

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



Trabalho de Conclusão de Curso

Análise de mutações nos genes EDNRB e MITF relacionados a pelagens manchadas em cavalos da raça Crioula.

Gabriella Borba de Oliveira

Pelotas, 2014

Gabriella Borba de Oliveira

Análise de mutações nos genes EDNRB e MITF relacionados a pelagens manchadas em cavalos da raça Crioula

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

Orientador acadêmico: Dr. Heden Luiz Marques Moreira
Coorientadora: M^a, Doutoranda Carla Giovane Ávila Moreira

Pelotas, 2014

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

O48a Oliveira, Gabriella Borba de

Análise de mutações nos genes EDNRB e MITF relacionados a pelagens manchadas em cavalos da raça Crioula / Gabriella Borba de Oliveira. – 63f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Heden Luiz Marques Moreira ; co-orientador Carla Giovane Ávila Moreira.

1.Biotecnologia. 2.Cavalo crioulo. 3.MITF. 4.Equinos.
5.Pelagens. 6.Sequenciamento. 7.EDNRB. I.Moreira, Heden Luiz Marques. II.Moreira, Carla Giovane Avila. III.Título.

CDD: 636.1

Banca examinadora:

Prof. Dr. Heden Luiz Moreira, Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Prof. Dr. Vinícius Farias Campos, Universidade Federal de Pelotas

M^a, Doutoranda Carla Ávila Moreira, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Aos meus pais, Ana Beatriz e Cláudio, pelo incentivo
e apoio que sempre recebi.*

Agradecimentos

A Deus por me dar sabedoria e serenidade em todos os momentos e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Ana Beatriz e Cláudio e a minha irmã Fernanda, por todo carinho, amizade e amor que sempre recebi e pelo incentivo e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Heden Moreira, pela orientação e oportunidades oferecidas, além do conhecimento transmitido.

A minha coorientadora, Carla Moreira, por ter me possibilitado realizar este trabalho, pela orientação durante o tempo da graduação e principalmente pela amizade e dedicação com todos do laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia Genética Animal, que sempre estiveram dispostos a ajudar e pelos momentos de lazer e descontração.

Aos meus colegas de aula e amigos, que fizeram desta época a melhor possível.

A todos os professores e colegas do centro de Biotecnologia pela convivência e ensinamentos transmitidos.

Muito obrigada!

“Quem vence sem risco, triunfa sem glória...Não tenha medo da vida, não tenha medo de vivê-la.”

Augusto Cury

Resumo

OLIVEIRA, Gabriella Borba de. **Análise de mutações nos genes EDNRB e MITF relacionados a pelagens manchadas em cavalos da raça Crioula**. 2014. 63f. Monografia (Graduação) - Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A raça de cavalos Crioula é uma das mais importantes raças de equinos para o Rio Grande do Sul e dentre suas características de importância econômica a parte estética, como a cor de pelagem, se mostra um fator muito relevante para a criação. Porém muitas das pelagens ainda não possuem todos os mecanismos genéticos bem esclarecidos como é o caso da pelagem manchada oqueira. Desta forma buscou-se tentar compreender melhor o determinante genético deste fenótipo através do estudo de possíveis mutações nos *exons* e *introns* do gene EDNRB e na região promotora e *exon* seis do gene MITF, que já haviam sido descritos como responsáveis pelo “oquirismo” em outras raças de equinos, pois estes estão ligados à via melanogênica atuando na migração e desenvolvimento dos melanócitos e síntese de melanina e alterações nestas vias acarretariam em uma pelagem apresentando manchas brancas pelo corpo do animal. Para a realização da pesquisa, primeiramente foi coletado sangue de 23 animais, os quais apresentavam tanto pelagem oqueira quanto “não oqueira”. Com o DNA extraído dos animais foi possível amplificar as regiões alvo de cada gene através de PCR. Os fragmentos correspondentes aos *exons* dos dois genes foram purificados e enviados para sequenciamento. Em relação aos estudos dos *introns* buscou-se analisar diferenças de tamanho dos fragmentos esperados em relação aos obtidos através da visualização em gel de agarose 1% em uma corrida de eletroforese, pois deleções ou inserções nesta região não-codificante poderiam alterar a fase de leitura da proteína. Já para os estudos dos *exons* procurava-se encontrar mutações pontuais ou pequenas alterações na sequência de nucleotídeos que pudessem ser responsáveis pelo funcionamento incorreto da proteína final e isto foi realizado através da análise do sequenciamento utilizando programas de bioinformática para curadoria e alinhamento das amostras. Não foram encontradas alterações no tamanho dos *introns* do gene EDNRB e nem mutações significativas nas sequências dos *exons* do EDNRB e MITF. De forma geral, pode-se concluir que o padrão genético para a pelagem oqueira para raça Crioula é diferente da descrita na literatura e ainda não se conhece exatamente os mecanismos que causam este fenótipo de manchas. Entretanto são necessárias mais análises utilizando um número maior de animais para confirmar estes resultados.

Palavras chaves: raça Crioula; equinos; pelagens; sequenciamento; EDNRB; MITF.

Abstract

OLIVEIRA, Gabriella Borba de. **Analysis of mutations in EDNRB and MITF genes related to spotted coats in horses of Crioulo breed.** 2014. 63f. Monografia (Graduação) - Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Crioulo horse breed is one of the most important horse breeds for the Rio Grande do Sul and among their traits of economic importance the aesthetics, such as coat color, shows to be a very important factor for the breeding. But many coats do not have yet all genetic mechanisms well understood, such as the overo spotted coat, thus it was sought to better understand the genetic determinant of this phenotype by studying possible mutations in exons and introns of the EDNRB gene and in the promoter region and exon six of the MITF gene, which have already been described as being responsible for "oveirismo" in others breeds of horses, because they are connected to the melanogenic pathway, acting in the migration and development of melanocytes and melanin synthesis. Alterations in these pathways would result in a coat having white spots in the body of the animal. To conducting the research, blood was collected from 23 animals, which presented either oveiro coat color and "non oveiro" coat color. With DNA extracted from the animals was possible to amplify the regions of each target gene by PCR. The corresponding fragments of the exons of the two genes were purified and sent for sequencing. Relative to the studies of introns was sought to examine differences in size of the expected fragments to those obtained by visualization on a 1% agarose gel electrophoresis running, because deletions or insertions in this non-coding region could change the reading frame of the protein. For the studies of exons was sought to find point mutations or small changes in the nucleotides sequence that could be responsible for the malfunction of the final protein and this was accomplished by sequencing analysis using bioinformatics programs for cleaning and alignment of samples. No changes in the size of the EDNRB introns and neither significant changes in the sequences of MITF and EDNRB exons were found, so was concluded that the genetic pattern for coat color oveiro to the Crioulo breed is different from that described in the literature and does not know yet the exact mechanisms that cause this staining phenotype. However more analysis are required using a larger number of animals to confirm these results.

Keywords: Crioulo breed; horses; coat color; sequencing; EDNRB; MITF

Lista de Figuras

Figura 1	Foto de cavalos da raça Crioula.....	23
Figura 2	Esquema da via de síntese dos dois tipos de melaninas produzidos em mamíferos.....	25
Figura 3	Esquema da rota de sinalização envolvendo os genes MITF e EDNRB na melanogênese.....	28
Figura 4	Diagrama esquemático da proteína EDNRB.....	29
Figura 5	Imagem representando da organização em multi-promotor do gene MITF.....	32
Figura 6	Imagem de um gel de eletroforese do produto de PCR referente à região promotora do gene MITF.....	42
Figura 7	Imagem de um gel de eletroforese do produto de PCR referente ao <i>exon</i> seis do gene MITF.....	42
Figura 8	Imagem de um gel de eletroforese dos produtos de PCR dos <i>introns</i> um, cinco e seis do gene EDNRB.....	43
Figura 9	Imagem de um gel de eletroforese dos produtos de PCR dos <i>introns</i> dois e quatro do gene EDNRB.....	43
Figura 10	Imagem de um eletroferograma do <i>exon</i> um do gene EDNRB.....	45
Figura 11	Imagem de um eletroferograma da região promotora do gene MITF.....	46
Figura 12	Imagem de um eletroferograma do <i>exon</i> seis do gene MITF.....	47
Figura 13	Imagem do alinhamento das amostras do <i>exon</i> um do gene EDNRB.....	48
Figura 14	Imagem do alinhamento das amostras da região promotora do gene MITF.....	48
Figura 15	Imagem do alinhamento das amostras do <i>exon</i> seis do gene MITF.....	48
Figura 16	Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do <i>exon</i> um do gene EDNRB.....	49
Figura 17	Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do <i>exon</i> um (promotor) do gene MITF.....	50
Figura 18	Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do <i>exon</i> um (promotor) do gene MITF.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos <i>exons</i> do gene EDNRB.....	36
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos <i>introns</i> do gene EDNRB.....	37
Tabela 3	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos <i>exons</i> do gene MITF.....	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

µL	microLitros
ABCCC	Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos
bHLHZip	Zíper de leucina hélice-alça-hélice Básico
DCT	Enzima DOPAcromo Tautomerase
DHI	5,6-diidroxiindol
DHICA	5,6-diidroxiindol-2-ácido carboxílico
DNA	Ácido disoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DOPA	3,4-diidroxifenilalanina
ECA	<i>Equus caballus</i>
EDN 3	Endotelina 3
EDNRB	Receptor B de endotelina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Exo	Exonuclease I
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LWFS	Lethal Withe Foal Syndrome
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MgCL ₂	Cloreto de Magnésio
MITF	Fator de transcrição microftalmia-associado
mL	miliLitros
mM	miliMolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramas
PAX	Paired-box 3
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pM	picoMolar
PSI	Puro-Sangue Inglês
SAP	Fosfatase Alcalina

SOX	sex-determining region y (SRY)-box 10
TRP-2	Proteína relacionada à Tirosinase-2
TYRP-1	Proteína relacionada à Tirosinase-1
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltz
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 A raça Crioula	19
3.1.1 Importância da raça Crioula	19
3.1.2 Pelagens na raça Crioula	20
3.1.2.1 Pelagem Oveira	22
3.2 Melanogênese	23
3.2.1 Migração dos Melanócitos	25
3.2.2 Controle genético da pigmentação	26
3.2.2.1 Gene EDNRB	29
3.2.2.2 Gene MITF	31
4 METODOLOGIA	34
4.1 Coleta de sangue	34
4.2 Delineamento experimental	34
4.3 Extração de DNA	35
4.4 Desenho dos <i>primers</i>	36
4.4.1 <i>Exons</i> EDNRB	36
4.4.2 <i>Introns</i> EDNRB	37
4.4.3 <i>Exons</i> MITF	38
4.5 Otimização da PCR	38
4.6 Purificação dos produtos de PCR	39
4.6.1 Purificação por gel	39
4.6.2 Purificação por enzima	40
4.7 Sequenciamento	41
4.7.1 Análise do Sequenciamento	41

5 RESULTADOS	42
5.1 Análise dos produtos de PCR	42
5.2 Análise de Bioinformática	44
5.2.1 Análise pelo Genious	47
5.2.2 Alinhamento pelo BLASTn	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	55
Referências	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil a criação de equinos sempre teve papel importante para desenvolver o setor econômico, estando relacionada à geração de força motriz para os cultivos e principalmente ao trabalho de lida para a pecuária, além disso, possui uma forte inter-relação com setores ligados ao lazer, à cultura, ao esporte e ao ecoturismo. O país possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com 8 milhões de cabeças (FAO, 2003), sendo que os estados da região sul são destaque na criação de equinos, em especial o estado do Rio Grande do Sul, onde a Raça Crioula ocupa o equivalente a 43% do rebanho estadual, sendo considerado um dos patrimônios culturais do estado devido a sua fama e importância histórica para o Rio Grande do Sul. Dessa forma a criação de cavalos no estado ganhou importância por este ser o principal fornecedor de equídeos e bovinos para as demais regiões, possuindo 84% da criação de cavalos Crioulos do país (MATTOS, 2010). Esta raça de cavalos, em especial, tem como características a rusticidade devido à seleção natural no campo, à funcionalidade dos animais para provas e a coragem (PONS, 1993), características essas que foram selecionadas durante décadas para principalmente melhorar o trabalho na pecuária, por isso se torna uma raça tão importante neste setor. Além dessas características para os criadores de diversas raças, não somente Crioula, a pelagem é considerada um fator muito relevante, principalmente em relação à cor, pois a parte estética é também muito valorizada fazendo com que criadores busquem cruzamentos entre os animais que favoreçam a produção de determinadas pelagens, pois se acredita que algumas destas podem estar associadas com características de aptidão ou desempenho (HENNER, 2002), além de outros fatores também estarem influenciando, como por exemplo, fatores sociais, culturais ou de mercado (MATTOS, 2010).

Estudos aprofundados na área de genética molecular sobre a formação da cor da pelagem em mamíferos, principalmente em camundongos e cavalos (BARSH, 1996; BOWLING, 1987; MARKLUND, 1996) ajudaram muito na geração de conhecimento sobre a função, ação e interação de genes, isto porque as mutações descritas que afetam a pigmentação da pelagem podem ser identificadas facilmente pelas características fenotípicas dos animais por ser uma herança genética que

passa de geração a geração. Dessa forma as variações na cor da pelagem tornaram-se um modelo para o estudo de fenótipo mesmo porque, além dos genes identificados controlarem a pigmentação as análises de algumas destas mutações revelaram que estes genes podem também regular outros processos do desenvolvimento, tais como o desenvolvimento neural, a formação óssea, hematopoiese, fertilidade, entre outros, podendo estar relacionados também com doenças hereditárias. Sendo este um tema de interesse para proprietários e criadores de cavalos, bem como para os pesquisadores uma vez que estas informações podem ser aplicadas no desenvolvimento de testes genéticos e em programas de melhoramento para reduzir a incidência de doenças e aumentar a eficiência das populações de raças específicas de equinos (DRING, 1981; BOWLING, 1996; SPONENBERG, 1996; STACHURSKA, 2006; THIRUVENKADAN, 2008; METALLINOS, 1998; HODGKINSON, 1993).

