alelo mais comum no locus *Agouti* é dominante, atua restringindo o preto a locais específicos, ou seja, crinas e caudas e, em alguns casos a linha dorsal e as extremidades dos membros, resultando em cavalos baios. Por outro lado o alelo recessivo em homozigose produz cavalos pretos (SPONENBERG, 2003).

Este aumento de feomelanina determina o clareamento da pelagem em áreas específicas. Desta forma, se o animal estiver produzindo pigmento preto e o gene para feomelanina estiver sendo expresso em determinadas áreas da pelagem ocorrerá a coloração vermelha e se o pigmento produzido for castanho a presença da feomelanina produz áreas específicas de tonalidade amarelada (VALLE; LEON, 2012). Outro aspecto importante é o de que diferentes mutações dominantes ou recessivas nestes genes podem alterar a proporção das duas melaninas e como consequência causar variação na pelagem (CIESLAK *et al.*; 2011; JACKSON, 1997).

Assim sendo, a partir das colorações básicas, todas as outras tonalidades de pelagem de cavalos podem ser construídas por várias modificações sobrepostas a elas. Entre as modificações das pelagens devem ser citadas as diluições, que ocorrem com a ação do alelo dominante D (*dilution*) diluindo a tonalidade da pelagem e agindo na intensidade e distribuição do pigmento produzido. As pelagens resultantes das diluições são basicamente prata, a creme e a champanhe (COOK *et al.*, 2008; SPONENBERG, 2003).

3.4. Pelagens de diluição

Os genes que atuam sobre pelagens básicas e conferem diminuição na intensidade de coloração são denominados “diluidores” ou genes de diluição. É sabida a existência de no mínimo três genes de diluição em equinos,

controlados pelos *loci Cream* ou (*CR*) *Silver* ou (*Z*) ou *Champanhe* (*CH*) (COOK *et al.*, 2008).

A diluição creme está relacionada com o gene *Solute Carrier 45 family A2* (*SLC45A2*). Sendo este efeito fenotípico oriundo de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no *exon 2* do gene localizado no cromossomo 21 (MARIAT *et al.*; 2003; COOK *et al.*; 2008). Já a mutação no gene *Premelanosome Protein* (*PMEL17*) situado no cromossomo seis, está relacionada com a diluição prata. Esta alteração ocorre no *exon 11* deste gene sendo que a diluição prata em equinos mostra uma herança autossômica dominante caracterizada pela diluição da eumelanina, mas com efeito da feomelanina diminuído ou inexistente (BRUNBERG, *et al.*, 2006).

Por conseguinte, a diluição champanhe é o resultado de uma mutação no segundo *exon* do gene *Solute Carrier 36 family A1* (*SLC36A1*) (COOK *et al.*, 2008). Dessa forma, o gene e a mutação responsável pelo fenótipo champanhe serão melhor elucidados, a partir de agora, contribuindo para o entendimento dessa variação na pelagem de equinos.

3.4.1. Diluição Champanhe

A pelagem champanhe em equinos é resultado da ação de um gene autossômico dominante *CH*. O gene *SLC36A1* foi descrito e com comprovada correlação com a diluição champanhe em diversas raças de equinos, porém, em função do fenótipo resultante dessa diluição, os criadores têm dificuldade de diferenciar a pelagem champanhe da produzida pelo gene *Cream* (*CR*). Sendo uma característica de ambos os *locus* gênicos a ocorrência de diluição em eumelanina e/ou feomelanina (COOK *et al.*; 2008).

Algumas características auxiliam na identificação do efeito gerado pelo *CH*, como exemplo, a diluição de ambos os tipos de melaninas em sua forma heterozigótica, a dificuldade de distinção do fenótipo champanhe quando está em homozigose ou heterozigose e ainda, a pele rosada e a cor dos olhos que são azuis ao nascer e gradualmente se tornam âmbar conforme o crescimento do animal. Os animais apresentam ainda sardas escuras, especialmente em

torno da boca, olhos e cauda, sendo mais escuras e mais numerosas do que em cavalos com diluição creme (COOK *et al.*; 2008; SPONENBERG, 2003).

De uma forma geral, os cavalos diluídos geram cores intermediárias a partir de cores base, dessa forma, existe o champanhe dourado (sobre o castanho) com crina e cauda semelhante ou quase branca, champanhe âmbar (sobre o baio), champanhe clássico- castanho claro (sobre o preto) com crina, cauda e pernas mais escuras e ainda a combinação de champanhe com creme produzindo fenótipos duplos diluídos em heterozigotos (SPONENBERG; BOWLING, 1996; COOK *et al.*; 2008).

3.4.2. Família SLC- gene SLC36A1

Em todos os organismos estão presentes proteínas de membrana que são responsáveis pelo controle da entrada de nutrientes essenciais, íons e saída de toxinas e resíduos celulares. Sendo estas proteínas denominadas transportadoras (BORST *et al.*; 2002). A caracterização funcional de sistemas de transporte de aminoácidos ocorre devido à análise de uma série de características, como exemplo, especificidade do substrato e dependência de íons (CHRISTENSEN, 1990; PALACIN *et al.*; 1998).

A família SLC (*Solute Carrier*) inclui genes que são responsáveis pela codificação de proteínas denominadas transportadoras de soluto. Sendo este transportador incluso em determinada família SLC dependendo da similaridade na sequência de aminoácidos (20 % ou mais) com outros integrantes da família. Como exemplo, o SLC36, os integrantes desta família, estão envolvidos no movimento transmembrana de aminoácidos e seus derivados (HEDIGER *et al.*, 2004; THWAITES.; 2011). A atividade de transporte, é de uma forma geral, dependente do pH, o que conduz a uma acidificação intracelular.

