POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS E DE DNA
EM EQUINOS (*Equus caballus*)

LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1991

POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS E DE DNA
EM EQUINOS (*Equus caballus*)

LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO
Médica Veterinária

Orientador: PROF. DR. RANDOLFO W. S. CUSTÓDIO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Genética e Melhora-
mento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

R337p Regitano, Luciana Correia de Almeida
 Polímorfismo de proteínas e de DNA em eqüinos
 (Equus caballus). Piracicaba, 1991.
 74p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Eqüino - Melhoramento 2. Polímorfismo de DNA
em Eqüino 3. Polímorfismo de proteína em eqüino 1.
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 636.1082

POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS E DE DNA
EM EQUINOS (*Equus caballus*)

LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Aprovada em: 11.12.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Randolph W. S. Custódio

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gerhard Bandel

ESALQ/USP

Prof. Dr. Raul Machado Neto

ESALQ/USP

Prof. Dr. Randolph W. S. Custódio
Orientador

Aos meus pais, Pedro e Dulce,

Ao meu marido, Amadeu,

Ao meu filho, André

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Randolph W. S. Custódio, pela orientação recebida;

Ao Prof. Dr. Flávio C. A. Tavares, pela cessão das instalações de laboratório e facilidades concedidas;

Ao Prof. Dr. Yousef Haj-Ahmad, pela orientação e amizade;

Ao Prof. Dr. Roberto T. Losito de Carvalho, pela oportunidade oferecida;

Ao Sr. Luiz A. Chacon de Freitas, pela concessão dos animais Mangalarga Marchador e apoio financeiro;

Ao Engo. Agrônomo Amadeu Regitano Neto, pela dedicação e amizade;

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade de treinamento a nível de pós-graduação;

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Brock University, Canadá, pelas facilidades concedidas;

Aos Funcionários e colegas do Laboratório de Genética de Leveduras;

Aos Srs. Antonio Regitano e Maria Ap. B. Regitano, pelo apoio recebido;

À CAPES,

Agradeço

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Marcadores Bioquímicos	4
2.1.1. Considerações Gerais	4
2.1.2. Polimorfismo da Albumina	8
2.1.3. Polimorfismo da Esterase do Soro	10
2.1.4. Sistema 6-fosfogluconato desidro genase	11
2.1.5. Sistema fosfohexose-isomerase	11
2.2. Polimorfismo de restrição do DNA	12
2.3. A raça Mangalarga Marchador	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.1.1. Animais	16
3.1.2. Soluções para coleta e conservação de sangue	17
3.1.2.1. Solução de Glicerol	17
3.1.2.2 Solução de anticoagulante	17
3.1.2.3. Solução salina	17
3.1.3. Soluções para eletroforese	17
3.1.3.1. Tampão Acetato pH 5,4	17
3.1.3.2 Tampão Fosfato pH 7,2	17
3.1.3.3 Tampão Tris-acetato	18
3.1.3.4. Tampão da amostra	18
3.1.4. Soluções para coloração de proteínas .	18
3.1.4.1. Solução de amido black	18

	Página
3.1.4.2 Solução de descoloração	18
3.1.5. Soluções para coloração de enzimas ...	18
3.1.5.1. Tampão Maleato pH 6,5	18
3.1.5.2. Tris 0,3M pH 8,0	19
3.1.6. Soluções para preparação de DNA genômico	19
3.1.6.1. Solução de hemólise	19
3.1.6.2. Tampão de lise	19
3.1.6.3. Solução de Pronase	19
3.1.6.4. Tampão TE	20
3.1.7. Soluções e meios de cultura para crescimento, transformação e seleção de bactérias	20
3.1.7.1. Tampão de transformação	20
3.1.7.2. Luria Broth líquido	20
3.1.7.3. Luria Broth ágar	20
3.1.7.4. Meio Seletivo	20
3.1.7.5. Solução de x-gal	21
3.1.7.6. Meio S.O.C.	21
3.1.8. Soluções para isolamento de DNA plasmidial	21
3.1.8.1. Solução de lisozima	21
3.1.8.2. Acetato de sódio 3M.	22
3.1.8.3. Solução de SDS alcalino	22
3.1.9. Soluções para Southern Blot	22
3.1.9.1. Solução desnaturante	22
3.1.9.2. Solução Neutralizante	22
3.1.9.3. 20 X SSC.	23
3.1.10 Soluções de hibridização	23
3.1.10.1. Solução de pré-hibridização A	23
3.1.10.2. Solução de hibridização A ..	23

	Página
3.1.10.3. Solução de pré-hibridização	
B	23
3.1.10.4. Solução de hibridização B ..	24
3.1.10.5. Solução de hibridização C ..	24
3.1.10.6. Soluções-estoque para as	
soluções de hibridização ...	24
3.1.10.6.1. Solução de	
Denhardt 50 X	
Concentrada	24
3.1.10.6.2. DNA de espermato	
de salmão	
(ssp DNA) ...	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Coleta de Sangue	25
3.2.2. Hidrólise de amido	25
3.2.3. Métodos eletroforéticos para pro -	
teínas	26
3.2.3.1. Albumina e esterase	26
3.2.3.2. Fosfohexose-isomerase e 6-fos	
fogluconato desidrogenase ...	27
3.2.4. Isolamento de DNA genômico	29
3.2.5. Digestão enzimática do DNA	31
3.2.6. Separação dos fragmentos de DNA	31
3.2.7. Southern blots	32
3.2.8. Obtenção e seleção de sondas	
moleculares	33
3.2.8.1. Construção do banco de	
DNA genômico	33
3.2.8.2. Transformação de bactérias ..	34
3.2.8.3. Isolamento de DNA plasmí-	
dial	35
3.2.9. Métodos de hibridização	37