Na raça Crioula os cavalos possuem uma grande variedade de pelagens, esta sendo a maior em variedade e composição já conhecida podendo ser classificadas basicamente em pelagens de capas sólidas e compostas, como as pelagens manchadas, dentre elas se enquadra a pelagem oveira (ABCCC, 2013b). A qual, convencionalmente, apresenta manchas irregulares, que não são bem delimitadas, predominando na região lateral do corpo do animal, na cabeça e patas, porém a área pigmentada a qual se refere à cor da capa normalmente é mais extensa que as manchas brancas (COELHO, 2008). Porém, dentro da raça a pelagem oveira ainda não foi caracterizada ao nível molecular, pois o padrão de herança não está claramente definido talvez porque existam padrões geneticamente diferentes registrados como oveiro se tornando uma categoria muito ampla, incluindo diversos subtipos podendo apresentar animais dentro da mesma categoria com diferentes padrões de manchas brancas (VROSTSOS, 2001; SPONENBERG, 1996). Muitas vezes observando apenas o fenótipo não se têm claras as distinções entre esses diferentes tipos, assim os animais são registrados como sendo todos oveiros se fazendo necessário conhecer a genética por trás da formação da pigmentação para poder definir exatamente o genótipo referente a cada pelagem (HAUSWIRTH, 2012; METALLINOS, 1998).

Diversos genes relacionados à pelagem têm sido identificados e muitos destes influenciam as células da crista neural embrionária, que são os precursores

dos melanócitos, dessa forma podendo controlar a localização ou a quantidade de manchas brancas na pelagem (VROTSOS, 2001; BARSH, 1996; JACKSON, 1994), pois esse fenótipo de manchas é o resultado de alterações no desenvolvimento de melanócitos e a análise de animais apresentando esses padrões de pelagem ajuda a entender melhor a rede genética de controle da proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência das células produtoras de pigmentos, levando-se em consideração as variações e mutações de ordem genética que afetam esses fatores (ABCCC, 2013b; GIACOMONI, 2007; HAUSWIRTH, 2012). Em outras raças de cavalos como a *Paint horse* esta pelagem oveira, em específico, foi definida como sendo causa de uma mutação de caráter heterozigoto no gene que codifica para o receptor B de endotelina (EDNRB) (METALLINOS, 1998; SANTACHI, 1998), que está diretamente ligado à migração de células produtoras de melanina. Outro gene que, também, pode estar relacionado às pelagens manchadas, mas não somente oveira, é o fator de transcrição microftalmia-associado (MITF) e a falha na sua expressão altera uma de suas funções, que é a regulação do desenvolvimento de melanócitos (BAUER, 2009; HAUSWIRTH, 2012).

Tendo em vista os dados apresentados, se torna importante o estudo da genética da cor da pelagem para se entender melhor o funcionamento desta rede interligada de genes, que atuam mutuamente alterando a pigmentação e formando a diversidade encontrada hoje nas raças de cavalos, mas também para agregar conhecimento à própria raça Crioula tão valorizada no estado do Rio Grande do Sul e pelo Brasil, buscando compreender o funcionamento da genética da raça e talvez contribuir para o melhoramento genético em relação às pelagens, tendo como destaque nesta pesquisa as pelagens manchadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de mutações específicas nos genes EDNRB e MITF, que possam ser responsáveis pelo padrão de pelagem oveira na raça de cavalos Crioula, a fim de caracterizar geneticamente esta pelagem e agregar conhecimentos específicos em relação a esta raça importante para a região Sul do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar sangue de 23 animais, dentre estes cavalos com pelagem oveira e não oveira, em cabanhas registradas pela ABCCC na região sul do Rio Grande do Sul;
- Preparar amostras do gene EDNRB para o sequenciamento de Sanger;
- Analisar possíveis mutações pontuais nos *exons* do gene EDNRB, através de programas de bioinformática;
- Verificar possíveis mutações nos *introns* do gene EDNRB, em relação a deleções ou inserções nestas sequências, utilizando método de visualização por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Preparar amostras do gene MITF para o sequenciamento de Sanger;
- Analisar possíveis mutações nos *exons* do gene MITF, através de programas de bioinformática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Raça Crioula

O cavalo Crioulo tem sua origem na população equina da península ibérica, nos territórios de Portugal e Espanha do século XV. Acredita-se que o cavalo Crioulo é originário de duas raças, sendo elas: Andaluz e Jacas, as quais eram conhecidas pela valentia e resistência. A partir da chegada de Colombo na América em 1492 várias foram as expedições espanholas que trouxeram estes cavalos para o novo continente. Os Andaluzes e os Jacas teriam sido escolhidos para cruzar o oceano por serem os mais resistentes e aptos para afrontar as dificuldades no novo continente (ABCCC, 2013a).

A partir do século XVII muitos cavalos foram perdidos ou abandonados ao acaso das comitivas dos desbravadores, passando então a se criar livremente nas planícies da região sul do continente americano vivendo em estado selvagem por cerca de quatro séculos. Nesse período as duras condições do clima acabaram criando, através da seleção natural, uma raça extremamente resistente à alta amplitude térmica, à seca e à falta de alimento. A raça Crioula foi moldada desta forma em um ambiente hostil e conseguiram passar para gerações futuras seus genes. Esta nova raça bem definida e com características próprias passou a ser preservada desde então, vindo a ganhar notoriedade mundial a partir do século XX quando várias associações foram criadas e, através delas, o valor do cavalo Crioulo foi exaltado e comprovado. Os cavalos Crioulos da forma como hoje são conhecidos ficaram concentrados, principalmente, no sul da América onde hoje está a Argentina, Uruguai, Chile, Paraguai e o sul do Brasil. Normalmente são criados livres, em grandes campos e quando chegam à idade adulta são laçados e domados (ABCCC, 2013a).

3.1.1 Importância da Raça Crioula

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e é o terceiro maior produtor mundial da espécie, com aproximadamente 5.787.250 animais (IBGE, 2006). Esta produção especializada, que se encontra em comprovada expansão

movimenta cerca de R\$ 7,3 bilhão e gera em torno de 328 mil empregos diretos e indiretos por ano, segundo pesquisa realizada pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) (LIMA, 2006) (GIACOMONI, 2007; BRAGA, 2000; TORRES & JARDIM, 1992; ABCCC, 2013b; MAPA, 2003).

Durante muitos anos a espécie foi utilizada exclusivamente como meio de transporte, principalmente ao homem do campo e até hoje continua tendo como principal função em propriedades rurais o trabalho diário nas atividades agropecuárias, como o manejo do gado bovino onde são usados aproximadamente 5 milhões de animais (MAPA, 2013). Atualmente a produção de equinos têm conquistado outras áreas de atuação, as quais envolvem mais de 30 segmentos da economia sendo estes distribuídos entre insumos, criação e destinação final (MAPA, 2013), além de atualmente os cavalos domesticados serem muito utilizados para esporte, recreação, entretenimento e até em terapias (GUÉRIN, 1999; GIACOMONI, 2007). Na história da humanidade nenhum outro animal doméstico ocupou um lugar tão importante nos processos de desenvolvimento social e político como os cavalos (BOWLING & RUVINSKY, 2000), isto por que desde a antiguidade e até hoje fazem parte da cultura, da economia e do lazer do homem (GIACOMONI, 2007).

Para a região sul do Brasil, mais precisamente o Rio Grande do Sul, a criação de equinos em cabanhas especializadas é uma atividade historicamente bem consolidada, bastante comum e muito valorizada, sendo que a raça mais criada e tradicional desta região é a raça de cavalos Crioula devido à sua rusticidade e adaptabilidade ao campo e vem crescendo ano a ano segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC) (2013a).

3.1.2 Pelagens na Raça Crioula

A pelagem é o revestimento externo do animal e caracteriza-se pela coloração do conjunto formado por pele, pelos, crina e cauda, sendo que o cavalo é, entre os animais domésticos, a espécie de maior multiplicidade de pelagens, o que determina um largo campo de variação (NESIO, 2004). Dessa forma mostra-se um importante recurso para identificação dos animais, além de ser considerada como uma característica de alto valor econômico exercendo assim uma grande influência na determinação dos acasalamentos, por isso a importância em se conhecer

exatamente o comportamento genético dessas diversas pelagens (NESIO, 2004; BARBOSA, 2011).

A descrição completa de uma pelagem deve fazer referência à capa, à variedade e as particularidades, sendo que a capa corresponde à coloração dos pelos ordinários, a variedade à tonalidade da capa e as particularidades são manchas brancas ou escuras sobre a pelagem (BARBOSA, 2011; ABCCC, 2013). Existem três categorias gerais em que as pelagens dos cavalos podem ser divididas, sendo estas: simples ou sólida, onde a crina, cauda e pelos apresentam a mesma cor; composta, onde há pelos bicolores ou pelos de uma cor e a cauda, crina e patas de outra e ainda podem apresentar pelagens misturadas de duas ou mais cores; e conjugados, apresentam áreas de pelos coloridos misturados com áreas de pelos brancos onde há ausência de pigmentação. Estas categorias, por sua vez apresentam outras divisões como a pelagem básica de capa, as variações e as particularidades como descrito anteriormente (BARBOSA, 2011; ABCCC, 2013b), sendo que para o cavalo Crioulo criado no Brasil, que possui uma grande variedade de pelagens, é possível identificar e classificá-las em 55 subdivisões, sendo 19 de capa/pelagem, 18 tonalidade/variações e 18 particularidades. Muitas destas variações não possuem equivalentes em classificações internacionais, demonstrando aspectos regionais da própria criação e desenvolvimento desta raça no Brasil (ABCCC, 2013b).

A pigmentação da pele, pelos, olhos e de todas as pelagens possíveis de um cavalo derivam de unicamente dois pigmentos produzidos por melanócitos. O primeiro dá origem à pelagem negra (picaça, preto, zaino) e é denominado eumelanina e o segundo pigmento da origem à pelagem vermelha (alazão) e é denominado feomelanina. Através de diversas combinações entre esses dois pigmentos surgem as inúmeras pelagens e isso se dá pela atuação de genes restringindo, diluindo, sombreando, encobrando e misturando estes pigmentos (JACKSON, 1997). Porém, no caso de pelagens manchadas o que pode ocorrer é a ausência dos pigmentos em determinadas áreas do corpo do animal e não a alterações dos pigmentos básicos, pois em regiões onde o há migração normal de melanócitos e formação dos pigmentos mantem-se a coloração da capa básica original. Essa variação da pelagem é determinada, principalmente, por mutações em genes chaves na migração ou diferenciação dos melanócitos (LIN, 2007). Diversos

tipos de pelagens manchadas ocorrem em equinos, entre elas o Tobiano, Sabino, Bragado e o Oveiro (ABCCC, 2013a).

3.1.2.1 Pelagem Oveira

O padrão de pelagem oveira se encaixa entre as pelagens classificadas como manchadas, pois ocorrem pela migração deficiente de melanócitos e conseqüentemente não há pigmentação em determinadas áreas do corpo do animal (LIN, 2007; MOREIRA, 2010), sendo caracterizada principalmente por apresentar manchas brancas predominantemente localizadas na porção lateral e ventral do abdômen, que podem se estender horizontalmente, mas não cruzam o dorso (Figura 1) (COELHO, 2008). Os animais apresentam olhos normalmente castanhos podendo um ou ambos ser azuis ou parcialmente azuis e ainda pode-se observar a presença de animais salgos, ou seja, que apresentam manchas ao redor dos olhos. A cabeça é predominantemente branca e a cauda normalmente é de uma só cor, que faz referência à cor da pelagem de capa original do animal (BOWLING, 1994; THIRUVENKADAN, 2008).

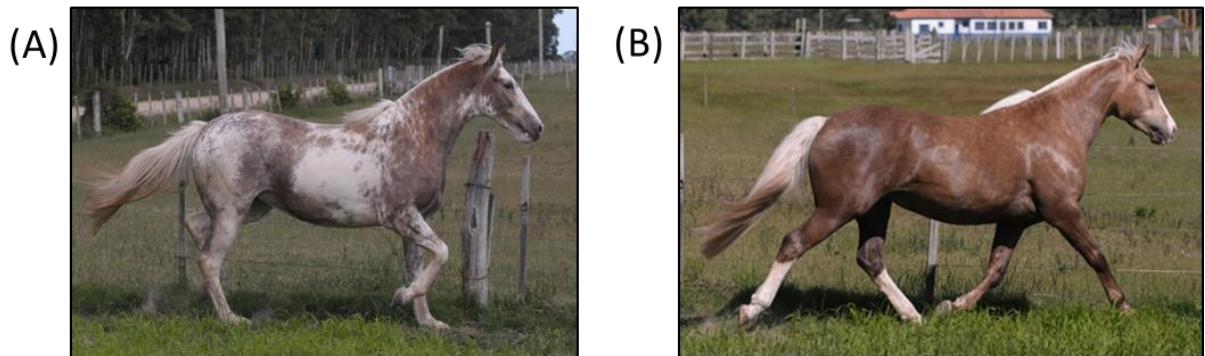


Figura 1 – Foto de cavalos da raça Crioula.

Os animais apresentam pelagem manchada e sólida. A: cavalo de pelagem oveira; B: cavalo de pelagem “não-oveira” baia ruana.

Esta pelagem não possui ainda todos os mecanismos genéticos de transmissão plenamente esclarecidos e é muitas vezes de difícil diferenciação com outras pelagens manchadas, tendo entre alguns indivíduos de pelagens diferentes uma grande semelhança entre si, como é o caso das pelagens “Bragada” e “Sabino”, as quais os animais também apresentam parte do corpo com manchas, mas estas são localizadas e não espalhadas como é o caso dos Oveiros (SPONENBERG, 2009). Dessa forma para uma identificação mais correta é necessário basear-se no conjunto de características da pelagem, assim como na pelagem dos ascendentes e descendentes do animal, quando disponível. Por isso se faz extremamente necessário conhecer de forma mais aprofundada os mecanismos que levam a este padrão de manchas tão característico (THIRUVENKADAN, 2008).