O gene evidenciado no presente trabalho, trata-se do SLC36A1 (*solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter) member 1*). Sendo este um gene codificador de proteínas de membrana transportadoras de próton e aminoácidos. A nomenclatura é referida ao primeiro gene da família 36,

localizado no cromossomo 14 em cavalos (*Equus caballus*) conforme (fig. 3) (NCBI, 2013).

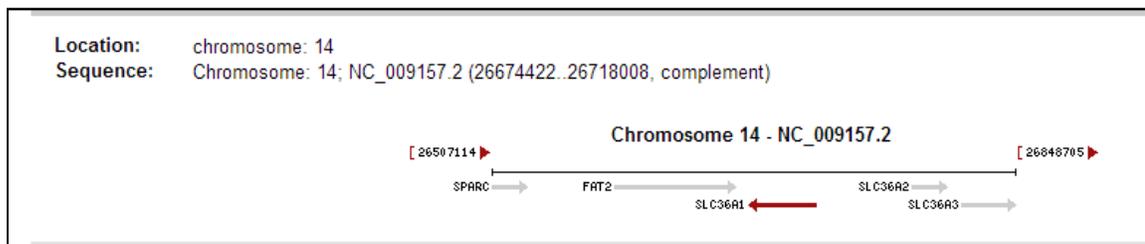


Figura 3 - Localização e sequência do gene SLC36A1 no cromossomo 14.
Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2013.

O gene SLC36A1 já foi clonado a partir de várias espécies como camundongo, humano e coelho, sendo o transporte conhecido como *Proton/Amino acid Transporter 1 (PAT1)* (BOLL *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003; MIYAUCHI *et al.*, 2005). Assim, PAT1 é um sistema caracterizado pelo transporte, ou seja, um próton acoplado ao transportador de aminoácidos localizados de forma mais ativa na membrana da superfície luminal do intestino, responsável pela absorção de aminoácidos (SUNDBERG, 2008).

O primeiro membro da família SLC36 teve seu cDNA isolado a partir de cérebro de rato e a proteína caracterizada com o nome *Lysosomal Amino Acid Transporter 1 (LYAAT1)* (SAGNE *et al.*; 2001; WREDEN *et al.*, 2003). Assim, a proteína LYAAT1 está localizada na membrana de lisossomos e associada com uma proteína lisossomal, *Lysosomal Associated Protein 1 (LAMP1)*. Nos lisossomos, permite o transporte de aminoácidos e prótons externos ao lisossomo para o seu interior (citossol) (WREDEN *et al.*; 2003).

Pesquisas com evidências sobre o envolvimento desse gene especificamente na pigmentação não existiam. Na literatura, existem evidências de genes ortólogos em outras espécies que interferem na pigmentação. O gene SLC45A2 (MATP), responsável por fenótipos de diluição creme em cavalos e tem suas variantes associadas com a pigmentação da pele em humanos (GRAF *et al.*, 2005). Contudo, os resultados obtidos na pesquisa de COOK *et al.* (2008) foram a primeira evidência da correlação do gene SLC36A1 com efeito sobre a pigmentação capilar e características da

coloração dos olhos e pele em cavalos. Sendo esta característica fenotípica, produto de uma substituição de bases de DNA, alterando um aminoácido no domínio transmembrana (arginina por uma treonina), acarretando em uma baixa intensidade da coloração em base- preta ou vermelha. Levando em consideração, que o pesquisador não descarta a possibilidade de ter ocorrido uma mutação causal não codificante que levou ao fenótipo champanhe.

As suposições que sustentam a influência da mutação no fenótipo champanhe ocorrem, pois segundo KUSHIMOTO *et al.* (2001), ao isolar melanossomos, na fase inicial, são observadas elevadas concentrações de *Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)* também conhecida como *Cluster of Differentiation 107a (CD107a)* em melanossomas de fase II. Sendo este, um marcador para organelas da linhagem lisossomal (BHATNAGAR *et al.*; 1998; DIMENT *et al.*; 1995). Tal fato pode ser explicado por melanossomos e lisossomos coexistirem em células de pigmento de mamíferos e ambos os tipos de organelas evoluem inicialmente pela mesma via compartilhando a mesma formação e mecanismos de tráfico podendo ocorrer à interação de proteínas nas fases iniciais de formação do melanossoma (CIESLAK *et al.*; 2011; COOK *et al.*; 2008; LUDWIG *et al.*; 1991). Assim, tem sido sugerido que o melanossoma representa um lisossoma altamente especializado em vez de uma estrutura completamente original.

Resumidamente, sabe-se que o pH da organela, é um dos principais fatores que afeta o processamento da tirosina, um *SNP (single-nucleotide polymorphism)* nesta proteína pode afetar o pH do melanossoma e como consequência interferir na atividade enzimática que é de fundamental importância para formação do pigmento. Há, no entanto, a controvérsia a respeito do pH ótimo para a atividade da tirosinase, podendo ser ácido e, portanto, este baixo pH melanossomal facilita a melanogênese. E a inativação da enzima em pH neutro (DEVI *et al.*; 1987; TRIPATHI *et al.*; 1988). No entanto, isso não é consistente com os achados de vários independentes grupos de mamíferos em que a tirosinase tem ótima atividade em pH neutro e sua atividade é perdida gradualmente com a diminuição do pH (HEARING *et al.*; 1976; TOWNSEND *et al.*; 1984). Contudo, também é necessário manter o gradiente do pH citosólico para atuação de outras proteínas necessárias para a formação e desenvolvimento do melanossoma, dessa forma, o gradiente de pH

da célula também pode ser alterado por esta mutação (WATABE *et al.*; 2003; WATABE *et al.*; 2008). A posição da proteína transmembrana do melanossomo é demonstrada conforme a (Fig. 4). Sendo assim, muito provável que a alteração do gradiente de pH celular em função dessa mutação interfere na atividade enzimática da proteinase e por consequência a diminuição na formação de pigmento. Dessa forma, esta proteína de membrana está envolvida no processo de melanogênese nas fases iniciais de formação do melanossoma (COOK *et al.*; 2008).