	Página
3.2.9.1. Método de hibridização a 45°C	38
3.2.9.2. Método de hibridização a 65°C	39
3.2.9.3. Método de hibridização a 68°C	39
3.2.10 Ensaio de comparação de métodos de hibridização	40
3.2.11 Ensaio de comparação da qualidade de membranas	40
3.2.12 Métodos estatísticos	41
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Polimorfismo bioquímico	42
4.1.1. Polimorfismo da Albumina	42
4.1.2. Polimorfismo da Esterase	45
4.1.3. Sistemas eritrocitários	48
4.2. Polimorfismo de restrição do DNA	49
4.2.1. Obtenção de sondas	49
4.2.2. Avaliação dos métodos de hibridização	50
4.2.3. Comparação da eficiência das membranas de hibridização	52
4.2.4. Análise de RFLPs	55
5.CONCLUSÕES	62
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
I	Herança dos alelos de albumina	44
II	Distribuição observada e esperada dos genótipos de albumina na geração parental e respectivas frequências gênicas	45
III	Distribuição dos fenótipos de esterase na geração parental e respectivas frequências gênicas	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Zimograma da albumina em pH 5,4 (presente trabalho).....	43
2 Diagrama dos fenótipos de esterase em pH 5,4 e pH 8,5	46
3 Zimograma dos fenótipos de esterase em pH 5,4	47
4 Comparação de dois métodos de hibridização	51
5 Comparação da capacidade de retenção de DNA em três membranas de nylon.....	54
6 Padrão de restrição de nove amostras de DNA digeridas com <i>HindIII</i> e hibridizadas com a sonda pESs	57
7 Padrão de restrição detectado pela sonda pESs em nove amostras de DNA digeridas com <i>EcoRI</i>	59

POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS E DE DNA
EM EQUINOS (*Equus caballus*)

Autor: LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO
Orientador: PROF. DR. RANDOLFO W. S. CUSTÓDIO

R E S U M O

Com o objetivo de avaliar o polimorfismo de alguns marcadores genéticos detectáveis no sangue de equino (*Equus caballus*) foram estudados, no presente trabalho, os sistemas: albumina e esterase do soro; 6-fosfogluconato-desidrogenase (PGD) e fosfohexose-isomerase (PHI) dos eritrócitos; e o padrão de restrição do DNA (RFLP) para sondas de seqüências ao acaso de DNA genômico de equinos.

A amostra foi constituída de 9 famílias completas e 4 famílias incompletas (mãe e progênie) de equinos Mangalarga Marchador, provenientes de uma criação localizada em São Sebastião do Paraíso (MG),totalizando 27 animais. Uma família de pôneis da raça Shetland foi incluída nas análises de DNA.

A determinação dos fenótipos de albumina e esterase foi feita por eletroforese em gel de amido a pH 5,4.

Três fenótipos de albumina foram observados, sendo eles controlados por dois alelos codominantes, Al^A e Al^B , com frequências de 0,54 e 0,46, respectivamente para este estudo.

O locus Es da esterase também apresentou dois alelos codominantes, F e I, com frequências de 0,42 e 0,58, respectivamente.

Apesar do reduzido tamanho da amostra, 12 animais na geração parental, a população se encontrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg para esses dois loci.

Os dois sistemas eritrocitários estudados, PGD e PHI, mostraram-se monomórficos em eletroforese em gel de amido a pH 7,2.

Para o estudo de RFLP foram utilizadas sondas constituídas de fragmentos ao acaso de DNA de equino, digerido com a enzima *Sau3AI*. Essas sondas foram isoladas de banco de DNA genômico construído no vetor pUC19.

Três métodos de hibridização e três membranas de nylon foram testados com resultados significativamente diferentes na qualidade das hibridizações obtidas.

Uma das sondas testadas, a sonda pES3, detectou a ocorrência de dois RFLPs de 1,9 kb e 1,3 kb para a enzima *HindIII*, e dois RFLPs (4 kb e 3,2 kb) para a enzima *EcoRI*, demonstrando a utilidade das sondas de sequências ao acaso na obtenção de novos marcadores genéticos.

PROTEIN AND DNA POLYMORPHISM IN EQUINES (*Equus caballus*)

Author: LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Adviser: PROF. DR. RANDOLFO W. S. CUSTÓDIO

S U M M A R Y

In order to evaluate the polymorphism of some blood genetic markers in equine (*Equus caballus*), the following systems were studied: serum albumin, serum esterase, red cell 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) and red cell phosphohexose isomerase (PHI) and the restriction fragment lenght poplymorphism (RFLP) for random equine DNA sequence probes.

The sample was composed of 9 complete and 4 incomplete (mother and offspring) horse families of the Mangalarga Marchador breed, from one farm in São Sebastião do Paraíso (Minas Gerais State), in a total of 27 animals. One family of the Shetland pony breed was included in the DNA analysis.

The albumin and esterase phenotypes were determined by starch gel electrophoresis at pH 5.4.

Three albumin phenotypes were found, controlled by two codominant alleles, Al^A and Al^b , with frequencies of 0.54 and 0.46, respectively for this study.

Two codominant alleles were also detected in the esterase locus Es , alleles F and I , with frequencies of 0.42 and 0.58, respectively.

Despite the small sample size, only 12 animals in the parental generation, the population was in Hardy-Weinberg equilibrium for these two loci.

The two red cell systems studied, PGD and PHI, were determined by starch gel electrophoresis at pH 7.2, and showed to be monomorphic in the sample.

For the RFLP study, random sequences of equine DNA *Sau3AI* digests were used as probes. These probes were isolated from genomic DNA library cloned in the vector pUC19.

Three hybridization methods and three nylon membranes were tested. Significant differences in the resulting quality of hybridizations were found among them.