3.2 Melanogênese

Melanócitos são responsáveis pela produção do pigmento endógeno melanina, que é a denominação genérica de uma classe de compostos poliméricos derivados da tirosina, os quais além de pigmentação possuem a função de proteção contra radiação solar (OLIVEIRA, 2010; LIN, 2007). A síntese da melanina se dá através de um processo chamado de melanogênese, que ocorre em organelas intracelulares especializadas conhecidas como melanossomas localizadas no citoplasma dos melanócitos. Nesta organela acontecem os processos bioquímicos para a formação do pigmento, que se baseiam na produção e deposição de melanina através do armazenamento da enzima tirosinase (BUSCÀ, 2000), esta enzima é inicialmente sintetizada nos ribossomos e posteriormente transferida

através do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e finalmente acumulada nos melanossomas, a partir da sua ação sob a tirosina, na presença de oxigênio, começa a reação de síntese da melanina (VIDEIRA, 2013). A tirosinase catalisa as duas reações de formação da melanina, primeiro a hidroxilação da tirosina em DOPA (3,4-diidroxifenilalanina) e a oxidação da DOPA em DOPA-quinona, após esta reação no interior dos melanossomas a DOPA-quinona pode se combinar a fatores que estimulam e influenciam a produção final do composto tirosina-melanina, que após combinar-se com proteínas originam as melanoproteínas, que por polimerização constituem a melanina (BUSCÀ, 2000; SILVEIRA, 2007). Dessa forma os melanossomas ficam repletos de melanina e nessa fase são chamados de grânulos de melanina, estes grânulos migram do centro até os prolongamentos dendríticos dos melanócitos e são transferidos para o interior dos queratinócitos epiteliais (BUSCÀ, 2000). Na sequência, os grânulos de melanina são degradados por lisossomos e a melanina é carregada pelos queratinócitos até às camadas superficiais da epiderme, ou seja, a superfície cutânea ou os pelos (HOOGDUIJN, 2004).

Nos mamíferos há a produção de dois tipos principais de melanina, que são chamadas de eumelanina e feomelanina (LIN, 2007), as quais tem como precursor comum a DOPA-quinona e a partir da combinação desta com diferentes compostos há a formação dos pigmentos, produzidos seguindo vias bioquímicas diferentes, como pode ser observado na figura 2 (OLIVEIRA, 2010; ANDO, 2007). Na eumelanogênese a DOPA-quinona é convertida em DOPAcromo, o precursor da eumelanina, que pode seguir dois caminhos para a síntese do pigmento. Na primeira via, o DOPAcromo é convertido em DHI (5,6-diidroxiindol), que é por sua vez oxidado a indol-5,6-quinona pela proteína relacionada a tirosinase-1 (TYRP-1). Na segunda via o DOPAcromo é convertido em DHICA (5,6-diidroxiindol-2-ácido carboxílico) pela enzima DOPAcromo tautomerase (DCT), também conhecida como TRP-2 (Proteína relacionada a tirosinase-2), e o composto DHICA sofre oxidação pela TYRP-1 ou DHICA oxidase formando indol-5,6-quinona-2-carboxílico e por polimerização com DHI forma a eumelanina (THIRUVENKADAN, 2008; ANDO 2007). Já para a feomelanogênese a DOPA-quinona é convertida em 5-S-cisteína-dopa pela adição de cisteína e através de diferentes passos bioquímicos há a formação de feomelanina (SEARLE, 1968; JACKSON, 1994; ROBINS, 1991; ANDO,

2007). As eumelaninas são polímeros de alto peso molecular que apresentam uma complexa estrutura química, são insolúveis em quase todos os solventes, possuem coloração de marrom à preta e são mais eficientes em fotoproteção. A estrutura química das feomelaninas é semelhante a das eumelaninas, porém são solúveis e sua coloração vai do amarelo ao vermelho (LIN, 2007; VIDEIRA, 2013).

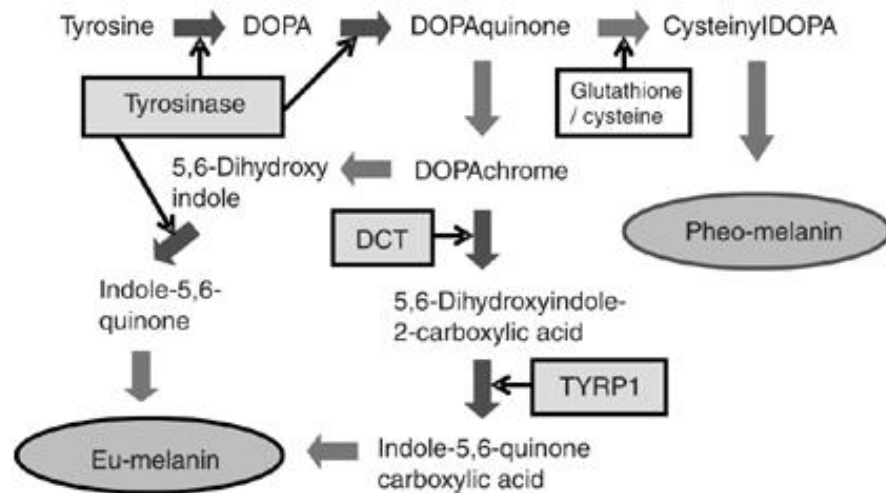


Figura 2 – Esquema da via de síntese dos dois tipos de melaninas produzidos em mamíferos.

Fonte: ANDO, 2007, p.753.

3.2.1 Migração dos melanócitos

Os melanócitos são células especializadas da pele, cuja origem embriológica se dá a partir de uma população germinativa de melanoblastos originários de células da crista neural (BUSCÀ, 2000; NORDLUND, 1986), as quais são células pluripotentes que surgem a partir do ponto mais dorsal do tubo neural entre a superfície do ectoderma e a placa neural. Além de melanócitos, células da crista neural dão origem a neurônios e células gliais, medula adrenal, células cardíacas e de tecidos craniofaciais (LE DOUARIN, 2004; LIN, 2007). Os melanoblastos são pequenos e redondos, tornando-se posteriormente estrelados e finalmente quando amadurecem ficam no formato dendrítico (THIRUVENKADA, 2008). Após o encerramento do tubo neural eles migram para diversas estruturas do corpo, a partir do tronco da crista neural para locais específicos em ambos os lados do corpo seguindo um caminho dorsolateral entre o dermatomo dos somitos e o ectoderma até chegar aos seus diferentes destinos finais que variam entre as espécies, mas em geral incluem a camada basal da epiderme, folículos pilosos, região em torno do olho, no ouvido interno, entre outros sítios específicos (LIN, 2007; ERICKON, 1993;

COSTIN , 2007; TSATMALI , 2002; PARK, 2007) e são nestes sítios que as células se proliferam e migram para se espalharem, sendo que na maioria das espécies os melanoblastos começam o processo de melanização imediatamente antes ou logo depois de alcançar seu destino (NORDLUND, 1986). No caso da pigmentação de pelos, uma vez que as células pigmentares tenham terminado a migração elas residem no bulbo dos folículos pilosos e então sintetizam o pigmento melanina, que é incorporado ao crescimento do pelo (THIRUVENKADA, 2008).

Várias vias de sinalização, fatores de transcrição e mediadores produzidos por células do tubo dorsal neural, ectoderme e queratinócitos regulam fortemente a migração, proliferação e diferenciação dos melanócitos em células produtoras de melanina (VIDEIRA, 2013; LIN, 2007), pois estes elementos fornecem e integram sinais espaciais e temporais ideais para criar o ambiente adequado para o desenvolvimento normal e migração. Dessa forma mutações em genes que afetam esse processo podem produzir a hipopigmentação que surge da falta de melanócitos, em vez da falta de pigmento em melanócitos viáveis, como ocorre no albinismo (LIN, 2007; VIDEIRA, 2013; COSTIN, 2007; PARK, 2007).

3.2.2 Controle genético da pigmentação

Este processo de síntese de melanina se dá por complexas etapas as quais dependem de um grande número de fatores variáveis, interdependentes entre si, que envolvem moléculas relevantes à síntese melânica, hormônios, genes e até a pele como um sistema totalmente integrado. Por exemplo, o meio celular é um fator importante na determinação do tipo de pigmento produzido pelo melanócitos, assim como a composição, número, formas e arranjos dos grânulos de melanina, que podem influenciar o resultado final. Estes, por sua vez, dependem da presença e propriedades dos melanócitos, fatores esses que estão diretamente ligados ao sucesso na migração e no desenvolvimento normal da crista-neural da qual derivam. Assim, o resultado final desejado depende do bom funcionamento de uma hierarquia de genes que se tornam ativos em momentos diferentes e em locais diferentes ou algumas vezes atuando em todo o organismo ao mesmo tempo (THIRUVENKADAN, 2008).

Após os primeiros estudos sobre identificação de genes que afetam a cor da pelagem em camundongos, foram relatadas diferentes mutações nestes genes em

animais de produção e atualmente alguns genes ligados à determinação ou modificação da cor da pelagem em equinos também têm sido caracterizados molecularmente, tanto com o propósito de registro como para manejo das populações (THIRUVENKADAN, 2008). Devido a isso vem crescendo o número de testes genéticos desenvolvidos e disponibilizados comercialmente para essa determinação, fato esse de grande interesse para os criadores de cavalos, pois os testes genéticos para as pelagens podem constituir uma ferramenta importante para a seleção, eliminação de doenças associadas a essa característica e valorização da criação (COELHO, 2008).

Os genes que atuam para a geração dos padrões de pelagem podem ser classificados em dois grupos principais, sendo estes: genes que atuam nos melanócitos ou melanoblastos, interferindo no desenvolvimento, sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração, podendo impedi-los de completar a diferenciação levando a um fenótipo de pelagem branca ou, algumas vezes, apenas reduzindo a população final; e os genes que são conhecidos por influenciar diretamente na síntese ou nível de síntese do pigmento (THIRUVENKADAN, 2008). Genes chaves dessas vias incluem os fatores de transcrição PAX3 (*paired-box 3*) e MITF, o receptor de tirosina quinase (KIT), receptor acoplado à proteína G denominado receptor B de endotelina (EDNRB) e seu ligante endotelina-3 (EDN-3) e o gene SOX10 (*sex-determining region y (SRY)-box 10*), os quais desencadeiam uma cascata de sinalização em que cada sinal precede e depende do outro (JACKSON, 1997; THIRUVENKADAN, 2008; LIN, 2007). Dadas as definições das relações moleculares e fenotípicas entre os genes responsáveis por essas vias é percebido que eles representam uma rede epistática de fatores regulatórios de melanócitos que interagem entre si (PRICE, 2001; LIN, 2007). As variações de cor encontradas nas diversas raças de equinos podem ser entendidas como o efeito destes grupos de genes, que se encontram alterados, causando modificações em suas funções normais, tanto em relação aos melanócitos, quanto na síntese do pigmento ou na interação das duas funções (SEARL 1968; EBERLE 1988; JACKSON, 1997).

Como dito anteriormente os genes EDNRB e MITF tem papel importante na melanogênese, uma vez que estão envolvidos direta ou indiretamente nas vias

bioquímicas relacionadas a este processo. É possível observar na figura 3 a ação destes dois genes em específico durante a síntese do pigmento.

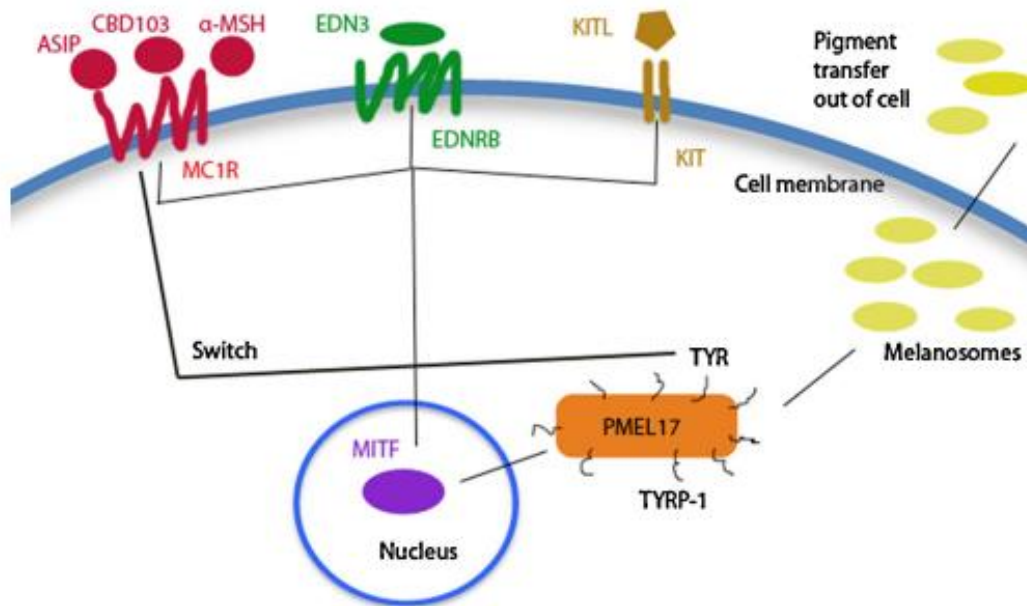


Figura 3 – Esquema da rota de sinalização envolvendo os genes MITF e EDNRB na melanogênese.

Diagrama esquemático da melanogênese, onde descreve simplificada as principais vias de sinalização envolvidas na produção do pigmento no interior dos melanócitos e a interação do gene EDNRB e do gene MITF neste processo. A partir da transcrição do fator de transcrição MITF é iniciado o processo de acúmulo de melanina dentro das estruturas dos melanosomas, os quais, também são responsáveis pelo transporte de melanina do interior da célula para o exterior, até tecidos vizinhos, com isso resultando na pigmentação da pele, pelos, olhos, etc. Contudo, para que ocorra a transcrição do gene MITF e se desencadeie todo esse processo é necessário que haja primeiramente a fosforilação do mesmo, a qual é regulada por diversas vias de sinalização envolvendo diversos genes, que incluem a via do EDNRB, que por sua vez é regulado pela endotelina 3 (EDN3), uma proteína extracelular. Dessa forma pode-se notar a interação fundamental de ambos os genes para síntese do pigmento.