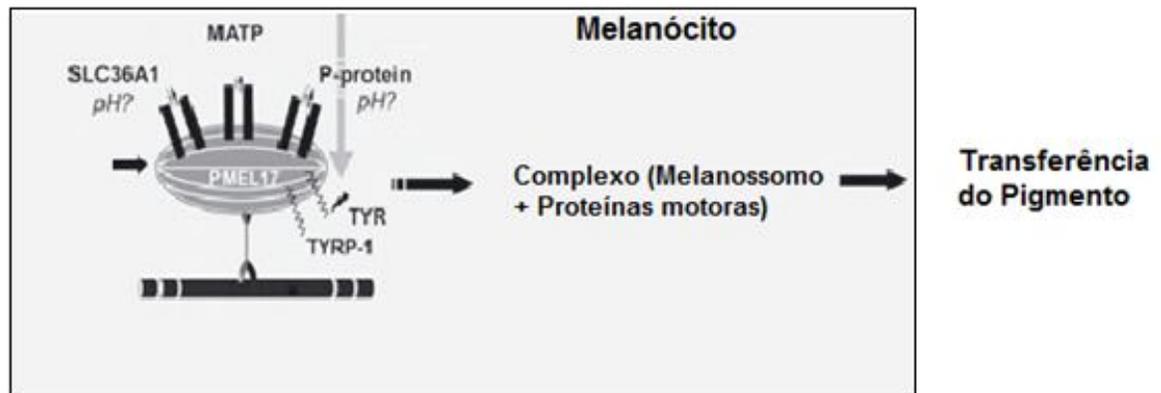


Figura 4 - Posição da proteína transmembrana no melanossomo.
Fonte: Adaptado de CIESLAK *et al.*; 2011.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta de amostras

As amostras para extração de DNA e análises do gene relacionado com a pelagem champanhe foram obtidas de animais em cabanhas localizadas no Rio Grande do Sul. Sendo seus criadores registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC), e a coleta ocorreu conforme contato previamente estabelecido com a respectiva associação.

Os materiais utilizados para coleta de amostra biológica foram: algodão, álcool 70%, luvas de procedimento, tubosBD Vacutainer® contendo *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA), para que não houvesse coagulação do sangue, agulha e seringa. Foi feita a contenção do animal na própria cabanha e realizada a assepsia na região da jugular do animal, local este que é mais recomendado para coleta de sangue, utilizando algodão embebido em álcool 70%. Após a limpeza do local foi feita uma leve pressão na região e a agulha foi introduzida na veia jugular, então foi colocado o tubo com EDTA e pela pressão formada o sangue fluiu para o tubo, onde ao final coletou-se 5 ml de sangue de cada animal. Depois deste procedimento foi retirado o tubo com a amostra e este foi imediatamente fechado, identificado e armazenado. Foi realizada novamente uma limpeza do local com algodão embebido em álcool 70% e o animal era liberado, sempre procurando evitar a formação de hematomas e sem estressar o animal.

As pelagens específicas foram fotografadas e os dados dos animais a serem analisados foram obtidos dos registros da ABCCC, além de informações coletadas diretamente dos criadores que disponibilizarão os animais para análise. Foram coletadas amostras no rebanho de 10 animais com as seguintes pelagens: Baia Encerada, Baia Ruana, Rosilha Gateada Ruiva, Colorada, Gateada Ruiva, *Cremella*, Lobuna e Baia com olhos negros, ilustradas na (Fig. 5).



Figura 5 - As diferentes pelagens de cavalos crioulos escolhidas para análise molecular. Os animais foram identificados na imagem pelas letras **(A)** Lobuno, **(B e C)** Gateado Ruivo, **(D)** Baio Ruano, **(E)** Baio Encerado, **(F)** Colorado, **(G)** Cremella e **(H)** Baio com olhos negros.

4.2. Extração de DNA

As extrações de DNA a partir de sangue foram realizadas de acordo com o protocolo do kit da Axygen® - *AxyPrepBloodGenomic DNA Miniprep Kit*, no Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) da Universidade Federal de Pelotas. As etapas básicas são resumidamente, a lise das células nucleadas do sangue, estabilização do DNA para que não haja degradação por nucleases e purificação através de membranas presentes nas colunas fornecidas pelo kit. O DNA genômico purificado é diluído em tampão Tris com baixo teor de sal, contendo EDTA, o que aumenta a solubilidade do DNA e ajuda a proteger o alto peso molecular do DNA contra subsequente degradação por nucleases. O DNA genômico sanguíneo é diretamente isolado dos glóbulos brancos (WBC) componente do sangue total, sem que seja preciso remover os glóbulos vermelhos (RBC's) antecipadamente. Ao longo do processo, existem diversas lavagens e centrifugações. Foram utilizados: tampão de lise celular, tampão para remoção de proteína, tampão de lavagem, tampão de dessalinização e tampão de purificação e proteção contra degradação por nucleases (TE).

Logo após essa etapa, foi confirmada a presença de DNA obtido a partir da extração do material genômico das amostras com a realização de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, verificando-se dessa forma a presença de bandas com peso molecular elevado, significando que a extração de material genômico foi bem sucedida.