Two RFLPs of 1.9 kb and 1.3 kb for *HindIII* digests, and two others (4 kb and 3.2 kb) for *EcoRI* digests were detected by one of the probes, pES3.

These results indicate the usefulness of random sequence probes in the detection of new genetic markers.

1. INTRODUÇÃO

Existem dificuldades na avaliação e seleção de animais devido a limitações experimentais e ao fato de os caracteres economicamente importantes serem poligênicos.

Apesar do desenvolvimento de métodos de melhoramento para esta finalidade, o tempo despendido na avaliação é muito longo, e a seleção de bons produtos torna-se difícil, assim como a identificação de particularidades genotípicas com a devida antecipação.

O estudo de marcadores genéticos polimórficos tem encontrado ampla aplicação em melhoramento animal, com a avaliação de loci polimórficos correlacionados a caracteres quantitativos, possibilitando simplificar os trabalhos e reduzir o tempo de avaliação experimental dos animais e, também, como método de caracterização de linhagens ou raças.

O desenvolvimento da biotecnologia aplicada à reprodução exige a utilização desses marcadores como instrumento de identificação individual e verificação de parentesco.

Até recentemente, os marcadores genéticos mais estudados eram os sistemas polimórficos de proteínas, também denominados marcadores bioquímicos. O polimorfismo de proteínas é devido a variações da

sequência de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas que resultam em diferenças na carga elétrica das proteínas, de tal modo que, quando submetidas a um campo elétrico, migram com velocidades diferentes.

Esses marcadores apresentam um modo de herança simples, geralmente uma série de alelos codominantes, e influência ambiental muito baixa ou ausente.

Entretanto, a variabilidade genética dos marcadores bioquímicos é limitada, prevalecendo, nos sistemas descritos em animais, a presença de duas formas alélicas.

Uma nova classe de polimorfismo genético tem sido descrita, o polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA (RFLPs), com características bastante favoráveis à análise genética, entre elas, a ausência de dominância, presença de múltiplas formas alélicas, e por se apresentarem distribuídos ao longo de todo o genoma.

O polimorfismo dos fragmentos de restrição ocorre pela troca de bases no DNA, abolindo sítios de restrição ou criando novos sítios para uma enzima em particular.

As deleções ou transposições de longas sequências podem alterar os padrões de restrição de mais de uma enzima simultaneamente.

O grau de polimorfismo pode ser muito elevado em função do número de mutações neutras, ou seja, que não provocam alterações no produto gênico.

Além de sua utilidade como marcadores bioquímicos, o estudo de RFLPs tem conduzido à clonagem de sequências

gênicas específicas, e sua aplicação no diagnóstico de doenças hereditárias, bem como no estudo de evolução molecular.

Muito pouco se sabe sobre o genoma do cavalo Mangalarga Marchador. Devido ao grande crescimento dessa raça nacional, surgiu o interesse de estudá-la geneticamente a fim de se conhecer o grau de polimorfismo, bem como a utilidade desses marcadores em programas de melhoramento.

No presente trabalho as duas classes de marcadores foram estudadas em alguns representantes dessa raça de eqüinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Marcadores Bioquímicos

2.1.1. Considerações Gerais

O estudo do polimorfismo de proteínas tornou-se possível com o desenvolvimento das técnicas de eletroforese de zona na década de 50.

A técnica consiste na separação de moléculas eletricamente carregadas através de um meio suporte, sob a influência de um campo elétrico unidirecional. Sob tais condições, cada íon migra em direção ao polo de carga oposta.

As proteínas são anfólitos, podendo adquirir carga líquida positiva ou negativa segundo o pH do tampão utilizado no meio suporte.

A velocidade de migração é função da carga elétrica líquida da molécula e da filtração molecular, sendo esta dependente do tamanho e conformação da molécula e das dimensões da malha do meio suporte.

Um suporte amplamente utilizado na análise de proteínas plasmáticas é o gel de amido, introduzido por SMITHIES (1955), devido ao tamanho dos poros da malha desse suporte ser semelhante ao tamanho das proteínas em questão.

Através das técnicas de eletroforese, verificou-se a existência de variabilidade genética para diversos sistemas de proteínas. Tal variabilidade é decorrente de pequenas substituições de aminoácidos, causando alteração na carga elétrica líquida das proteínas. Desta forma, apenas um pequeno número de mutações, aquelas que envolvem substituições de aminoácidos de cargas diferentes, resultam na alteração da mobilidade eletroforética.

As alterações de tamanho e conformação, devidas à adição ou deleção de aminoácidos, podem ou não ser detectadas em função da extensão da alteração envolvida.

Entretanto, apesar das limitações desta técnica em detectar variabilidade, o número de sistemas polimórficos descritos em animais é bastante elevado.

Tal número pode ser visualizado no trabalho de revisão de Mc DERMID *et alii* (1975) onde mais de 40 sistemas polimórficos de enzimas, presentes nos eritrócitos de mamíferos e aves, são descritos.

As variantes eletroforéticas de uma proteína são herdadas de maneira mendeliana simples e, de um modo geral, apresentam alelos codominantes, característica essa bastante favorável à análise genética.

Essa classe de marcadores genéticos tem encontrado aplicação em diversas áreas tais como a análise de parentesco (STORMONT & SUZUKI, 1965; CHAKRABORTY *et alii*, 1988) e construção de mapas de ligação.

O trabalho de mapeamento genético em animais de interesse econômico tem sido estimulado pela possibilidade

de aplicação na seleção de caracteres de produção e, especialmente, na seleção contra determinada doença.

Além disso, a construção de mapas de ligação apresenta interesse no aspecto evolutivo, através do estudo comparativo dos grupos de ligação em diferentes escalas da evolução.