Fonte: Linderholm & Larson, 2013.

3.2.2.1 Gene EDNRB

O gene que codifica para o receptor B de endotelina possui sete *exons* e está localizado no braço longo do cromossomo 17 em equinos (ECA 17) (FINNO, 2009). O produto do gene EDNRB é uma proteína transmembrana acoplada à proteína G, possuindo sete alças e com tamanho de 443 aminoácidos (Fig. 4), a qual interage com outras proteínas chamadas endotelinas, sendo que a endotelina-3 é o ligante mais frequente (METALLINOS, 1998). Esse receptor exerce função em vias de sinalização transmitindo informação de fora para dentro da célula e assim ativando uma cascata de sinalização, regulando inúmeros processos biológicos principalmente durante do desenvolvimento embrionário, como por exemplo, o desenvolvimento e migração de células da crista neural desde a medula espinhal até regiões específicas do embrião e a sua diferenciação em diversos tipos celulares. Essa interação tem importância particular na formação normal de gânglios nervosos intestinais e dos melanócitos, que são células produtoras de melanina responsáveis pela pigmentação da pele, cabelo e cor dos olhos (BAYNASH, 1994; HOSODA, 1994).

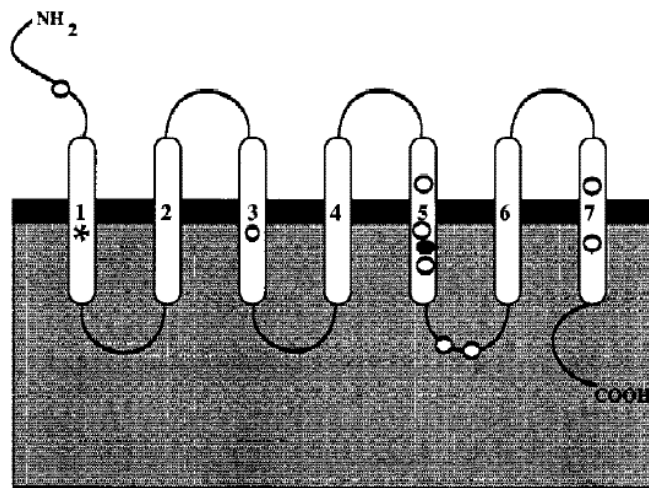


Figura 4 – Diagrama esquemático da proteína EDNRB.

Fonte: Metallinos, 1998, p.430.

Mutações no gene EDNRB são descritas como responsáveis pelo padrão de pelagem ovejuna (*frame-overo*), pois podem alterar a localização do receptor dentro da membrana plasmática ou a capacidade de sinalização e ligação do receptor (PUFFENBERGER, 1994). Esse padrão se dá pelo fato do gene estar envolvido na via da melanogênese e quando há uma falha na sua expressão devido a mutações de caráter heterozigoto há uma migração diferenciada de melanócitos formando as manchas características da pelagem (METALLINOS, 1998). Porém, quando a mutação se mostra de forma homozigota outra via também regulada pelo gene EDNRB é afetada e pode ser observado o fenótipo da Síndrome Letal do Potro Branco ou *Lethal White Foal Syndrome* (LWFS), onde há limitação dos precursores dos neurônios entéricos, além de ocorrer despigmentação da pele por não haver migração de melanócitos e dessa forma o potro nasce com dificuldade de passar alimento através do trato intestinal devido à deficiência das células nervosas (aganglionose) que controlam a ação dos músculos peristálticos levando ao bloqueio intestinal crônico e com pelagem completamente branca e muitos nascem com olhos azuis, estes sintomas levam o potro a óbito de um a seis dias após o parto (COELHO, 2008).

Esta anormalidade genética, bem como a pelagem ovejuna são causadas por uma mutação dinucleotídica no primeiro *exon* do gene onde há a substituição das bases Timina e Citosina por Adenina e Guanina (TC>AG), na posição 353 e 354, o que resulta na troca de aminoácidos de uma Isoleucina por uma Lisina (Ile>Lys) no códon 118 da proteína final (VROTOS, 2001). Sendo assim, cavalos que apresentam a pelagem ovejuna e não possuem LWFS são teoricamente heterozigotos para a mutação e podem passar para a prole o gene mutado e quando em homozigose o potro nasce com LWFS (METALLINOS, 1998).

Outra alteração no gene EDNRB que seria um possível candidato responsável pelo padrão de pelagem estudado é uma adição ou deleção de vários pares de bases (pb) na região do *intron*, que pode ocasionar uma mudança na fase de leitura dos *exons* pela modificação no momento do *splicing* provocando a má formação da proteína final e com isso afetar a migração dos melanócitos (BROOKS & BAILEY, 2005; HAASE, 2009). Esse tipo de mutação foi descrito para o gene KIT em um trabalho de Brooks & Bailey (2005) e através da amplificação dos fragmentos

que contenham os *introns* é possível observar se há diferença entre o tamanho dos fragmentos obtidos em relação ao tamanho dos fragmentos esperados.

3.2.2.2 Gene MITF

O gene do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), que em equinos encontra-se no cromossomo 16 (ECA 16), pertence a uma família de genes de fatores de transcrição chamados zíper de leucina hélice-alça-hélice Básicos (bHLHZip), o qual atua como o principal regulador no desenvolvimento de diversos tipos celulares, como osteoclastos, mastócitos e exercendo importante papel no desenvolvimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência de melanócitos (HOU & PAVAN, 2008), conseqüentemente também é importante para a pigmentação da pele, cabelo e olhos (VANCE, 2004).

O MITF tem uma estrutura especial com três regiões extremamente importantes para as interações proteicas, sendo estas uma região conhecida como o motivo base, a qual se liga a regiões específicas do DNA, as regiões chamadas de motivos hélice-alça-hélice e o motivo *zipper* de leucina. Estes motivos permitem que moléculas de MITF interajam umas com as outras ou com outras proteínas que tenham uma estrutura semelhante produzindo uma unidade de duas proteínas (dímero), que atua ajudando a controlar atividades de genes específicos. Foram identificadas em camundongos pelo menos nove isoformas específicas do MITF (Mitf-A, -B, -C, -D, -E, -H, -J, -M, e -mc) as quais são codificadas por *splicing* alternativo do primeiro *exon* do gene, que é específico para cada variante em uma organização de multi-promotor, enquanto os *exons* dois a nove de todas isoformas são idênticos (Figura 5) (MURAKAMI, 2007; LEVY, 2006). Algumas dessas isoformas são específicas para determinados tipos celulares, por exemplo, o promotor M parece ser expresso seletivamente em melanócitos (FUSE, 1996; LEVY, 2006).

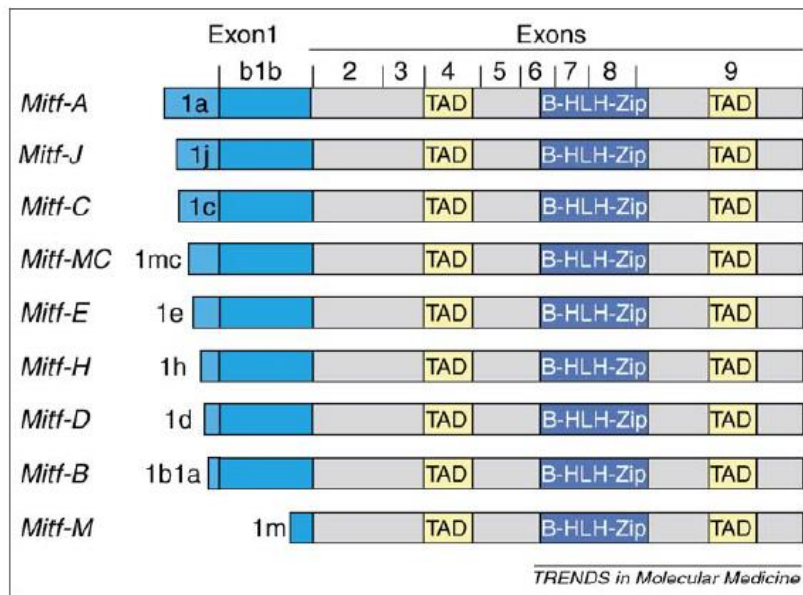


Figura 5 – Imagem representando da organização em multi-promotor do gene MITF.

Fonte: Levy, 2006, p.407.

Sabe-se que *in vitro* a ação e estabilidade do gene MITF são modulados por várias vias de sinalização, resultando na fosforilação da proteína em resíduos de Serina (BERTOLOTTO, 1998; BUSCA, 2000; SOLANO, 2006; PARK, 2008). Entretanto, a função exata da sinalização do MITF *in vivo* permanece em grande parte desconhecida. Sabe-se que a expressão de MITF é ativada durante a transição de células pluripotentes da crista-neural para melanoblastos e é necessária para a sobrevivência da migração dos melanoblastos (STEINGRIMSSON, 2004; LIN, 2007).

Todas as mutações no MITF identificadas e descritas em camundongos afetam melanócitos em graus variados resultando tanto na deficiência da síntese de melanina, pois é afetada a sua ligação ao promotor da tirosinase que é uma enzima chave para a síntese (LEE, 2007; OLIVEIRA, 2010), quanto em um fenótipo de pelagem caracterizado por apresentar padrões que variam desde a presença de manchas brancas pelo corpo a uma pelagem completamente branca ocorrendo devido a falta de melanócitos, também pode ocorrer a ausência de pigmentação nos olhos (STEINGRÍMSSON, 2004; BAUER, 2009) sugerindo que MITF é essencial para sobrevivência, proliferação ou para prevenir a transdiferenciação dessas células para outras linhagens celulares da crista-neural (LIN, 2007). Além disso, a falha na expressão da proteína MITF pode afetar outras vias de sinalização para

diferentes tipos celulares, as quais levam a surdez precoce e olhos atrofiados e sem pigmentação (LEVY, 2006).

Especificamente em equinos mutações no gene MITF relacionadas às pelagens manchadas foram descritas por Hauswirth *et al.* (2012). Em seu trabalho foram identificadas mutações na região promotora específica para melanócitos e no *exon* seis do gene, sendo estas respectivamente, uma mutação de deleção de uma Timina e inserção de 11 pares de bases (T>11pb) na sequência do promotor, a qual afeta uma região que tem se mostrado funcionar como um sítio de ligação para genes importantes na melanogênese (FUSE, 1996; BONDURAND, 2000; HALLSSON, 2007) e para a sequência do *exon* seis há uma troca de bases de uma Timina por uma Citocina (T>C), o qual proporciona uma redução na capacidade da proteína de se ligar ao DNA e assim não exercendo seu papel de fator de transcrição impedindo a produção do pigmento (HAUSWIRTH, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de sangue

Primeiramente foi realizada a coleta de sangue de um total de 23 animais de cabanhas localizadas no sul do Rio Grande do Sul, sendo que alguns dos animais apresentavam parentesco. Foram definidos para cada gene quais seriam os animais escolhidos para coleta, dado este que será explicado nos próximos tópicos. Os materiais utilizados para coleta de amostra biológica foram: algodão, álcool 70%, luvas de procedimento, tubos *BD Vacutainer*® contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para que não houvesse coagulação do sangue, agulha e seringa.

Foi feita a contenção do animal na própria cabanha da maneira menos estressante possível, então foi realizada a assepsia da região da jugular no 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 introduziu-se a agulha na veia jugular, foi conectado o tubo com EDTA e pela pressão 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, o mesmo procedimento foi realizado para todos os animais procurando sempre evitar a formação de hematomas e sem estressar o animal.

4.2 Delineamento experimental

Para o estudo de mutações nos *introns* do gene EDNRB foi realizado extração de DNA a partir de amostras de sangue de dois equinos da raça Crioula, sendo um destes o indivíduo alvo do estudo para análise de mutação e o outro o indivíduo controle em relação a pelagem ovejuna. Os animais eram, respectivamente, um apresentando pelagem ovejuna tostada e outro de pelagem baía ruana, ambos filhos do mesmo pai, cuja pelagem é baía bragada. A análise dos dados foi realizada por uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% para visualização de diferenças em relação ao tamanho dos fragmentos obtidos pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), observando as bandas no gel em comparação com os dois animais.

Para a análise das mutações nos *exons* deste mesmo gene EDNRB foram utilizados dez animais, sendo que destes cinco apresentavam pelagem manchada, onde dois eram ovelos e três “não-ovelos”, porém apresentando um padrão de pelagem com manchas, além dos cinco animais de pelagem “não-manchada”. Estes dez animais pertencem a família de dois ganhões de pelagem bragada, os quais não são relacionados até a 5ª geração. Foi escolhido como o melhor método de estudo destas mutações nas regiões codificantes do gene o uso da tecnologia de sequenciamento de Sanger automatizada utilizando eletroforese capilar, a qual foi realizada pela empresa MacroGen® (Korea), pois os fragmentos a analisar eram de tamanhos pequenos e esta tecnologia se mostrou mais aplicável para o objetivo proposto.

No gene MITF foram analisados dois *exons*, baseado em dados publicados em artigos que os apontava como alvos de estudo (HAUSWIRTH, 2012), sendo estes a região promotora (*exon* um) e o *exon* seis. Foram escolhidos 11 animais para o estudo, destes cinco apresentavam pelagem sólida “não-manchada”, servindo como indivíduos controle para a possível mutação, ou seja, esperava-se não encontrar alteração na sequência de nucleotídeos do gene, além destes quatro animais apresentavam pelagem manchada, sendo dois ovelos e dois apresentando um padrão de manchas do tipo “não-ovelo” e mais dois animais que não possuíam pelagem ovela, porém apresentavam manchas ao redor dos olhos, ou seja, salgos. Estes seis últimos animais poderiam possuir alteração na sequência do gene como descrito na literatura, pois apresentavam algum tipo de mancha característico destas alterações e por isso foram escolhidos como indivíduos para análise da mutação. Assim como no estudo dos *exons* do gene EDNRB a análise destas mutações do gene MITF se deu por sequenciamento de Sanger automatizado utilizando eletroforese capilar, realizado pela empresa MacroGen® (Coreia).