4.3. Escolha do primer e Gradiente de Temperatura

Após a checagem da integridade do material genômico para análise do polimorfismo no gene, foram desenhados primers para amplificar fragmentos entre 320 a 400 pb. As sequências para desenho dos primers foram propostas com base no trabalho de COOK *et al.*; 2008. Dessa forma, foram utilizados os primers *Forward* 5'-CAG AGC CTA AGC CCA GTG TC-3' e *Reverse* 5'-GGA GGA CTG TGT GGA ATT GG-3' para possível visualização e avaliação da região em questão.

Uma vez estabelecido os primers utilizados foi necessário realizar um gradiente de temperatura para estabelecer a temperatura ideal para as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (polimerização propriamente dita) que ocorrem durante os ciclos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para uma eficiente amplificação da região almejada no material genômico. O gradiente de temperatura é baseado na utilização de diferentes temperaturas de anelamento para amplificar amostras controles, a fim de se encontrar a temperatura ideal de cada *primer*. Com a verificação do gradiente ficaram estabelecidas as seguintes temperaturas: 94°C para desnaturação, 61,4°C para anelamento e 72°C para extensão.

4.4. PCR e Purificação do Produto

Para este gene, primeiramente, foi realizado a PCR para amplificação da região desejada com os primers desenhados para flanquear a mutação. Os ciclos de amplificação da PCR foram realizados no termociclador *GeneTouch – Bioer®*. Para a realização da reação de PCR utilizou-se enzima *DreamTaq™ DNA Polymerase* e os demais reagentes da empresa Fermentas®. A reação de PCR foi conduzida em um volume total de 25µl contendo 50ng de DNA

genômico, 0,20mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,20 mM de cada primer-Forward e Reverse e 0,5 U de enzima DNA polimerase, seguindo um volume final de 25µL.

A análise dos fragmentos amplificados de todas as amostras se deu através de corrida de eletroforese das amostras em gel de agarose 1%, coradas com Gel Red e visualizadas pelo equipamento de captura de imagem por luz UV, L-PIX HE da empresa *Loccus tecnologia*. Seguindo o protocolo de 3µl de buffer diluído, 2µl de gel rede 6,0µl de produto de PCR. As amostras foram aplicadas no gel e para comparação de tamanho foi aplicado juntamente 2,0µl de marcador de peso molecular.

Para que as amostras possam seguir para o sequenciamento é necessário, que estas estejam purificadas e livres de quaisquer contaminantes que possam interferir posteriormente nas análises, para isso foi realizada a purificação dos produtos de PCR. A purificação do produto de PCR foi feita conforme o Kit da *AxyPrep DNA Gel Extraction* da empresa *Axygen*®. Resumidamente, a seguir serão descritas as etapas realizadas no processo de purificação. Primeiramente, foi retirada a banda formada no gel de agarose contendo o fragmento de DNA de interesse com auxílio de um bisturi sob iluminação ultravioleta. O gel excisado é transferido um recipiente de pesagem, sendo nesta aplicação, o peso do gel considerado equivalente ao volume. Em seguida é adicionado um volume de tampão de solubilização (tampão que confere cor avermelhada). Esta cor é usada para adicionar o contraste no passo seguinte, de modo que todos os pedaços de agarose não solubilizados podem ser visualizados. Após, o gel é ressuspenso no mesmo tampão por meio de vórtex e aquecido até que o gel esteja completamente dissolvido. O gel deve ser completamente dissolvido ou o fragmento de DNA será reduzido. Posteriormente, é adicionada a segunda solução tampão, que consiste em um tampão de ligação, dessa forma, preparando um mix. Se o fragmento de DNA é menor do que 400 pb, complementar ainda mais com um volume de amostra de isopropanol. A cor da mistura ficará amarela depois da adição do segundo tampão. Foi colocada uma coluna de miniprep para um microtubo e transferida a agarose solubilizada para a coluna e posterior centrifugação. O filtrado é descartado e retornando a coluna Miniprep é adicionado o tampão de lavagem. É realizada a centrifugação sendo descartado o filtrado, nos dois passos

seguintes, apenas mudando a solução adicionada, que passa a ser o segundo tampão de lavagem. As duas lavagens com este tampão são realizadas para garantir a remoção completa do sal, eliminando potenciais problemas em reações enzimáticas subsequentes, como ligações e reações de sequenciamento. Após a centrifugação a coluna Miniprep foi transferida para um microtubo de 1,5 ml limpo. Para diluir o DNA, adicionar o diluente (pré-aquecendo geralmente aumenta a eficiência de diluição) ou água deionizada para o centro da membrana. Por fim, sendo novamente centrifugado.

4.5. Sequenciamento

Após a purificação e o impedimento da ação de qualquer contaminante que possa interferir no sequenciamento, as 10 amostras de cavalos da raça crioula referentes ao *exon* do gene SLC336A1 foram encaminhadas a Coréia para empresa MacroGen®, para que os fragmentos fossem sequenciados pelo método de sequenciamento de Sanger, realizado através de eletroforese capilar, sendo capaz de gerar sequências de pequenos fragmentos com uma boa qualidade. Sendo para isso necessário seguir um protocolo de envio de amostras, no qual as amostras de DNA precisam estar na concentração 50ng/μl, no volume 10μl e cada *primer* utilizado devem ser fornecidos separadamente, tanto o *Forward*, quanto o *Reverse* na concentração de 5pmol/μl (picomolar) cada e em um volume final de 20μl, assim é possível que sejam sequenciadas as duas extremidades da fita de DNA, podendo assim, obter um resultado mais efetivo para análise posterior dos dados. O site da MacroGen para envio de amostras pode ser acessado em <<http://dna.macrogen.com/>>.