O primeiro grupo de ligação autossômico para genes marcadores do cavalo foi descrito por SANDBERG (1974) compreendendo o grupo sanguíneo K e o locus da 6-fosfogluconato-desidrogenase (PGD). A partir de então, outros grupos de ligação têm sido descritos. O grupo de ligação II compreende: a albumina do soro (Al) e o locus tobiano (To) para coloração da pelagem (TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1978); o locus Gc da proteína ligadora de vitamina D (SANDBERG & JUNEJA, 1978; WEITKAMP & ALLEN, 1979); o locus Es da esterase do soro e os loci para coloração da pelagem chestnut (e) e roan (Rn) (ANDERSSON & SANDBERG, 1982); a oxaloacetato-glutamato-transaminase mitocondrial (GOTm) (ANDERSSON *et alii*, 1983b); e o locus da haptoglobina (Hp) (WEITKAMP *et alii*, 1985).

A fosfohexose-isomerase (PHI) encontra-se no grupo de ligação IV junto à proteína XK do soro (ANDERSSON *et alii*, 1983a).

Uma revisão detalhada dos grupos de ligação do cavalo foi realizada por SANDBERG & ANDERSSON (1984).

A associação entre marcadores genéticos e caracteres quantitativos em animais foi intensivamente estudada (BRILES & ALLAN, 1961; NEIMANN-SØRENSEN & ROBERTSON, 1961). A existência de correlação entre um locus

marcador e um caráter quantitativo pode ser resultado, tanto de efeito pleiotrópico, quanto de desequilíbrio de ligação entre o locus marcador e um ou mais loci que afetam o caráter quantitativo. Os exemplos mais importantes de tais correlações em animais de interesse econômico são: a) a associação entre o haplótipo B²¹ do complexo de histocompatibilidade de galinhas e a resistência à doença de Marek (HANSEN *et alii*, 1967; BRILES *et alii*, 1977); b) e, a ligação entre o locus halotano que influencia caracteres produtivos e reprodutivos em suínos, e cinco loci de marcadores bioquímicos (ANDRESEN & JENSEN, 1977; RASMUSEN, 1981).

Em eqüinos existem evidências de correlação entre o locus Es de esterase do soro e a performance em corridas (ANDERSSON *et alii*, 1987). Apesar dos autores terem encontrado uma associação bastante forte entre esses caracteres, a interpretação de tais resultados deve ser cautelosa devido à complexidade do caráter performance. Uma melhor compreensão poderia ser atingida se analisados os fatores envolvidos no caráter e o possível papel fisiológico da esterase.

Os marcadores bioquímicos do sangue também tem sido utilizados na avaliação da variabilidade presente dentro de raças e populações animais, por serem muito mais facilmente definidos do que os caracteres de morfologia, possibilitando o cálculo de parâmetros genéticos como o coeficiente de endogamia, grau de heterozigozidade e estimativas de distâncias genéticas.

Tais parâmetros apresentam especial interesse para o estudo de espécies e sub-espécies selvagens mantidas em coleções fechadas (BOWLING & RYDER, 1987).

A utilização generalizada de técnicas de reprodução como a inseminação artificial e transferência de embriões, prática particularmente comum à criação de bovinos, tem contribuído para a formação de sub raças dentro das raças existentes (BOUQUET *et alii*, 1987).

A diferenciação genética entre sub-populações geográficas de raças de cavalos pode ser visualizada no trabalho de PODLIACHOUK *et alii* (1975).

COTHRAN *et alii* (1987), estudando a semelhança genética entre cavalos de trote e cavalos marchadores, dentro da raça American Standardbred, encontraram grau de semelhança comparável ao observado entre duas raças, apesar de os dois tipos de andadura serem admitidos dentro da raça American Standardbred.

BOWLING & CLARK (1985) avaliaram a estrutura e inter-relações de sete raças de cavalos mantidas nos Estados Unidos através de sistemas polimórficos de proteínas.

Estimativas de frequências gênicas para esses marcadores, em diversas raças e populações de cavalos, são encontradas na literatura (PODLIACHOUK *et alii*, 1975; KAMINSKI *et alii*, 1976).

2.1.2. Polimorfismo da Albumina

A albumina constitui um dos principais componentes protéicos do plasma de um animal adulto, sendo sintetizada no fígado. É uma proteína globular com peso molecular entre 65.000 e 70.000 daltons, constituída de uma única cadeia polipeptídica. Suas funções fisiológicas incluem o

transporte de pequenas moléculas através do plasma e a manutenção da pressão osmótica nos capilares (MONTGOMERY *et alii*,1983).

O polimorfismo da albumina do soro de eqüinos foi inicialmente descrito por STORMONT & SUZUKI (1963). Três fenótipos foram observados por esses autores, fenótipos A, AB e B, controlados por um par de alelos codominantes denominados a^A e a^B .

Em 1965, BRAEND & EFREMOV confirmam a existência dos dois alelos de albumina e sugerem a nomenclatura Al^F e Al^S .

Um terceiro alelo codominante, alelo I, de distribuição rara, foi observado por SANDBERG (1972) na raça Swedish Trotter. Não existem referências à existência de alelo nulo, ou seja, que determine a ausência de produção de albumina em eqüinos.

A nomenclatura adotada internacionalmente para as duas variantes principais da albumina é Al-A e Al-B, e o método de referência para determinação destas é o método de GAHNE (1966).

Estudos de segregação demonstraram a ocorrência de desvios da segregação 1:1 para os alelos de albumina em determinadas raças de eqüinos (BOWLING & CLARK, 1988). O excesso de heterozigotos observado entre os produtos do sexo masculino de cruzamentos Al-AB (σ^7) X Al-A (f^{f}) pode ser explicado pela ocorrência de genes determinando morte fetal em estágios iniciais do desenvolvimento, localizados em segmentos cromossômicos adjacentes. O efeito

diferencial de acordo com o sexo tem sido relatado em algumas síndromes humanas.