4.3 Extração de DNA

A partir das amostras de sangue de cada animal coletado que estavam armazenadas em refrigeração foi realizada a extração de DNA genômico seguindo o protocolo fornecido pelo kit da Axygen® – *AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit*. Esta etapa foi igual para todos os animais, independente de qual gene alvo estava sendo estudado. Sendo os passos para extração de DNA, basicamente, 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. Após essa etapa foi confirmada a extração das amostras a partir de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Gel Red*, podendo se verificar a presença de bandas com peso molecular elevado, significando que a extração de material genômico foi bem sucedida.

4.4 Desenho dos *primers*

Para o gene EDNRB os conjuntos de *primers* foram desenhados no programa *Primer 3*, baseando-se na sequência referente a espécie *Equus caballus* (ECA) depositada no NCBI (*GenBank*), sendo esta sequência ID: 100033875, que corresponde ao cromossomo 17 de equinos (ECA 17), onde está localizado o gene alvo e para o gene MITF a sequência dos *primers* foi baseada no trabalho de Hauswirth *et al.* (2012), o qual é referente à sequência depositada ID: 100033918 correspondente ao cromossomo 16 em equinos (ECA 16), região a qual está localizada o gene a ser estudado.

4.4.1 Exons EDNRB

Foram obtidos sete conjuntos de pares de *primers* para os *exons* do gene EDNRB, os quais estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificação dos *exons* do gene EDNRB

<i>Exon</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho	Temp.
1	<i>Forward</i>	TCCTTCCCTTGCGGATGTCCAGA	594 pb	65 °C
	<i>Reverse</i>	CCCCGCAGGCGAGATATTAGCAG		
2	<i>Forward</i>	AGGGCGCCTCATGAAAGTCT	222 pb	56 °C
	<i>Reverse</i>	CAGAGCAATCACTAGTATAGTGTC		
3	<i>Forward</i>	GCTCTGCCAGCTTGGCAAACAAT	425 pb	65 °C
	<i>Reverse</i>	ACCCGGCTTCCTGCAGCTTG		
4	<i>Forward</i>	GGGGATGCTTTCCTTTGTTATGC	375 pb	62 °C
	<i>Reverse</i>	GCAAGAAAGGGAATATGCTTTGGT		
5	<i>Forward</i>	TGCTTAGCAAGGATAATGCCGTGA	206 pb	62 °C
	<i>Reverse</i>	ACCTCAAAAAGTTCACATCTATGGGG		
	<i>Forward</i>	GCTCAGAGCAGCATATTTTTTCAACA	290 pb	62 °C

6	<i>Reverse</i>	TCATCCATGATGTAATGCAAGGGA		
	<i>Forward</i>	AGGAAGGGTCATGACAGTGTAAC	278pb	56 °C
7	<i>Reverse</i>	GTTTTGTTTTGGCAAATGCCTCAC		

Baseado na sequência GenBank ID: 100033875. Temp: Temperatura de Anelamento.

4.4.2 Introns EDNRB

Os *primers* utilizados para amplificação dos *introns* foram os mesmos utilizados para os *exons*, porém foram arranjados em combinações específicas diferentes, sendo utilizados seis dos sete conjuntos, os quais favoreciam a amplificação da região desejada, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para amplificação dos *introns* do gene EDNRB

<i>Intron</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Temp.</i>
1	<i>F exon 1</i>	TCCTTCCCTTGCGGATGTCCAGA	15.694 pb	65°C
	<i>R exon 3</i>	ACCCGGCTTCCTGCAGCTTG		
2	<i>F exon 2</i>	AGGGCGCCTCATGAAAGTCT	684 pb	62,4 °C
	<i>R exon 3</i>	ACCCGGCTTCCTGCAGCTTG		
3	<i>F exon 3</i>	GCTCTGCCAGCTTGGCAAACAAT	2.947 pb	65 °C
	<i>R exon 4</i>	GCAAGAAAGGGAAATATGCTTTGGT		
4	<i>F exon 4</i>	GGGGATGCTTTCCTTTGTTATGC	792 pb	65 °C
	<i>R exon 5</i>	ACCTCAAAGTTCACATCTATGGGG		
5	<i>F exon 5</i>	TGCTTAGCAAGGATAATGCCGTGA	993 pb	65 °C
	<i>R exon 6</i>	TCATCCATGATGTAATGCAAGGGA		
6	<i>F exon 6</i>	GCTCAGAGCAGCATATTTTTTACACA	1.876 pb	62 °C
	<i>R exon 7</i>	GTTTTGTTTTGGCAAATGCCTCAC		

Baseado na sequência GenBank ID: 100033875. F: *Forward*; R: *Reverse*; Temp: Temperatura de Anelamento.

4.4.3 Exons MITF

Utilizou-se dois conjuntos de *primers* para os *exons* do gene MITF (Tabela 3) publicados por Hauswirth *et al.* (2012), segundo a sequência depositada no NCBI (GenBank).

Tabela 3 - *Primers* utilizados para amplificação dos *exons* do gene MITF.

Exon	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho	Temp.
1	<i>Forward</i>	GGTATCAAACAACAAACAGCATT	860 pb	61,4 °C
	<i>Reverse</i>	GCTAACTCCCTCTCTTCCTGA		
6	<i>Forward</i>	GTCGGTGTGTATCACGAGGT	495 pb	58,2 °C
	<i>Reverse</i>	GGGAACATCAACTCCAACAT		

Baseado na sequência GenBank ID: 100033918. Temp: Temperatura de Anelamento.

4.5 Otimização da PCR

Após a extração do DNA foi possível realizar a amplificação da região alvo do estudo através da técnica de PCR, porém antes foi necessária a validação dos conjuntos de *primers* e para isso foi feita a otimização dos mesmos realizando uma PCR do tipo gradiente de temperatura, a qual é baseada na utilização de diferentes temperaturas de anelamento para amplificar amostras controles, a fim de se encontrar a temperatura de anelamento ideal de cada *primer*, estas temperaturas pré-definidas estão descritas nas tabelas no item 4.4, juntamente com as sequências dos *primers*. Dessa forma, após padronização das temperaturas foi possível realizar a reação de PCR comum procurando aumentar o número de cópias de cada fragmento específico dos genes para que a análise final dos dados estivesse com a maior precisão possível. As condições das reações de PCR seguiram o seguinte protocolo: 50 ng de DNA genômico, 0,20 mM 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 cada reação de 25 µL. Para a maioria dos fragmentos foi utilizada a enzima *DreamTaq™ DNA Polymerase* e os demais reagentes da empresa Fermentas®, porém para amplificar o *intron* um cuja sequência possuía um tamanho maior que as demais de 15.694 pb foi utilizada a enzima *KAPA Long Range HotStart DNA Polymerase* da Kapabiosystems®. Os ciclos de amplificação da PCR foram realizados no termociclador *GeneTouch – Bioer®* seguindo as etapas de desnaturação inicial à 94 °C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 40 segundos; anelamento utilizando a temperatura ideal

de cada *primer* por 40 segundos; extensão à 72 °C por 40 segundos e uma etapa de extensão final à 72 °C por 7 minutos.

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 seguinte protocolo: 3 µL de buffer diluído, na proporção de 20 µL de *loading buffer* para 30 µL de água, 2 µL de *Gel Red* e 5 µL de produto de PCR, as amostras foram aplicadas no gel e para comparação de tamanho foi aplicado juntamente 2 µL de marcador de peso molecular (Axygen®).

4.6 Purificação dos produtos de PCR

Para que as amostras possam seguir para o sequenciamento é necessário estas estejam purificadas e livres de quaisquer contaminantes que possam interferir posteriormente nas análises, para isso foi realizada a purificação dos produtos da PCR dos *exons* do gene EDNRB e dos *exons* do gene MITF utilizando, respectivamente, as metodologias de purificação a partir do gel de agarose 1% da corrida de eletroforese e através do próprio produto de PCR utilizando uma enzima específica. Cada metodologia será descrita a seguir.

4.6.1 Purificação por gel

Foi utilizado para o sequenciamento dos *exons* do gene EDNRB a metodologia de purificação por gel de agarose 1% da eletroforese seguindo o protocolo descrito no kit *AxyPrep DNA Gel Extraction Kit* da empresa Axygen®, dessa forma, primeiramente foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da PCR, utilizando um *mix* de reagentes nos volumes de 40 µL de produto de PCR; 3 µL de *buffer* diluído e 2 µL de *Gel Red*, foi aplicado o volume total do *mix* em cada poço do gel. Então, foi realizada a corrida de eletroforese a 120 voltz por 40 minutos, assim foi possível se obter uma banda nítida no gel, a qual representava o tamanho do fragmento que se desejava purificar, esta análise foi possível através da comparação de tamanho com o marcador de peso molecular de DNA (Axygen®) aplicado 2 µL juntamente ao gel de agarose. Esta técnica se baseia em cortar este pedaço do gel de agarose, o qual possui o fragmento de interesse, para que seja dissolvido em banho maria utilizando soluções

tampão do *kit* próprios para solubilização completa do fragmento para que possa ser aplicada a amostra em uma coluna, a qual contém uma membrana específica para ligação do DNA, então são realizadas diversas etapas de limpeza onde foi feita centrifugação e descarte do sobrenadante do tubo coletor, que está acoplada a coluna para possibilitar a purificação do DNA e após esta etapa foi feita mais uma centrifugação final utilizando uma nova coluna, afim de se obter como sobrenadante apenas o DNA purificado e livre de impurezas (Em: <<http://axygen.com.br/>> Acesso em: 11 nov. 2013).

4.6.2 Purificação por enzima

Já para os *exons* do gene MITF foi utilizada uma metodologia diferente da anterior, que é baseada na purificação direta do produto de PCR de uma forma mais rápida e eficiente utilizando o protocolo descrito no *kit ExoSAP-IT*[®] da empresa Affymetrix[®]. Esta metodologia utiliza duas enzimas hidrolíticas como o principal reagente (*ExoSAP-IT*[®]), as quais são a Exonuclease I (Exo) e a Fosfatase alcalina (SAP), que agem juntas em um tampão especialmente formulado com a finalidade de remover dNTPs e *primers* indesejados do produto da PCR, sendo que a Exonuclease I remove *primers* residuais de cadeia simples e qualquer DNA de cadeia simples irrelevante que é produzido durante a reação de PCR e Fosfatase alcalina remove os restantes de dNTPs da reação de PCR. O funcionamento desta metodologia se dá, primeiramente, pela adição do reagente diretamente ao produto de PCR e incubação da amostra a 37 °C durante 15 minutos para que as enzimas possam ser ativadas, após o tratamento a *ExoSAP-IT* é inativada por aquecimento a 80 °C durante 15 minutos e em um único passo possibilita a limpeza de todos os componentes em excesso da reação restando apenas o produto de PCR purificado (Em: <<http://www.affymetrix.com>> Acesso em: 11 nov. 2013).

4.7 Sequenciamento

Após as amostras estarem purificadas e livres de qualquer contaminante que possa interferir no sequenciamento as 21 amostras de cavalos da raça Crioula referentes aos *exons* dos genes EDNRB e MITF foram encaminhadas à empresa MacroGen® (Coreia), 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. Para isso é preciso seguir um protocolo de envio de amostras, no qual as amostras de DNA precisam estar na concentração 50 ng/μL em um volume de 10 μL e cada *primer* utilizado deve ser fornecido separadamente tanto o *Forward* quanto o *Reverse* na concentração de 5 pM/μL (picoMolar) cada e em um volume final de 20 μL, assim é possível que sejam sequenciadas as duas extremidades da fita de DNA podendo se obter um resultado melhor para análise posterior dos dados (Em: <<http://dna.macrogen.com/>> Acesso em: 11 nov 2013).

4.7.1 Análise do Sequenciamento

Depois de sequenciadas as 21 amostras foram analisadas nos programas *FinchTV* versão 1.4.0 e *Geneious* versão 7.0.4, para curadoria e alinhamento das mesmas, além disso foi realizado BLASTn da sequência referência de *Equus Caballus* depositada no NCBI com as amostras sequenciadas dos genes MITF e EDNRB para comparação e análise de possíveis mutações diferencialmente presentes em cada uma das raças.

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR dos 23 animais estudados foram analisados em uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% para visualização dos tamanhos dos fragmentos e confirmação da amplificação da região desejada. Foram amplificados corretamente os *exons* um (promotor) e seis do gene MITF (Figura 6 e 7) onde o tamanho de cada fragmento esperado se encontra na tabela 3, no gene EDNRB foi possível analisar apenas seis *exons* e cinco *introns*, pois para o *exon* sete e *intron* três não houve amplificação, pois não foi possível otimizar as condições da PCR para estas regiões, mas para as demais regiões foi possível visualizar as bandas correspondentes ao tamanho esperado de cada fragmento e que se encontram nas tabelas 1 e 2.

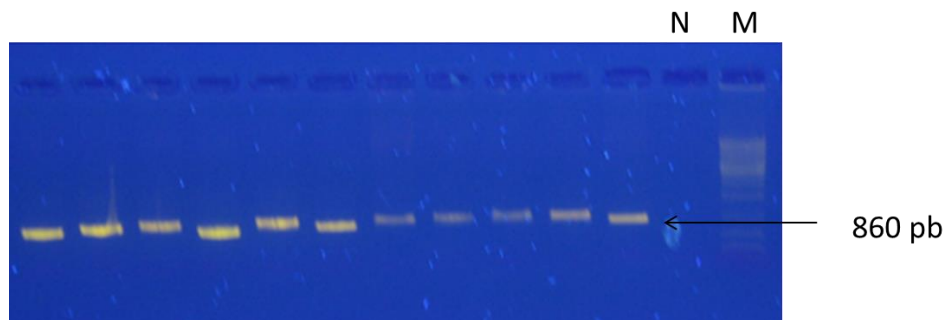


Figura 6 – Imagem de um gel de eletroforese do produto de PCR referente a região promotora do gene MITF. N: controle negativo; M: marcador de peso molecular.