5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos pelo sequenciamento foram analisados pelo programa Vector NTI Advance 11 e Finch TV 1.4.0. Programas estes, que tem por finalidade, alinhar as sequências e gerar uma imagem que evidencie os resultados obtidos. Primeiramente foi analisada a ocorrência de mutação fazendo uma análise comparativa entre as 10 amostras obtidas de cavalo crioulo, a sequência em que ocorreu a mutação (CH/CH), a sequência sem mutação (ch/ch) obtida a partir da pesquisa de COOK *et al.* (2008) juntamente com a sequência controle obtida a partir do Genbank no NCBI. Dessa forma, investigando possíveis alterações no DNA em uma região não esperada e que possa conferir envolvimento dos indivíduos com o fenótipo em análise.

Após a análise comparativa das sequências na imagem gerada com o alinhamento foi possível constatar que não houve a presença da variante nucleotídica, ou seja, não foi encontrada a mutação já descrita na região esperada, como demonstrado na (Fig. 6).

	213	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Original	204	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Controle_CH/CH	1	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Controle_ch/ch	1	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
cavalo1-EC924SLC36F	207	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo2-EC1302SLC36F	206	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo3-EC1SLC35F	206	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo4-EC1613SLC36F	206	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo5-EC5SLC36F	203	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo6-EC1627SLC36F	208	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo7-EC406SLC36F	201	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo8-EC1629SLC36F	208	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Cavalo9-EC407SLC36F	206	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
cavalo10/A13-ECB16SLC36F	205	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCAC	TTGCTAAAGAGCAACATTGGGCA	TTGACTCCTGGGGCTGCCTCTG	TCGGTGAAGAATGCAGGC					
Consensus	213	TTCCACCTCAGATGGTCCAGACCTTGATCCACCTGCTAAAGAGCAACATTGGGCAAGGACTCCTGGGGCTGCCTCTGGCGGTGAAGAATGCAGGC								

Figura 6 - Alinhamento da sequência controle com as de amostras de cavalo Crioulo.

As hipóteses para o resultado podem estar relacionadas com a ausência de amostras de pelagem com verdadeiro padrão champanhe ou ainda, a não existência da pelagem de diluição champanhe na raça crioula, pelo menos no que diz respeito ao tipo de mutação e região já descrita anteriormente na literatura.

Com esta constatação, passou a ser observado outros aspectos ao longo da sequência, como outras trocas de nucleotídeos (SNPs) que tivessem alguma importância para o fenótipo analisado. Foram observadas duas trocas de bases na mesma amostra referente a pelagem do Lobuno (cavalo 8) que

poderia sugerir uma mutação que não existe nas outras amostras, inclusive na controle, conforme pode ser verificado na (Fig. 7).

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	
Original	110	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Controle_CHCH	1															CTGCTAA
Controle_chch	1															CTGCTAA
cavalo1-EC924SLC36F	104	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo2-EC1302SLC36F	103	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo3-EC1SLC35F	103	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo4-EC1613SLC36F	103	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo5-EC5SLC36F	100	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo6-EC1627SLC36F	105	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo7-EC406SLC36F	98	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo8-EC1629SLC36F	105	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo9-EC407SLC36F	103	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo10/A11-EC709SLC36F	98	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Cavalo11/A13-EC816SLC36F	102	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														
Consensus	110	TTGTCGTGGAGGTTGAATGAGATGCATGAAGGCACCTTAGCACAGTGTAAAGTCCTTAAGAAATGTTAGCTATCATTCTTGTAAACACGCTCCTGTCTACCTTCTTCCCACCTCAGATGGTTCAGACCTTGATCCACCTGCTAA														

Figura 7 - Possível mutação evidenciada com SNPs após o alinhamento. Ocorrendo a troca de bases nos pontos 125 e 130.

Analisando os gráficos evidenciados nas Figuras 8 e 9 respectivamente, foram observados dois picos definidos nos locais onde ocorreram as trocas de bases, o que pode sugerir um heterozigoto com mutação em dois pontos ainda não descritos.

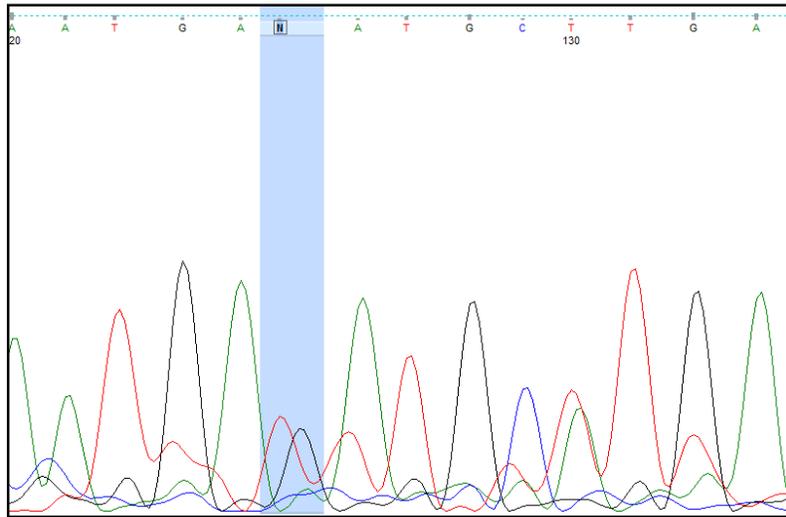


Figura 8 - Presença de dois picos (Timina e Guanina) sugerindo mutação em um possível heterozigoto.