Considera-se pouco provável que a ocorrência de desvios de segregação seja resultante da ação direta dos alelos de albumina, uma vez que tais desvios foram observados em linhagens paternas específicas, restringindo-se a uma raça de eqüinos - a American Standardbred.

Distorções na transmissão de genes marcadores foram também observadas por WEITKAMP *et alii* (1988).

2.1.3. Polimorfismo da Esterase do Soro

As esterases representam uma população de enzimas bastante heterogênea, cuja característica comum é a capacidade de hidrolisar ésteres orgânicos.

Múltiplas zonas de atividade de esterase foram demonstradas no plasma de eqüinos (KAMINSKI & GAJOS, 1964; OKI *et alii*, 1964).

A primeira referência à ocorrência de variações individuais de esterase em cavalos foi o trabalho de GAHNE (1966).

Esse autor identificou 4 alelos no locus Es de carboxilesterase (E.C. 3.1.1.1.) sendo 3 alelos codominantes, alelos F, I e S, e um alelo recessivo, alelo O, determinando ausência de atividade enzimática.

Em 1972, SCOTT descreve a ocorrência de mais dois alelos denominados G e H. Encontram-se descritos em

literatura 11 alelos para o locus Es (OURAGH, 1987) sendo este o segundo sistema mais polimórfico de marcadores bioquímicos do sangue do cavalo, junto à transferrina sérica que também apresenta 11 alelos descritos.

2.1.4. Sistema 6 - Fosfogluconato - desidrogenase (PGD)

A enzima 6 - fosfogluconato - desidrogenase (EC 1.1.1.44) cataliza a descarboxilação oxidativa da molécula 6 - fosfogluconato a ribulose - 6 - fosfato. É uma enzima dimérica apresentando o padrão característico de 3 bandas no heterozigoto.

O polimorfismo de PGD tem sido descrito em humanos (FILDES & PARR, 1963), suínos (SAISON & GIBLET, 1969) e cavalos (OP'T HOF & OSTERHOFF, 1973), assim como em algumas outras espécies domésticas e selvagens. Em bovinos e ovinos a enzima tem se mostrado monomórfica.

A variação no locus da PGD é controlada por alelos autossômicos codominantes em todas as espécies estudadas, à exceção de *Drosophila melanogaster*, na qual o locus para PGD se encontra no cromossomo X (YOUNG, 1966).

Em eqüinos são conhecidos 3 alelos, D, F e S, sendo o alelo F predominante nas raças estudadas (SANDBERG & BENGTSSON, 1972; OP'T HOF & OSTERHOFF, 1973).

2.1.5. Sistema Fosfohexose - isomerase (PHI)

A enzima fosfohexose-isomerase (EC 5.3.1.9), também denominada fosfoglucoase-isomerase (PGI) e glucose-fosfato-isomerase (GPI), que cataliza a conversão reversível da glucose-6-fosfato a frutose-6-fosfato, é uma enzima dimérica.

A ocorrência de polimorfismo genético para esta enzima em eqüinos foi inicialmente descrita por SANDBERG (1973) e BENGTSSON & SANDBERG (1973). Os seis fenótipos encontrados por esses autores são controlados por 3 alelos codominantes, Phi^F , Phi^I , Phi^S , sendo o alelo Phi^I o de maior frequência nas raças estudadas. BOWLING & WICTUM (1988) apresentam evidências de um quarto alelo, de taxa de migração intermediária aos alelos S e I, denominado alelo L.

2.2. Polimorfismo de restrição do DNA

O primeiro passo para a análise de restrição do DNA foi a descoberta das endonucleases de restrição (ARBER, 1965). Essas enzimas fazem parte do sistema de restrição - modificação dos organismos procariotos, onde o DNA da célula é marcado com metilações específicas, através da ação das metilases. Tais metilações protegem o DNA da ação das endonucleases, que clivam a molécula quando esta não apresenta as metilações específicas. Esse mecanismo protege a célula contra a invasão de DNA exógeno.

Entretanto, apesar de todas as endonucleases de restrição reconhecerem sequências específicas de DNA, a clivagem pode se dar em pontos específicos ou ao acaso. Somente com a descoberta de um grupo de enzimas capaz de clivar o DNA em sítios específicos, denominado classe II das endonucleases de restrição, a análise de restrição do DNA tornou-se possível (KELLY & SMITH, 1970; SMITH & WILCOX, 1970).

Estudos subseqüentes revelaram a existência de importante polimorfismo no padrão de restrição do DNA,

denominado polimorfismo de fragmentos de restrição ou RFLPs.

A primeira referência ao uso de RFLPs como instrumento de análise genética data de 1974, com os trabalhos de GRODZICKER *et alii* sobre a identificação de mutações temperatura - sensíveis em adenovírus.

A partir dessa data, diferentes métodos foram desenvolvidos para o estudo de RFLPs como uma nova classe de marcadores genéticos (SOLOMON & BODMER, 1979; BISHOP & SKOLNICK, 1980).

Os princípios básicos utilizados no estudo do polimorfismo de restrição (RFLPs) são: clivagem do DNA com enzimas de restrição, e hibridização dos fragmentos obtidos com sondas moleculares adequadas.

O número de cortes efetuados por uma determinada enzima é função do número de sítios de reconhecimento presentes ao longo da molécula de DNA.

Os fragmentos de DNA assim formados podem ser separados através de eletroforese em gel de agarose, uma vez que os fragmentos menores migram mais rapidamente através dos poros do gel do que os fragmentos maiores. Esses fragmentos são transferidos para filtro de nitrocelulose (SOUTHERN, 1975) e, mais recentemente, para membranas de nylon, e revelados com o auxílio de uma sonda marcada com isótopos radiativos ^{32}P ou com substâncias cromogênicas.