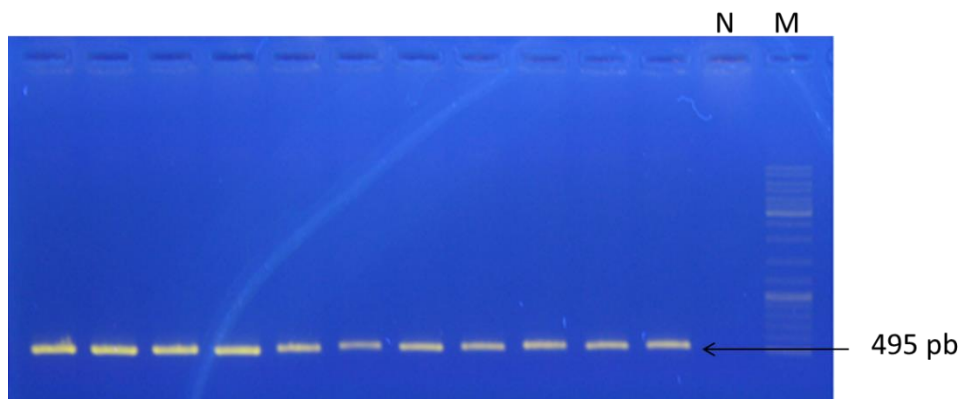


Figura 7 – Imagem de um gel de eletroforese do produto de PCR referente ao *exon* seis do gene MITF. N: controle negativo; M: marcador de peso molecular.

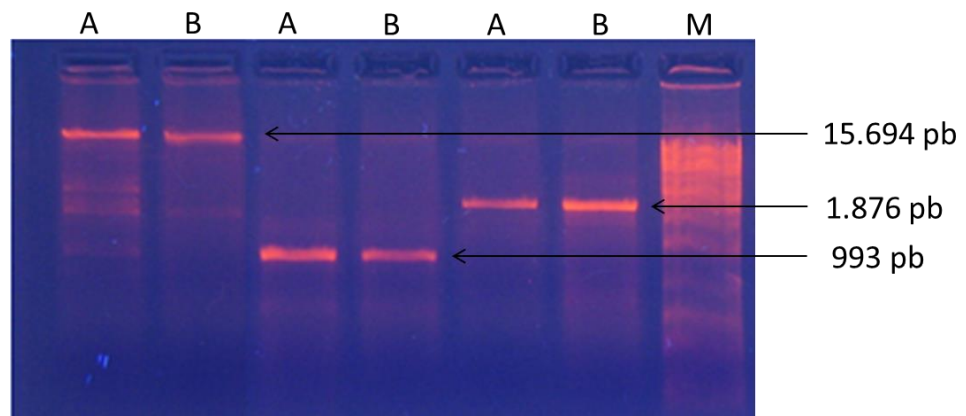


Figura 8 – Imagem de um gel de eletroforese dos produtos de PCR dos *introns* um, cinco e seis do gene EDNRB.

Produtos de PCR dos *introns* um, cinco e seis, respectivamente, apresentando os tamanhos de fragmentos 15,4 kb, 0,9 kb e 1,8 kb. A: animal de pelagem ovejira; B: animal de pelagem “não-ovejira”; M: marcador de peso molecular.

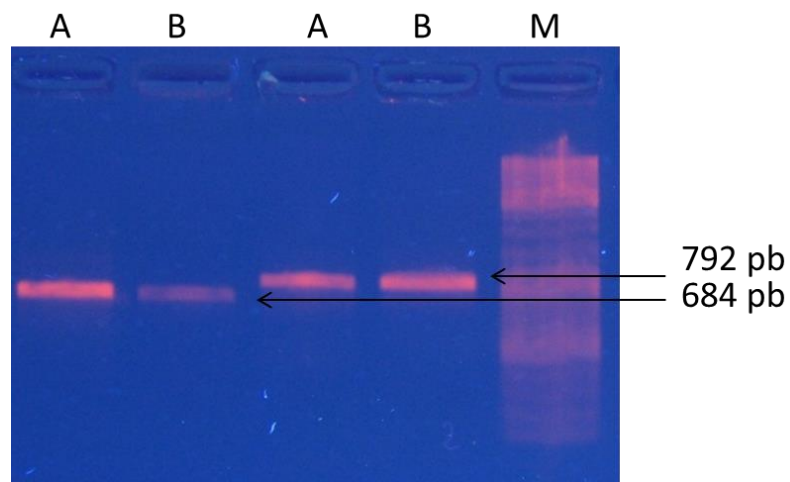


Figura 9 – Imagem de um gel de eletroforese dos produtos de PCR dos *introns* dois e quatro do gene EDNRB.

Produtos de PCR dos *introns* dois e quatro, respectivamente, apresentando os tamanhos de fragmentos 684 pb e 792 pb. A: animal de pelagem ovejira; B: animal de pelagem “não-ovejira”; M: marcador de peso molecular.

Foi possível amplificar e analisar os *introns* um, dois, quatro, cinco e seis do gene EDNRB e como mostra as figuras 8 e 9 não foram encontradas variações de tamanho em relação às amostras do animal ovejira e “não-ovejira”, podendo concluir por esta análise primária que mutações de inserção ou deleção nos *introns* deste gene não estariam relacionadas com a causa dessa pelagem manchada.

5.2 Análise de Bioinformática

Após purificação das amostras referente aos produtos da PCR foi realizado sequenciamento automático de Sanger por capilar pela empresa MacroGen® (Coreia) de 21 animais para as regiões específicas dos genes estudados, os quais foram analisados os *exons* do gene EDNRB, a região promotora e *exon* seis do gene MITF. As análises se deram a partir da visualização dos resultados do sequenciamento no programa FinchTV, onde foi possível observar o gráfico de um eletroferograma referente a cada amostra e com isso fazer a curadoria dos dados obtidos, para que estas fossem alinhadas utilizando o programa Genious, a fim de comparar as sequências das amostras de todos os animais e identificar possíveis mutações presentes diferencialmente ou nos animais de pelagem manchada ou nos de pelagem sólida que pudessem explicar esses padrões de manchas. Para comparar a sequência dos genes do cavalo Crioulo com o genoma do equino depositado no banco de dados do NCBI referente a um cavalo da raça PSI (Puro-Sangue Inglês) foi feito BLAST(n) das amostras.

Como é possível observar na figura 10 referente ao *exon* um (promotor) do gene EDNRB a possível mutação dinucleotídica TC>AG relacionada à falha na migração de melanócitos e aparecimento de manchas não foi encontrada, visto que quando foram comparados animais de pelagem ovejuna e animais de pelagem não ovejuna estes não apresentavam variação nesta região. O mesmo ocorreu com os *exons* um e seis do gene MITF quando foram comparados animais de pelagens manchadas e “não manchadas”, onde no *exon* promotor não houve troca do nucleotídeo Timina pela inserção de 11 pb como mostra a figura 11 e no *exon* seis não apresentava a mutação T>C (Figura 12).



Figura 10 – Imagem de um eletroferograma do exon um do gene EDNRB.

Mostrando que não houve troca dos nucleotídeo TC>AG. A: animal de pelagem ovejira; B: animal de pelagem baia ruana.



Figura 11 – Imagem de um eletroferograma da região promotora do gene MITF.

Mostrando que não houve inserção de 11 pb . A: animal de pelagem ovejira; B: animal de pelagem zaina.

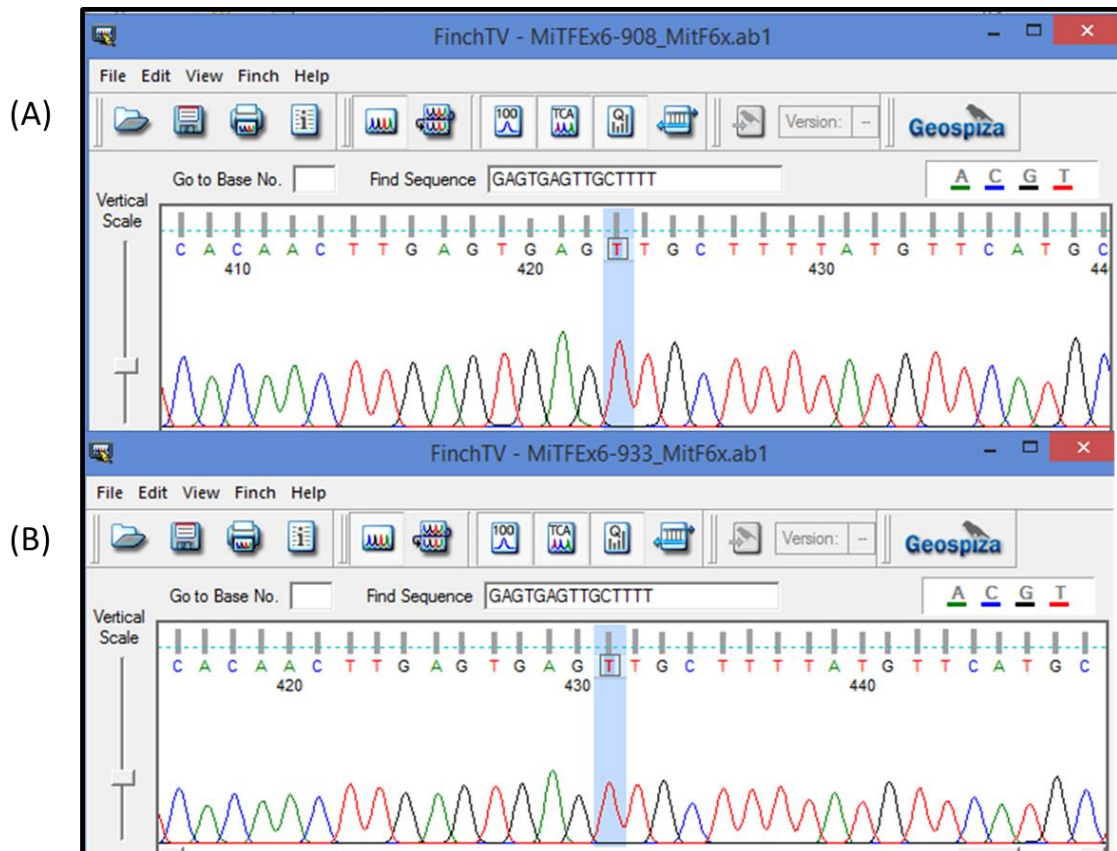


Figura 12 – Imagem de um eletroferograma do *exon* seis do gene MITF.

Mostrando que não houve a mutação T>C. A: animal de pelagem ovejira; B: animal de pelagem zaina.

5.2.1 Alinhamento pelo Genious

A partir do alinhamento das sequências foi possível observar e concluir que nas regiões alvos do estudo não houve variações entre as amostras estudadas, tanto de animais de pelagem ovejira ou manchada quanto de animais de pelagem sólida, como é possível observar na figura 13 a indicação da região da possível mutação TC>AG no gene EDNRB, mostrando o sequenciamento com o *primer Reverse*, que não foi encontrada variação entre as amostras. Foi verificado que para o gene MITF não foi encontrada a troca da base Timina por 11 pb na região indicada na figura 14, também não houve a mutação *missense* de troca de uma Timina por uma Citosina no *exon* seis (Figura 15), mostrando que nestas regiões não houve variação entre as amostras.

encontrar, porém nenhuma destas alterações pôde ser identificada como sendo uma mutação gênica que ocasionasse as pelagens manchadas encontradas nos equinos do presente estudo, visto que estas mutações estavam presentes tanto em animais de pelagem oveira quanto de pelagens sólidas. Algumas destas variações encontradas entre as raças estão demonstradas nas figuras 16, 17 e 18 abaixo.

120416-22_A01_EC908EDN1-ECEDNRB1R.ab1
Sequence ID: lcl|155114 Length: 576 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 565 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
968 bits(524)	0.0	544/553(98%)	4/553(0%)	Plus/Plus
Query 50624535	ATTGATGGGGATGTCATGATGATGTGCAGCAAGTCTCCAGAGCCAGGCTGGCGATCAA	50624594		
Sbjct 16	ATTGATGGGGATGTCATGATGATGTGCAGCAAGTCTCCAGAGCCAGGCTGGCGATCAA	73		
Query 50624595	GATATTAGSGCCGTTCCGCATGCACCTTGTCTTGTAATGATTCAGCAGTGTGGAGTT	50624654		
Sbjct 74	TCCCTTAAAGCCGTTCCGCATGCACCTTGTCTTGTAATGATTCAGCAGTGTGGAGTT	133		
Query 50624655	TCCGATGATGCCAGCACGAACACTAGGCAGGACACTACTGTGTTGATGTACTTGAAAGT	50624714		
Sbjct 134	TCCGATGATGCCAGCACGAACACTAGGCAGGACACTACTGTGTTGATGTACTTGAAAGT	193		
Query 50624715	CTCCTTGATCTCGATGGTTCCTTCGCACGGGGAGGAGGGAGGGTGCCTCGCTGGGCTCC	50624774		
Sbjct 194	CTCCTTGATCTCGATGGTTCCTTCGCACGGGGAGGAGGGAGGGTGCCTCGCTGGGCTCC	253		
Query 50624775	CGCCGTCCTCCCTGCTTTAGGCATTTGCGGAGGTGCTGATGACCGCGGCACGCTGGCGTT	50624834		
Sbjct 254	CGCCGTCCTCCCTGCTTTAGGCATTTGCGGAGGTGCTGATGACCGCGGCACGCTGGCGTT	313		
Query 50624835	GGACCCCGTCGGCCAGGAGGTCTTAGTCGGGGCGTCATTATCTCTTCAGACCCAGAAAG	50624894		
Sbjct 314	GGACCCCGTCGGCCAGGAGGTCTTAGTCGGGGCGTCATTATCTCTTCAGACCCAGAAAG	373		
Query 50624895	TGGCGGAGTGGCCCTGGCCGGCGGGAATCTCCTCTCTCTCCCTGGACCCCTGCCACGCC	50624954		
Sbjct 374	TGGCGGAGTGGCCCTGGCCGGCGGGAATCTCCTCTCTCTCCCTGGACCCCTGCCACGCC	433		
Query 50624955	GCAGGCAAGGATCAGCGCCACCAGAACCGCTCCACACAGGGTTGGCAGAGGCTGCATGCT	50625014		
Sbjct 434	GCAGGCAAGGATCAGCGCCACCAGAACCGCTCCACACAGGGTTGGCAGAGGCTGCATGCT	493		
Query 50625015	GCTGCCTGCTCCAGTGAGCGTCAGGTGGCCGCTCCGCACTTTCAGACTCTGGACATCCG	50625074		
Sbjct 494	GCTGCCTGCTCCAGTGAGCGTCAGGTGGCCGCTCCGCACTTTCAGACTCTGGACATCCG	552		
Query 50625075	CAAGGGTAAAGGAA	50625086		
Sbjct 553	CAAGGGTAAAGGAA	565		

Figura 16 – Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do *exon* um do gene EDNRB.