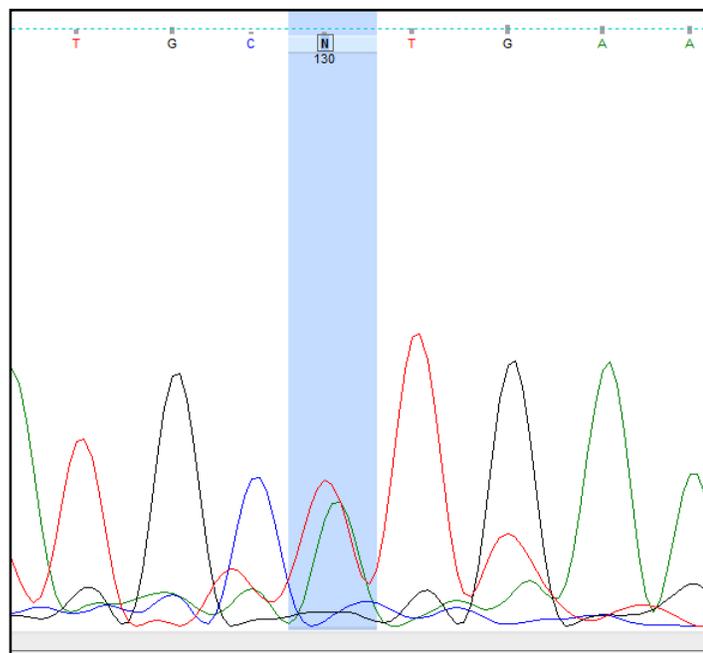


Figura 9 - Presença de picos (Timina e Adenina) sugerindo mutação em um possível heterozigoto.

O gráfico gerado possui cores diferentes para cada tipo de base nitrogenada, sendo a cor vermelha para timina, verde para adenina, azul e preta representando citocina e guanina, respectivamente. No primeiro nucleotídeo localizado na posição 125 ocorreu a troca da base Guanina (G) por Timina (T), porém, no gráfico aparecem dois picos bem definidos no mesmo ponto demonstrando a presença das duas bases, sendo que a Timina encontra-se um pouco mais evidente e Guanina presente em menor escala. Por outro lado, no segundo ponto, localizado no nucleotídeo 130 ocorreu a troca de Adenina (A) por Timina (T), contudo, o gráfico gerado mostra dois picos definidos na mesma posição contendo as duas bases, Timina e Adenina, sendo a primeira mais elevada que a segunda.

Dessa forma, no animal denominado Lobuno pode ter ocorrido mutações localizadas em outras regiões não descritas em pesquisas anteriores com equinos. Este fato pode levar a suposição, de que o fenótipo diluído champanhe na raça crioula brasileira apresenta outro padrão de mutação. Sendo pertinente salientar, que este animal, já é descrito com um padrão fenotípico diluído, variando de acordo com a cor base, que pode ser preta ou alazã. Contudo, não é descartada a hipótese de uma mutação causal que deve ser melhor avaliada com investigações posteriores.

6. Conclusão

Os resultados obtidos com o sequenciamento e alinhamento das sequencias evidenciam que não há mutação na região analisada nas amostras de cavalo crioulo para diluição champanhe quando comparadas com a amostra controle para a mutação. Este fato leva a uma série de suposições, entre elas, a de que nas amostras analisadas de animais diluidos pode não ter um representante da pelagem com padrão fenotípico champanhe já descrito na literatura, ou até mesmo, a inexistência desta diluição na pelagem da raça crioula.

Outro aspecto importante está relacionado com a presença de dois pontos nucleotídicos onde ocorreu troca de bases. Este fato leva a crer na possibilidade de mutações na amostra referente à pelagem de um cavalo Lobuno, o que pode ter relação com um padrão champanhe na pelagem de cavalo crioulo em um ponto ainda não descrito onde SNPs poderiam alterar o aminoácido produzido alterando a função da proteína codificada.

Dessa forma, são necessárias análises com um número maior de amostras de cavalos Lobunos (aparentados e não aparentados), a fim de amplificar o ponto onde ocorreu a mudança de bases, para verificar se realmente essa troca de bases é uma mutação recorrente ou somente uma variante causal.

7. Referências

ANCANS, J.; HOOGDUIJN, M. J.; THODY, A. J. Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, p.158–159, 2001.

ANCANS, J.; TOBIN, D. J.; HOOGDUIJN, M. J.; SMIT, N. P.; WAKAMATSU, K.; THODY, A. J. Melanosomal pH Controls Rate of Melanogenesis, Eumelanin/Phaeomelanin Ratio and Melanosome Maturation in Melanocytes and Melanoma Cells. **Experimental Cell Research**, v.268, p.26–35, 2001.

BERSON, J. F.; HARPER, D. C.; TENZA, D.; RAPOSO, G., MARKS, M. S. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.3451–3464, 2001.

BERTOLOTTO, C.; BUSCÀ, R.; ABBE, P.; BILLE, K.; ABERDAM, E.; ORTONE, J.P.; BALLOTTI, R. Different *cis*-Acting Elements Are Involved in the Regulation of TRP1 and TRP2 Promoter Activities by Cyclic AMP: Pivotal Role of M Boxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia. **Molecular and Cellular Biology**, v.18, p. 694 – 702, 1998.

BHATNAGAR, V., RAMALAH, A. Characterization of Mg²⁺-ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.189, p.99-106, 1998.

BOISSY, R. E. The melanocyte: Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes and hair. **Dermatol Clin**, v.6, p.161-73, 1988.

BOLL, M.; FOLTZ, M.; RUBIO-ALIAGA, I.; KOTTRA, G.; DANIEL, H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.22966–22973, 2002.

BOWLING, Ann. Genetics of colour variation. In: **Equine Coat Color Genetics**. Iowa State University Press, Ames, 1996. p. 53-60.

BORST, P., ELFERINK, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. **Annual Review of Biochemistry**, v.71, p. 537–592, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Equídeos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 18 out. 2013.