As sondas podem ser constituídas de sequências codificadoras (genes), de grande utilidade em medicina no

diagnóstico pré-natal de doenças hereditárias (GIANNI *et alli*, 1983; JEFFREYS, 1986) e para a construção de mapas de ligação (BECKMANN & SOLLER, 1983; BURR *et alli*, 1983).

Pode-se também utilizar sequências de genoma ao acaso. Nessa situação, os fragmentos revelados pela sonda não representam necessariamente genes.

O polimorfismo dos fragmentos de restrição ocorre pela troca de bases no DNA, abolindo ou criando novos sítios para uma enzima particular.

As deleções ou transposições de longas sequências podem alterar os padrões de restrição de mais de uma enzima simultaneamente.

O grau de polimorfismo pode ser muito elevado em função do número de mutações neutras, ou seja, que não provocam alterações no produto gênico.

A análise de RFLPs visando estudos de paternidade necessita de sondas que permitam revelar um grande número de fragmentos. Tais sondas puderam ser construídas a partir da descoberta da maior causa de polimorfismo do DNA: as sequências "minissatélites".

Tais sequências caracterizam-se por repetições em "tandem" de uma pequena sequência de bases, e constituem introns distribuídos pelo genoma de animais (PETIT & AUDEVAL - GERARD, 1988).

O alto grau de polimorfismo, também conhecido como DNA hiper-variável, é originado por alterações alélicas do número de repetições, como resultado do deslocamento do

DNA durante a replicação, e/ou permuta desigual.

Segundo JEFFREYS (1986) a sequência "core" do DNA minissatélite pode funcionar como sinal de recombinação. Tal afirmação encontra sustentação na semelhança dessa sequência com outros conhecidos "hotspots" de recombinação, o do gene $E\beta$ Classe II do complexo de histocompatibilidade de camundongos (STEINMETZ *et alii*, 1986) e a sequência Chi de *E.coli* (SMITH *et alii*, 1981).

Devido ao grau de polimorfismo, os padrões de DNA obtidos com sondas de sequências minissatélite são praticamente indivíduos-específicos (JEFFREYS *et alii*, 1985).

2.3. A raça Mangalarga Marchador

A raça de eqüinos Mangalarga Marchador surgiu no sul do estado de Minas Gerais. Resultante do cruzamento de alguns animais da raça Alter com animais sem raça definida existentes na região (BECK, 1989), teve seu primeiro registro em 1812 com o nascimento do cavalo Fortuna.

A raça vem sendo selecionada desde sua origem para resistência, rusticidade e andamento cômodo, mais particularmente o andamento marchado, caracterizado pelo tríplice apoio dos membros durante a marcha (RIBEIRO, 1988).

Alguns autores admitem a introgressão esporádica de animais das raças Árabe, Puro Sangue Inglês, Andaluz e algumas raças americanas na formação da raça Mangalarga (TORRES, 1947).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. ANIMAIS

Os animais estudados são eqüinos da raça Mangalarga Marchador provenientes do Haras Catuaí, localizado em São Sebastião do Paraíso (MG), de propriedade de C.F. Ltda.

Foram utilizadas 9 famílias completas, resultantes do acasalamento de 7 fêmeas e 3 machos, produzindo 1 ou 2 progênes por combinação macho-fêmea, e 4 famílias incompletas (mãe e progênie) , totalizando 27 animais, para o estudo de marcadores bioquímicos. Este estudo foi conduzido no Laboratório de Genética de Leveduras da ESALQ/USP.

Para o estudo do polimorfismo de DNA foram utilizadas duas famílias da amostra anterior, constituídas de uma fêmea, acasalada com dois machos, produzindo um filho do sexo masculino no primeiro cruzamento e duas filhas no segundo cruzamento. Nessa análise incluiu-se uma família de pôneis da raça Shetland composta por macho, fêmea e produto do sexo masculino, obtida na Universidade de Guelph (Canadá). A análise de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Brock University (Ontário, Canadá) sob orientação do Prof. Dr. Yousef Haj-Ahmad.

3.1.2. Soluções para coleta e conservação de sangue

3.1.2.1. Solução de glicerol

Citrato tripotássico	19,4 g
Fosfato de sódio monoácido	2,8 g
Fosfato de sódio diácido	3,1 g
Glicerol	200 ml
Água destilada	300 ml

3.1.2.2. Solução anticoagulante

EDTA	2 g
Água destilada	100 ml

3.1.2.3. Solução salina

Cloreto de sódio	9,2 g
Água destilada	1000 ml

3.1.3. Soluções para eletroforese

3.1.3.1. Tampão Acetato pH 5,4

Acetato de sódio	0,125 M
EDTA	8,5 mM

O pH da solução é ajustado com ácido acético glacial antes de se completar o volume.

3.1.3.2. Tampão Fosfato pH 7,2

0,2M Fosfato de sódio monobásico	298,2 ml
0,2M Fosfato de sódio dibásico	701,76 ml

3.1.3.3. Tampão Tris-acetato

Tris	40 mM
EDTA	50 mM

O pH 8,0 é ajustado com ácido acético glacial.

3.1.3.4. Tampão da amostra

Glicerol	50% (p/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)

3.1.4. Soluções para coloração de proteínas

3.1.4.1. Solução de amido black

Amido black 10B	1 g
Ácido acético	90 ml
Metanol	450 ml
Água destilada	450 ml

3.1.4.2. Solução de descoloração

Solução acima sem amido black

3.1.5. Soluções para coloração de enzimas

3.1.5.1. Tampão Maleato pH 6,5

EDTA	10 mM
Tris	100 mM
Ácido málico	100 mM
Cloreto de magnésio	10 mM

Ajusta-se o pH com hidróxido de sódio 10 N.