Alinhamento de um animal de pelagem oveira da raça Crioula com o genoma depositado no NCBI, mostrando as diferenças encontradas de cada animal.

130313-23_O05_MitFEx1-908_MitF.ab1
Sequence ID: lcl|24254 Length: 874 Number of Matches: 1

Range 1: 48 to 819 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1301 bits(704)	0.0	752/774(97%)	7/774(0%)	Plus/Plus	
Query	20117016	ATG-ACATG-AAAACGTGTA-TACTCAAT-T-GAT-TGCATTACATT-CAGAGACTAAAT			20117070
Sbjct	48	ATACACATGAAAACGTGCTTACTCAATTCGATCCCAATTACATTACAGAGACAAAT			107
Query	20117071	ATGAATAAGAAATAAGCTCACCTGATAGTGATTATATTCTAGCATTTCAGCATAACAAG			20117130
Sbjct	108	ATGAATAAATAAGCTCACCTGATAGTGATTATATTCTAGCATTTCAGCATAACAAG			167
Query	20117131	GTTTTAGGTGGCCCCAGTCCAATGAGAAATGGTAGACTATTCACTCCCTCTACTTTCTGT			20117190
Sbjct	168	GTTTTAGGTGGCCCCAGTCCAATGAGAAATGGTAGACTATTCACTCCCTCTACTTTCTGT			227
Query	20117191	AATTCCAGTTCOAAGACTGACTGGCACAGAGAAGGCACATATAACAAGGTATCCCGAGAC			20117250
Sbjct	228	AATTCCAGTTCOAAGACTGACTGGCACAGAGAAGGCACATATAACAAGGTATCCCGAGAC			287
Query	20117251	GCCACCGGAAACTTTATCACAGCGGTCTGCTTATAATAACCTAAGCTAATTAGTTATGC			20117310
Sbjct	288	GCCACCGGAAACTTTATCACAGCGGTCTGCTTATAATAACCTAAGCTAATTAGTTATGC			347
Query	20117311	ATTTaaaaaaaaaTGTTACACAGGGGGCTtttttttGGAAGCCCTAAGAGTTAGTCT			20117370
Sbjct	348	ATTTAAAAAAAAAATGTTACACAAGGGGGCTTTTTTTTGAAGCCCTAAGATTTAGTCT			407
Query	20117371	TAAATATTGATATCAATGTTTCCCCCTGGCTTGACGTCATGCTtttttttCATAAATATAA			20117430
Sbjct	408	TAAATATTGATATCAATGTTTCCCCCTGGCTTGACGTCATGCTTTTTTTCATAAATATAA			467
Query	20117431	AAGAACCTTTTAAAGTGATGAGCTATCAAAGTCAAACCTCACTGTCAAGATCAAGGCCAGTT			20117490
Sbjct	468	AAAGAACCTTTTAAAGATGAGCTATCAAAGTCAAACCTCACTGTCAAGATCAAGGCCAGTT			527
Query	20117491	CACTATTCAICTTTAGTTCAGTAGTATTAATAGACAATGGTATTTCTCTCCAGCAATA			20117550
Sbjct	528	CACTATTCAICTTTAGTTCAGTAGTATTAATAGACAATGGTATTTCTCTCCAGCAATA			587
Query	20117551	GGTTAAGAGCTCCATGCTCCCTTTGGAGAGACATTGCCTAAAAGCTACTAGTACACATA			20117610
Sbjct	588	GGTTAAGAGCTCCATGCTCCCTTTGGAGAGACATTGCCTAAAAGCTACTAGTACACATA			647
Query	20117611	AGATTTTCTAATGGCCGAAATAACCCTGCCACTACCGACTTGCAGGGAGACTATCGTTTA			20117670
Sbjct	648	AGATTTTCTAATGGCCGAAATAACCCTGCCACTACCGACTTGCAGGGAGACTATCGTTTA			707
Query	20117671	GGATGCAGGAGTCTCCGGGCTGAACTTTCAAGTTCATGCCCATCTTGCATTGTGGTC			20117730
Sbjct	708	GGATGCAGGAGTCTCCGGGCTGAACTTTCAAGTTCATGCCCATCTTGCATTGTGGTC			767
Query	20117731	TCAAAGTGCATCTTATTCTTAGCTGGATAGGTATGTAACCTTCTCCTGAGGCTC			20117784
Sbjct	768	TCAAAGTGCATCTTATTCTTAGCTGGATAGGTATGTAACCTTCTCCTGAGGCTC			819

Figura 17 – Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do *exon* um (promotor) do gene MITF.

Alinhamento de um animal de pelagem oveira da raça Crioula com o genoma depositado no NCBI, mostrando as diferenças encontradas de cada animal.

130313-23_K11_MitFEx6-908_MitF6x.ab1
Sequence ID: Icl|29864 Length: 473 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 454 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
808 bits(437)	0.0	448/453(99%)	2/453(0%)	Plus/Minus
Query 20103039	TCCAACATCAAAATAGCATGAACATAAAAGCAACTCACTCAAGTTGTGATTGTCCTTTTTC	20103098		
Sbjct 454	TCCAACATCAAAATAGCATGAACATAAAAGCAACTCACTCAAGTTGTGATTGTCCTTTTTC	395		
Query 20103099	TGCCTCTCTTTAGCCAATGCTCTTGTCTCCGACTCTGTGGGAAAAATACACGCTGTGCAC	20103158		
Sbjct 394	TGCCTCTCTTTAGCCAATGCTCTTGTCTCCGACTCTGTGGGAAAAATACACGCTGTGCAC	335		
Query 20103159	GTGAATGAAGTCATTAGAAATGGAAATGTTCAAGGCACACAAAAATGTAAACTACAAAA	20103218		
Sbjct 334	GTGAATGAAGTCATTAGAAATGGAAATGTTCAAGGCACACAAAAATGTAAACTACAAAA	275		
Query 20103219	CAGCTCATTCTTAAACATCTGGAAGCTTATCGGACTTGACTCTAAGTAAAAGTAGTTTT	20103278		
Sbjct 274	CAGCTCATTCTTAAACATCTGGAAGCTTATCGGACTTGACTCTAAGTAAAAGTAGTTTT	215		
Query 20103279	TAGAATTACATCTTTTATAAAATTTGCAAtttttttCAAAGCAATGTGTATCAACTAAAT	20103338		
Sbjct 214	TAGAATTACATCTTTTATAAAATTTGCAATTTTTTCAAAGCAATGTGTATCAACTAAAT	155		
Query 20103339	GCAAACACTTGGCTTCCACAAAATGGTAAAAGACCAGTAACAAAGACGTATGACACACTG	20103398		
Sbjct 154	GCAAACACTTGGCTTCCACAAAATGGTAAAAGACCAGTAACAAAGACGTATGACACACTG	95		
Query 20103399	TAGTCATAACACGTATGAGCAAGAGAAAGATAACTAGAAATCTATAAAAAATTTGTTATTA	20103458		
Sbjct 94	TAGTCATAACACGTATGAGCGAAGAGAAAGATAATTAGAAATCTATAAAAAATTTGTTATTA	35		
Query 20103459	TAGTCTATAACAGGAGTCAAAATTTCTCTTCT 20103491			
Sbjct 34	TAGTCTAT-ATCAGGAGTCAAAATTTCTCTCT 4			

Figura 18 – Imagem do alinhamento pelo BLASTn da sequência do *exon* seis do gene MITF.

Alinhamento de um animal de pelagem oqueira da raça Crioula com o genoma depositado no NCBI, mostrando as diferenças encontradas de cada animal.

6 DISCUSSÃO

A criação de equinos no Brasil se mostra uma atividade importante para o desenvolvimento do setor econômico, visto que está principalmente relacionada a pecuária e o maior fornecedor de equídeos no país é o Rio Grande do Sul, sendo a raça Crioula a principal criada na região, se tornando dessa forma muito importante para a economia do estado (MATTOS, 2010). Uma característica muito valorizada na criação de cavalos, além de características de aptidão, são também características estéticas como a pelagem, que na raça Crioula apresenta uma grande variedade podendo ser de capas sólidas ou compostas, como as pelagens manchadas (ABCCC, 2013). Essas características fenotípicas são normalmente selecionadas pela preferência do criador, mas estão muitas vezes ligadas a outros aspectos, como por exemplo, relacionadas a doenças genéticas como é o caso da pelagem manchada oveira que ocorre por alterações no desenvolvimento de melanócitos e já foi descrita em outros artigos como estando associada à Síndrome Letal do Potro Branco em equinos da raça *Paint Horse* ocasionada por mutações no gene EDNRB, porém esta pelagem na raça Crioula ainda não foi caracterizada molecularmente (METALLINOS, 1998; HAUSWIRTH, 2012) se tornando importante a análise de genes associados a essa pelagem para se compreender melhor a genética da raça.

O padrão de herança da pelagem oveira não é claramente definido, pois existem variações dessa pelagem apresentando manchas brancas irregulares características que são geneticamente diferentes, porém não é possível fazer a distinção apenas pelos fenótipos, dessa forma todos os animais são registrados em uma única categoria e dentro desse grupo existem diferentes classificações, por exemplo, “*frame overo*” que seria o padrão clássico da pelagem oveira apresentando manchas predominantemente localizadas nas partes laterais e ventrais do corpo e que não cruzam o dorso do animal e o padrão de pelagem mais comum encontrado na raça Crioula, classificado como oveiro é onde o animal apresenta as quatro patas brancas e a cabeça branca e partes brancas pelo corpo (METALLINOS, 1998; THIRUVENKADAN, 2008). Para facilitar o estudo dessas variações da pelagem oveira elas foram agrupadas no grupo dos “Sabinos” juntamente com a pelagem “Bragada” (SPONENBERG, 2009), a qual o animal apresenta patas brancas e manchas brancas na barriga e com isso foi possível analisar geneticamente esses

padrões de manchas testando as variações nos genes candidatos EDNRB e MITF que estão descritas na literatura e são, respectivamente, uma mutação no primeiro *exon* do gene EDNRB onde há alteração dos nucleotídeos TC>AG e duas variações no gene MITF sendo uma a troca da base Timina pela inserção de 11 pares de bases no promotor do gene, além de uma mutação *missense* T>C no *exon* seis (METALLINOS, 1998; SANTOSCHI, 1998; HAUSWIRTH, 2012).

Apesar de a nomenclatura ovejira ser utilizada na raça Crioula, nos animais estudados não foi encontrado o tipo “*frame overo*” e sim outras variações dessa pelagem, como descrito anteriormente e a Síndrome Letal do Potro Branco também não ocorreu nesta população mesmo que os animais tenham sido criados juntos e a possível homozigose para o gene responsável pelo “ovejirismo” ocorresse, mostrando ser muito provável que o controle genético para estes fenótipos de pelagens não é o mesmo embora elas sejam semelhantes e para confirmar esta hipótese foi realizada análises dos genes EDNRB e MITF a partir do alinhamento das amostras, porém não foram encontradas as mutações investigadas, como é possível observar nas figuras 13, 14 e 15, provavelmente porque para essa raça em questão o padrão de manchas estudado seja diferente do relatado em outras raças e é possível que haja uma classificação errônea destes animais quanto à pelagem, se fazendo necessário uma investigação mais aprofundada afim de encontrar o genótipo que explique estas variações e assim poder classificar corretamente os animais em um grupo adequado. Não é possível descartar estes genes como responsáveis pelas variações encontradas, pois mutações em outras posições poderiam ocorrer e explicar os fenótipos semelhantes dessas pelagens, por isso foi proposta a investigação total do gene EDNRB, que é o principal gene candidato para esse padrão de manchas nos animais ovejiros e a análise geral da região promotora do gene MITF, bem como a procura de mutações dentro da região do *exon* seis que poderiam estar relacionadas não somente com a pelagem ovejira, mas também com padrões diferentes de manchas no corpo que se assemelham com as dos equinos estudados.