BRUNBERG, E.; ANDERSSON, L.; COTHRAN, G.; SANDBERG, K.; MIKKO, S.; LINDGREN, G. A missense mutation in *PMEL17* is associated with the Silver coat color in the horse. **BMC Genetics**, v.7, p.1-17, 2006.

BUSCÀ, R., BALLOTTI, R. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. **Pigment Cell Research**, v.13, p. 60 – 69, 2000.

CHEN, Z.; FEI, Y. J.; ANDERSON, C. M. H.; WAKE, K. A.; MIYAUCHI, S.; HUANG, W.; *et al.* Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. **Journal of Physiology**, v.546, p.349–361, 2003.

CHRISTENSEN, H. N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Physiological Reviews**, v.70, p.43–77, 1990.

CIESLAK, M.; REISSMANN, M.; HOFREITER, M.; LUDWIG, A. Colours of domestication. **Biological Reviews**, v.86, p.885–899, 2011.

COOK, D.; BROOKS, S.; BELLONE, R.; BAILEY, E. Missense mutation in exon 2 of *SLC36A1* responsible for champagne dilution in horses. **PLOS Genetics**, v.4, p.1- 9, 2008.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J., Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, v.21, p.976-994, 2007.

DEVI, C. C., TRIPATHI, R. K., RAMAIAH, A. pH-dependent interconvertible allosteric forms of murine melanoma tyrosinase - Physiological implications. **European Journal of Biochemistry**, v.166, p.705–711, 1987.

DIMENT, S., EIDELMAN, M., RODRIGUEZ, G. M., ORLOW, S. J. Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.4213–4215, 1995.

FULLER, B. B.; SPAULDING, D. T.; SMITH, D.R. Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and caucasian human melanocyte cell cultures. **Experimental Cell Research**, v.262, p.197–208, 2001.

GIACOMONI, E.H. **Estudo da variabilidade genética em quatro raças brasileiras de cavalos (*Equus Caballus - Equidae*) utilizando marcadores microssatélites**.2007.Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

GRAF, J.; HODGSON, R.; VAN DAAL, A. Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. **Human Mutation**, v.25, p. 278–284, 2005.

HEARING, V. J., EKEL, T. M. Mammalian tyrosinase - A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. **Biochemical Journal**, v.157, p.549–557, 1976.

HEARING, V. J.; TSUKAMOTO K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. **FASEB Journal**, v.5, p.2902-2909, 1991.

HEARING, V. J. Biochemical control of melanogenesis and melanossomal organization. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.4, p.24-28, 1999.

HEARING, Vincent.; YAMAGUCHI, Yuji. Melanocyte distribution and function in human skin: Effects of ultraviolet radiation. In: **From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy**. New Jersey: Humana Press, 2006. p. 101–115.

HEDIGER, M. A.; ROMERO, M. F.; PENG, J. B.; ROLFS, A.; TAKANAGA, H.; BRUFORD, E. A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological andtherapeutic implications of human membrane transport proteins. **European Journal of Physiology**, v.447, p.465–468, 2004.

HUBBARD, J. K., UY, J. A. C., HAUBER, M. E., HOEKSTRA, H. E.; SAFRAN, R. J. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. **Trends in Genetics**, v.26, p.231–239, 2010.

ITO, S., FUJITA, K., TAKAHASHI, H.; JIMBOW, K. Characterization of melanogenesis in mouse and Guine pig hair by chemical analysis of melanins and of free and bound Dopa and 5-S-Cysteinyldopa. **Investigative Dermatology**, v.83, p.12–14, 1984.

ITO, S. A chemist's view of melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v.16, p.230-236, 2003.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment Cell Research**, v.16, p.523–531, 2003.

JACKSON, I. J. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. **Annual Review of Genetics**, v.28, p.189–217, 1994.

JACKSON, I. J. Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. **Human Molecular Genetics**, v.6, n.10, p.1613–1624, 1997.

KUSHIMOTO, T.; BASRUR, V.; VALENCIA, J.; MATSUNAGA, J.; VIEIRA, W. D.; FERRANS, V. J.; MULLER, J.; APPELLA, E., HEARING, V. J. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.10698–10703, 2001.

LEON, Priscila Marques Moura.; COLLARES, Tiago. Introdução a genômica de equinos. In: **Genômica de Equinos**. 1.ed. Universidade Federal de Pelotas- Pelotas: Editora e Gráfica Universitária PREC- UFPel, 2012. p. 8-12.

LE PAPE, E.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; WOLBER, R.; HEARING, V. J. Regulation of eumelanin / pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. **Pigment Cell Melanoma**, v.21, p.477–486, 2008.

LUDWIG, T., GRIFFITHS, G.; HOFACK, B. Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. **Journal of Cell Biology**, v.115, p.1561–1572, 1991.

MACROGEN. **Sequencing Order System/ Advancing through genomics MACROGEN**. Disponível em: <<http://dna.macrogen.com/>>. Acesso em: 07 set. 2013.

MACHADO, Claudia. **Caracterização de melanócitos dermais em embriões da galinha sedosa japonesa e análise de etapas de sua diferenciação.** 2006, p.87. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARKLUND, L.; MOLLER, M. J.; SANDBERG, K.; ANDERSSON, L.A. missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. **Mammalian Genome**, v.7, p.895-9, 1996.

MIYAUCHI, S.; ABBOT, E. L.; ZHUANG, L.; SUBRAMANIAN, R.; GANAPATHY, V.; THWAITES, D. T. Isolation and function of the amino acid transporter PAT1 (SLC36A1) from rabbit and discrimination between transport via PAT1 and system IMINO in renal brush-border membrane vesicles. **Molecular Membrane Biology**, v.22, p. 549–559, 2005.