3.1.5.2. Tris 0,3 M pH 8,0

Ajusta-se o pH com ácido clorídrico 0,1 M.

3.1.6. Soluções para preparação de DNA genômico

3.1.6.1. Solução de hemólise

Tris	10 mM
Cloreto de sódio	10 mM
Cloreto de magnésio	5 mM

Ajusta-se o pH para 7,6 com ácido clorídrico 1 N.

3.1.6.2. Tampão de lise

Tris	10 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5%

O pH é ajustado para 7,4 com ácido clorídrico 1 N.

3.1.6.3. Solução de Pronase

Tris	10 mM pH 7,5
Pronase (Sigma p691)	5 mg/ml

A solução é incubada a 56°C por 15 minutos e a 37°C por 1 hora, e conservada a -20°C.

3.1.6.4. Tampão TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

O pH 7,5 é ajustado com ácido clorídrico 1 N.

3.1.7. Soluções e meios de cultura para crescimento, transformação e seleção de bactérias

3.1.7.1. Tampão de transformação

Cloreto de cálcio	75 mM
Tris HCL	5 mM

Se necessário, ajusta-se o pH para 7,6 com ácido clorídrico 1 N.

3.1.7.2. Luria Broth líquido

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
Cloreto de sódio	1%

Ajusta-se o pH para 7,5 com hidróxido de sódio 1 N.

3.1.7.3. Luria Broth ágar

Adiciona-se à solução anterior 2% de ágar.

3.1.7.4. Meio seletivo

Meio de cultura Luria Broth ágar suplementado com

ampicilina na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$.

O meio é distribuído em placas de petri. Após a secagem dessas, adiciona-se 30 μl de solução de X-gal.

3.1.7.5. Solução de X-gal

X-gal (5 - Bromo - 4 - Cloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside). 20 mg
N,N - dimetil formamida 1 ml

A solução é preparada em recipiente de vidro ou polipropileno e estocada a -20°C em frasco escuro.

3.1.7.6. Meio S.O.C.

Triptona	2%
Extrato de levedura	0,5%
Cloreto de sódio	10 mM
Cloreto de potássio	2,5 mM
Cloreto de magnésio	10 mM
Sulfato de magnésio	10 mM
Glicose	20 mM

3.1.8. Soluções para isolamento de DNA plasmidial

3.1.8.1. Solução de lisozima

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris	25 mM
pH 8,0	

Adiciona-se lisozima na concentração de 2 mg/ml na hora de usar.

3.1.8.2. Acetato de sódio 3 M

Acetato de sódio	3 M
Ácido acético glacial	suficiente para se obter
pH 4,8	

3.1.8.3. Solução de SDS alcalino

NaOH 4 N	0,5 ml
SDS 20%	0,5 ml
Água destilada	9,0 ml

A solução é preparada na hora de usar.

3.1.9. Soluções para Southern Blot

3.1.9.1. Solução desnaturante

Cloreto de sódio	1,5 M
Hidróxido de sódio	0,5 M

3.1.9.2. Solução neutralizante

Tris HCL	1 M
Cloreto de sódio	1,5 M
pH 8,0	

3.1.9.3. 20X SSC

Cloreto de sódio	3 M
Citrato de sódio	0,3 M
pH 7,0 ajustado com NaOH 1 N	

A solução vinte vezes concentrada é mantida como estoque para as soluções 10X SSC; 6X SSC e 2X SSC, que são obtidas pela diluição apropriada da solução estoque.

3.1.10. Soluções de hibridização

3.1.10.1. Solução de pré-hibridização A

5X SSC	
Solução de Denhardt 5X concentrada	
ssp DNA	250 µg/ml
Tris HCL	50 mM pH 7,5
Dextrana sulfato	10%

3.1.10.2. Solução de hibridização A

5X SSC	
Solução de Denhardt 5X concentrada	
ssp DNA	100 µg/ml
Dextrana sulfato	10%
Tris	20 mM pH 7,5

3.1.10.3. Solução de pré-hibridização B

5X SSC	
Solução de Denhardt 5X concentrada	
SDS	1%
Dextrana sulfato	10%

3.1.10.4. Solução de hibridização B

Solução acima suplementada com ssp DNA na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.10.5. Solução de hibridização C

Fosfato de sódio	50 mM
Albumina bovina (fração V)	1%
SDS	7%
ssp DNA	100 $\mu\text{g/ml}$

O tampão fosfato de sódio é obtido pela mistura de 5,7 ml de Na_2HPO_4 1 M e 4,3 ml de NaH_2PO_4 1 M para cada 10 ml de tampão.

3.1.10.6. Soluções estoque para as soluções de hibridização

3.1.10.6.1. Solução de Denhardt 50X concentrada

Ficoll	1% p/v
Polivinilpirrolidona	1% p/v
Albumina Bovina (fração V)	1% p/v

A solução é esterilizada por filtração a 0,20 μ . Conserva-se a solução a -20°C .

3.1.10.6.2. DNA de esperma de salmão (ssp DNA)

sspDNA	10 mg/ml de água destilada
--------	----------------------------

O DNA é fragmentado por ação mecânica através de sucessivas passagens por seringa. A solução é alíquotada e conservada a -20°C .

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas em seringas descartáveis de 20 ml, contendo anticoagulante (3.1.2.2) na proporção de 1 gota de solução por mililitro de sangue coletado, e transportadas em recipiente gelado para o Laboratório de Genética de Leveduras da ESALQ, em Piracicaba (SP).

No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 800 rpm, em centrífuga Excelsa Baby, por 10 minutos para sedimentação das células. O plasma foi aspirado com auxílio de pipetas Pasteur, colocado em tubos plásticos de 1,5 ml, identificado e conservado a -4°C.