Foi realizada análise de comparação de tamanho dos fragmentos dos *introns* do gene EDNRB de um animal ovejiro e outro não ovejiro, pois foi descrito por Brooks & Bailey, (2005) que mutações em regiões intrônicas poderiam estar relacionadas com mudança na fase de leitura e alterar o *splicing* do gene e consequentemente

acarretar em uma proteína defeituosa, porém não foi encontrada variação nesta região, pois os fragmentos apresentaram o mesmo padrão de tamanho de bandas (Figuras 8 e 9). Utilizando a ferramenta BLASTn foi possível comparar os genes sequenciados dos cavalos da raça Crioula com o genoma que foi depositado no banco de dados do NCBI de um equino da raça Puro-sangue Inglês e a partir dessa análise foram encontradas pequenas alterações que estavam presentes nos cavalos Crioulos e que não apareciam no PSI (Figuras 16, 17 e 18) e puderam ser confirmadas a partir da análise dos eletroferogramas do sequenciamento. Sendo assim, é possível mostrar que há diferenças entre as raças em relação a estes genes estudados, mas que não explicam os fenótipos das pelagens manchadas, pois através do alinhamento das amostras foi observado que essas mutações se encontravam tanto em animais manchados quanto em não manchados, além disso, pode-se concluir que o cavalo Crioulo apresenta mutações não descritas em outras raças que causam manchas brancas na pelagem.

7 CONCLUSÃO

Apesar de variantes nos genes MITF e EDNRB estarem relacionadas ao fenótipo de pelagens manchadas, como a pelagem oqueira, eles não foram suficientes para diferenciar os diferentes padrões encontrados da raça Crioula. Podendo concluir que o padrão genético da pelagem oqueira encontrado nesta raça é diferente do relatado na literatura e ainda não foi possível confirmar o gene ou mutação que está diretamente ligada a esse padrão de manchas. Portanto são necessários mais estudos nesta área utilizando um número maior de animais para as análises a fim de identificar se os fenótipos de manchas encontradas estão relacionados a polimorfismos em outros genes ou em outras regiões ainda não investigadas dos mesmos genes já indicados no presente trabalho e assim contribuir para agregar conhecimentos sobre a raça Crioula.

Referências

ABCCC – Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos. Disponível Em: <<http://www.racacrioula.com.br/site/content/home/index.php>> Acesso em: 20 de setembro de 2013a.

ABCCC - Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos. Manual do criador da raça Crioula. ABCCC, Pelotas, p. 43, 2013b.

AFFYMETRIX® - Disponível em: <<http://www.affymetrix.com>> Acesso em: 11 de novembro de 2013

ANDO, H.; KONDOH, H.; ICHIHASHI, M.; HEARING, V.J.. Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p.751-761, 2007.

AXYGEN® - Disponível em: <<http://axygen.com.br>> Acesso em: 11 de novembro de 2013.

BARBOSA, M. Identificação Equina: Implementação do Regulamento (CE) nº504/2008 de 6 de Junho. **Jornal Oficial da União Europeia**, Portugal, 2011.

BARSH, G. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. **Trends in Genetics**. v. 12, p.299–305, 1996.

BAUER, G.L.; PRAETORIUS, C.; BERGSTEINSDÓTTIR, K.; HALLSSON, J.H.; GÍSLADÓTTIR, B.K.; SCHEPSKY, A.; SWING, D.A.; O’SULLIVAN, T.N.; ARNHEITER, H.; BISMUTH, K.; DEBBACHE, J.; FLERCHER, C.; WARMING, S.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; STEINGRÍMSSON, E. The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue. **Genetics**, v. 183, n. 2, p.581–94, 2009.

BAYNASH, A.G.; HOSODA, K.; GIAID, A.; RICHARDSON, J.A.; EMOTO, N.; HAMMER, R.E.; YANAGISAWA, M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. **Cell**, v. 79, n. 7, p.1277–85, 1994.

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 Cellular Biology**, v. 18, p.694 – 702, 1998.

BONDURAND, N.; PINGAULT, V.; GOERICH, D.E.; LEMORT, N.; SOCK, E.; LE CAIGNEC, C.; WEGNER, M.; GOOSSENS, M. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p.1907–1917, 2000.

BOWLING, A & RUVINSKY, A. Genetics aspects of domestication, breeds and their origins. In: Bowling, A. & Ruvinsky, A. (eds.) The genetics of the horse. California. **CABI Publishing**, p.25-51, 2000.

BOWLING, A. Equine linkage group II: phase conservation of To with AIB and GcS. **Journal of Heredity**, v. 78, p.248–250, 1987.

BOWLING, A.T. Dominant inheritance of overo spotting in Paint horses. **Journal of Heredity**, v. 85, p.222–224, 1994.

BOWLING, A.T. Horse Genetics. **CAB International Wallingford**, United Kingdom, 1996.

BRAGA, R. Cavalo Lavradeiro em Roraima. Aspectos históricos, ecológicos e de conservação. **EMBRAPA comunicação para transferência de tecnologia**, Brasília, p.119, 2000.

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

BUSCA, R.; BALLOTTI, R. Review: Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. **Pigment Cell Research**. v. 13, p.60-69, 2000.

COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A. Testes genéticos na equideocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p.202-205, 2008.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB Journal**, v. 21, p.976-94, 2007.

DRING, L.A.; HINTZ, H.F.; VAN VLECK, L.D. Coat colour and gestation length in Thoroughbred mares. **Journal of Heredity**, v. 72, p.65–66, 1981.

EBERLE, A.N. In *The Melanotropins. Chemistry, Physiology and Mechanism of Action*. **Karger Press**, p.556, Basel, Switzerland, 1988.

ERICKON, C.A. From the crest to the periphery: Control of pigment cell migration and lineage segregation. **Pigment Cell Research**, v. 6, p.336-347, 1993.

FAO - Food And Agriculture Organization of the United Nations, 2003. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>> Acesso em: 20 de dezembro de 2013.

FINNO, C.J.; SPIER, S.J.; VALBERG, S.J. Equine diseases caused by known genetic mutations. **The Veterinary Journal**, v. 179, p.336-347, 2009.

FUSE, N.; YASUMOTO, K.; SUZUKI, H.; TAKAHASHI, K.; SHIBAHARA, S. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, p.702–707, 1996.

GIACOMONI, E.H. Estudo da variabilidade genética em quatro raças brasileiras de cavalos (*Equus Caballus* – *Equidae*) utilizando marcadores microssatélites. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Porto Alegre-RS, p.96, 2007.

GUERIN, G.; BAILEY, E.; BERNOCO, D.; ANDERSON, I.; ANTCZAK, D.F.; BELL, K.; BINNS, M.M.; BOWLING, A.T.; BRANDON, R.; CHOLEWINSKI, G.; COTHRAN, E.G.; ELLEGREN, H.; FORSTER, M.; GODARD, S.; HORIN, P.; KETCHUM, M.; LINDGREN, G.; McPARTLAN, H.; MERIAUX, J-C.; MICKELSON, J.R.; MILLON, L.V.; MURRAY, J.; NEAU, A.; ROED, K.; SANDBERG, K.; SHIUE, Y-L.; SKOW, L.C. et al. Report of the Internacional Equine Gene Mapping Workshop: male linkage map. **Animal Genetics**, v. 30, p.341-354, 1999.

HAASE, B.; BROOKS, S.A.; TOZAKI, T.; BURGER, D.; PONCET, P.-A.; RIEDER, S.; HASEGAWA, T.; PENEDO, C.; LEEB, T. Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. **Animal Genetics**, v. 40, p.623-629, 2009.

HALLSSON, J.H.; HAFLIDADO´TTIR, B.S.; SCHEPSKY, A.; ARNHEITER, H.; STEINGRÍMSSON, E. Evolutionary sequence comparison of the *Mitf* gene reveals novel conserved domains. **Pigment Cell Research**, v. 20, p.185–200, 2007.

HAUSWIRTH, R.; HAASE, B.; BLATTER, M.; BROOKS, S.A.; BURGER, D.; DRÖGEMÜLLER, C.; GERBER, V.; HENKE, D.; JANDA, J.; JUDE, R.; MAGDESIAN, K.G.; MATTHEWS, J.M.; PONCET, P.-A.; SVANSSON, V.; TOZAKI, T.; WILKINSON-WHITE, L.; PENEDO, M.C.T.; RIEDER, S.; LEEB, T. Mutations in *MITF* and *PAX3* Cause “Splashed White” and other White Spotting. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 4, p.9, 2012.

HENNER, J.; PONCET, P.-A.; GUERIN, G.; HAGGER, C.; STRANZINGER, G.; RIEDER, S. Genetic mapping of the (G)-locus, responsible for the coat color phenotype “progressive greying with age” in horses (*Equus caballus*). **Mammalian Genome**, v.13, p.535–537, 2002.

HODGKINSON, C.A.; MOORE, K.J.; NAKAYAMA, A.; STEINGRÍMSSON, E.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; ARNHEITER, H.; Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. **Cell press**, v. 74, p.395-404, 1993.

HOOGDUIJN, M.J.; CEMELI, E.; ROSS, K.; ANDERSON, D.; THODY, A.J.; WOOD, J.M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, v. 294, n. 1, p.60-67, 2004.

HOSODA, K.; HAMMER, R.E.; RICHARDSON, J.A; BAYNASH, A.G.; CHEUNG, J.C.; GIAID, A.; YANAGISAWA, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. **Cell**, v. 79, n. 7, p.1267–76, 1994.

HOU, L.; PAVAN, W.J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to *Mitf*? **Cell research**, v. 18, n.12, p.1163–76, 2008.

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

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

LE DOUARIN, N.M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, p.4637–4650, 2004.

LEE, J.; KIM, Y.S.; PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 7, p.960-968, 2007.

LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D.E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p.406–14, 2006.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP, p.251, Piracicaba –SP, 2006.

LIN, J.Y. & FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 22, p.8, 2007.

LINDERHOLM, A.; LARSON, G. Review: The role of humans in facilitating and sustaining coat colour variation in domestic animals. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, p.587-593, 2013.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 20 de setembro de 2013.

MARKLUND, L.; MOLLER, M.L.; SANDBERG, K.; ANDERSON, 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.895–899, 1996.

MATTOS, P.; RODRIGUES, T.G.; CELIA, A.P.; SAGGIN, K.D.; PADILHA, A.C.M. O perfil empreendedor do criador de cavalo Crioulo no estado do Rio Grande do Sul. **48º congresso SOBER**: Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, Campo Grande-MS, 2010.

METALLINOS, A.T.; BOWLING, D.L.; RINE, J. 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.Á.; TAVARES, R.A.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; COSTA, M.A.P.; DUVAL, L.H., FREITAS, T.R.O. Supressão parcial do exon 17 do gene Kit associado com marcas Sabino em animais da raça Crioula. **MPU**, v.9, p.3–4, 2010.

MURAKAMI, M.; IWATA, Y.; FUNABA, M. Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 303, n.1-2, p.251–7, 2007.

NESIO, R.S.; RODRIGUES, C.B.; REZENDE, A.S.C.; COSTA, M.D. Análise genética das pelagens dos cavalos registrados na Associação Brasileira dos criadores do cavalo Pampa. **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, Pirassununga-SP, 2004.

NORDLUND JJ. The lives of pigmented cells. **Dermatologic Clinics**, v. 4, n. 3, p.407-418, 1986.

OLIVEIRA, K.B. Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Curitiba-PR, p.134, 2010.

PARK, H.Y.; PONGPUDPUNTH, M.; LEE, J.; YAAR, M. Biology of Melanocytes. In: WOLFF, K.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFEL, D.J. editors. **FITZPATRICK'S. Dermatology in General Medicine**. McGraw Hill: New York; p.591-608, 2007.

PARK, H.Y.; PONGPUDPUNTH, M.; LEE, J.; YAAR, M. Disorders of melanocytes. In: WOLFF, K.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFELL, D.J. Fitzpatrick's. **Dermatology in General Medicine**, 7^a ed. New York: Mc Graw Hill Medical, p.591- 608, 2008.

PONS, D.S. O Cavalo Crioulo: Seis décadas de experiência. **Livraria e Editora Agropecuária**, ed.: Guaíba, p.141, 1993.

PRICE, E.R.; FISHER, D.E. Sensorineural deafness and pigmentation genes: melanocytes and the Mitf transcriptional network. **Neuron**, v.30, p.15–18, 2001.

PUFFENBERGER, E.G.; HOSODA, K.; WASHINGTON, S.S.; NAKAO, K.; DEWIT, D.; YANAGISAWA, M.; CHAKRAVARTI, A. A missense mutation of the endothelin-B

receptor gene in multigenic hirschsprung's disease. **Cell**, v. 79, n. 7, p.1257–1266, 1994.

ROBINS, A.H. Biological Perspective on Human Pigmentation. **Cambridge University Press**, Cambridge, United Kingdom. 1991.

SANTSCHI, E.M.; PURDY, A.K.; VALBERG, S.J.; VROTSOS, L.P.D.; KAESE, L.H.; MICKELSON, J.R. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. **Mammalian Genome** v. 9, p.306-309, 1998.

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

SILVEIRA, J.E.P.S. Avaliação dos efeitos in vitro de espécies vegetais como potenciais ativos despigmentantes. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Botucatu-SP, p.99, 2007.

SOLANO, F.; BRIGANTI, S.; PICARDO, M.; GHANEM, G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**, v. 19, supl. 6, p.550-571, 2006.

SPONENBERG, D.P. Equine Coat Color Genetics. **Iowa State University Press**, Ames, 1996.

SPONENBERG, D.P. Equine color genetics. **3rd edition**. Ames: Wiley-Blackwell, p.277, 2009.

STACHURSKA, A.; PIETA, M.; LOJEK, J.; SZULOWSKA, J. Performance in racehorses of various colours. **Livestock Production Science**, v. 106, p.282–286, 2006.

STEINGRIMSSON, E.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. **Annual Review Genetics**, v. 38, p.365–411, 2004.

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

TORRES, A. & JARDIM, W. Criação do cavalo e de outros equinos. **Editora Nobel**, São Paulo, p.654, 1992.

TSATMALI, M.; ANCANS, J.; THODY, A.J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, p.125-33, 2002.

VANCE, K.W.; GODING, C.R. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 17, p.318-325, 2004.

VIDEIRA, I.F.S.; MOURA, D.F.L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 1. p.76-83, 2013.

VROTSOS, P.D.; SANTSCHI, E.M.; MICKELSON, J.R. The Impact of the Mutation Causing Overo Lethal White Syndrome on White Patterning in Horses. **Equine Pediatric Medicine**, v. 47, p.385–391, 2001.