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**, 2010, Resumos Genética Animal, São João do Polêsine, p.26-27.

MOSHER, D. B.; FITZPATRICK, T. B.; ORTONNE, J. P.; HORI, Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. **Dermatology in General Medicine**, vol.1, p.936-44, 1999.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Genebank**. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 01 agos. 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Gene SLC36A1**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100071523>>. Acesso em: 30 out. 2013.

NICOLETTI, M. A; ORSINE, E. M. A; DUARTE, A. C. N; BUONO, G. A. Hiperchromia s: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries (C & T)**, v.14, p. 46- 51, 2002.

OLIVEIRA, I. O; JUNIOR, H. L. A. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, p.331-343, 2003.

PALACIN, M.; ESTEVEZ, R.; BERTRAN, J.; ZORZANO, A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. **Physiological Reviews**, v.78 p.969–1054, 1998.

REID, K.; NISHIKAWA, S.; BARLETT, P. F.; MURPHY, M. Steel factor directs melanocyte development *in vitro* through selective regulation of the number of c-kit+progenitors. **Developmental biology**, v.169, p. 568–579, 1995.

REZENDE, A. S. C.; COSTA, M. D. **Pelagem dos equinos: Nomenclatura e genética**. 2 ed. Belo horizonte: FEP-MVZ Editora, 2007. 111p.

RIEDER, S., TAOURIT, S., MARIAT, D., LANGLOIS B.; GUÉRIN, G. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). **Mammalian Genome**, v.12, p.450–5, 2001.

RIEDER, S. Molecular tests for coat colours in horses. Swiss College of Agriculture, Zollikofen BE, Switzerland. **Journal Animal Breeding and Genetics**, v.126, p.415–424, 2009.

SAGNÉ, C.; AGULHON, C.; RAVASSARD, P.; DARMON, M.; HAMON, M.; MESTIKAWY, S. E *et al.* Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n. 13, p.7206–7211, 2001.

SEARLE, A. G. **Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals**. Logos Press, London. 1968, p.308.

SILVER, C. **Tudo sobre Cavalos: um Guia de 200 Raças/ Caroline Silver**. 3. Ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2000, p.231.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v.84, p.1155-1228, 2003.

SPONENBERG, D. P.; BOWLING, A. T. Champagne, a dominant color dilution of horses. **Genetics Selection Evolution**, v.28, p. 457-452, 1996.

SPONENBERG, D. Phillip. Genetics of colour and hair texture. In: **The Genetics of Sheep**. CABI Publishing, Wallingford, 1997, p.51–86.

SPONENBERG, D. Phillip. **Equine color genetics**. 3^aed. Editor Wiley-Blackwell, Iowa, 2003. 277p.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Veterinary Dermatology**, v.14, p.57-65, 2003.

SUNDBERG, B. E.; WAAG, E.; JACOBSSON, J. A.; STEPHANSSON, O.; RUMAKS, J.; SVIRSKIS, S. *et al.* The evolutionary history and tissue mapping of amino acid transporters belonging to solute carrier families SLC32, SLC36, and SLC38. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.35, p.179–193, 2008.

SUNNUCKS, P.; WILSON, A. C. C.; BEHEREGARAY, L. B. ; ZENGER, K.; FRENCH, J.; TAYLOR, A. C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.9, p.1699-1710, 2000.

THIRUVENKADAN, A. K.; KANDASAMY, N.; PANNEERSELVAM, S. Coat colour inheritance in horses. **Livestock Science**, v.117, p. 109–129, 2008.

THWAITES, D. T; ANDERSON, C. M. H. The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. **British Journal of Pharmacology**, v.164, p.1802-1816, 2011.

THODY, A. J.; GRAHAM, A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? **Pigment Cell Research**, v.1, p.265-274, 1998.

TOWNSEND, D., GUILLERY, P., KING, R. A. Optimized assay for mammalian tyrosinase (polyhydroxyl phenyloxidase). **Analytical Biochemistry**, v.139, p.345–352, 1984.

TRIPATHI, R. K., CHAYA DEVI, C., RAMAIAH, A. pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in humanskin. **Biochemical Journal**, v.252, p.481–487, 1988.

VALLE, Marina Tuerlinckx Costa.; LEON, Priscila Marques Moura. Introdução a genômica de equinos. In: **Genômica de Equinos**.1.ed. Universidade Federal de Pelotas- Pelotas: Editora e Gráfica Universitária PREC- UFPel, 2012. p.87-99.

VIDEIRA, I. F. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.88, p.76-83, 2013.

VOISEY, J.; CARROLL, L.; DAAL, A. V. Melanocortins and their receptors and antagonists. **Current Drug Targets**, v.4,p.586-597, 2003.

VOISEY, J.; KELLY, G.; VAN DAAL, A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. **Pigment Cell Res**, v.16, p.65-71, 2003.

WATABE, H.; VALENCIA, J. C.; YASUMOTO, K.; KUSHIMOTO, T.; ANDO, H. *et al.* Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. **Journal Biological Chemistry**, v.279, p.7971–7981, 2003.

WATABE, H.; VALENCIA, J. C.; LE PAPE, E.; YAMAGUCHI, Y.; NAKAMURA, M. *et al.* Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, p.162-174, 2008.

WREDEN, C. C.; JOHNSON, J.; TRAN, C.; SEAL, R. P, COPENHAGEN, D. R.; REIMER, R. J. *et al.* The H⁺-coupled electrogenic lysosomal amino acid transporter LYAAT1 localizes to the axon and plasma membrane of hippocampal neurons. **Journal Neuroscience**, v.23, p.1265–1275, 2003.