As células foram lavadas três vezes em solução salina 0,92% e ressuspensas em igual volume de solução de glicerol (3.1.2.1). A suspensão de eritrócitos obtida foi transferida para tubos plásticos de 1,5 ml, identificada e conservada a -4°C.

3.2.2. Hidrólise de amido

O amido utilizado na preparação dos géis foi obtido por hidrólise ácida de fécula de batata através do método de BRAEND (1970) modificado: 600 g de fécula de batata foram suspensas em 1200 ml de acetona e 12 ml de ácido

clorídrico a uma temperatura de 39°C, e deixadas em repouso por 45 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio 1 M. Terminada a hidrólise o amido foi lavado em funil Büchner com 40 litros de água destilada para cada 3 Kg de amido.

3.2.3. Métodos eletroforéticos para proteínas

3.2.3.1. Albumina e esterase

A caracterização das albuminas foi feita segundo o método de GAHNE (1966), por eletroforese horizontal em gel de amido.

Cada placa de gel foi preparada do seguinte modo: 30,24 g de amido hidrolisado (3.2.2) foram suspensas em 252 ml de tampão acetato (3.1.3.1) quatro vezes diluído.

A suspensão foi aquecida em bico de Bunsen sob agitação manual por aproximadamente 10 minutos, até atingir a consistência desejada, e derramada em placa molde de 15 x 21 x 0,6 cm. O gel foi deixado à temperatura ambiente durante a noite.

No momento da aplicação, as amostras de plasma foram embebidas em papel filtro Whatman 3MM de 0,5 x 0,4 cm e inseridas no gel a 4 cm da extremidade catódica. O mesmo tampão acetato pH 5,4 foi utilizado para os elétrodos, diluído 1:1 no ânodo e sem diluição no cátodo.

A corrida foi realizada entre 5 e 10°C a uma tensão inicial de 220V. Durante toda a corrida (5 horas) a corrente foi mantida a 40mA independentemente da voltagem.

Ao final da corrida eletroforética, retiraram-se os papéis e o gel foi cortado em duas fatias de 3 mm de espessura. A porção superior do gel foi corada para Albumina com Amido Black 10B (3.1.4.1) durante 10 minutos e descorada em lavagens sucessivas com solução de descoloração (3.1.4.2). A leitura dos fenótipos de albumina foi transferida para papel milimetrado a fim de se calcular a taxa de migração (RF), de acordo com a fórmula:

$$RF = \frac{\text{Distância percorrida pela banda}}{\text{Distância total percorrida pelo tampão}}$$

A outra metade do gel foi corada para Esterase, locus Es, pelo método de GAHNE (1966). Segundo esse método, o gel foi fixado em 50 ml de metanol e tampão maleato (3.1.5.1) na proporção de 1:1, durante 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 1 ml de alfa-naftil acetato a 1%, preparado em solução aquosa de acetona a 50%, e 25 mg de Fast Garnet GBC sulfato.

O gel foi deixado nessa solução até o surgimento de bandas marrom-claras acima da região das albuminas, após o que, descartou-se a solução e procedeu-se à lavagem e fixação do gel em solução de descoloração (3.1.4.2). A leitura e cálculo do RF foi realizada como descrito anteriormente.

3.2.3.2. Fosfohexose isomerase e 6 - fosfogluconato desidrogenase

Para a separação dos fenótipos de PHI e PGD foi utilizado o método de BENGTTSSON & SANDBERG (1973) com

algumas modificações.

Os géis foram preparados com 240 ml de tampão fosfato pH 7,2 (3.1.3.4), diluído 1:20, e 27,6 g de amido hidrolisado.

Para o preparo das amostras foram utilizados 100 μ l de eritrócitos e 100 μ l de água destilada. Deixou-se descansar por 10 minutos à temperatura ambiente e fez-se adição de 100 μ l de tetracloreto de carbono. As amostras foram, então, centrifugadas a 800 rpm, em centrífuga Excelsa Baby, por 5 minutos, e aplicadas no gel em papel filtro Whatman 3MM a 4 cm da extremidade catódica.

Nas cubas, foi utilizado o mesmo tampão fosfato pH 7,2 (3.1.3.4) diluído 1:2. As corridas foram realizadas inicialmente a 300 V-60 mA. Ao longo das 5 horas de migração eletroforética foram mantidos 60 mA de intensidade de corrente, independentemente da voltagem.

Ao final da corrida as placas foram cortadas em duas fatias de 3 mm. Em seguida cortou-se a região abaixo da origem (extremidade catódica) de uma das fatias do gel e procedeu-se à coloração de PHI, segundo modificações do método de BENGTSSON & SANDBERG (1973). A solução de coloração foi preparada como se segue:

Cloreto de magnésio 0,1 M	2 ml
NADP 5 mg/ml	0,5 ml
PMS 5 mg/ml	0,5 ml
MTT 5 mg/ml	0,5 ml

No momento da coloração, adicionaram-se 5 ml de Tris 0.3 M (3.1.5.2) com 1% de ágar, 20 μ l de glucose-6-fosfato

desidrogenase e 10 mg de frutose-6-fosfato.

A solução foi rapidamente derramada sobre o gel, formando uma cobertura de ágar, e incubou-se a 37°C por 10 minutos. Após o aparecimento das bandas, o gel foi fixado em solução de descoloração (3.1.4.2).

A região do gel acima da origem (extremidade anódica) foi utilizada para a observação da enzima PGD através do método de FILDES & PARR (1963). A solução de coloração foi preparada com:

NADP 5 mg/ml	1.0 ml
PMS 5 mg/ml	0.1 ml
MTT 5 mg/ml	0.5 ml

No momento da coloração foram adicionados 10 ml de Tris 0.3 M (3.1.5.2) contendo 1% de ágar, e 10 mg de ácido 6-fosfogluconico (sal trissódico). A solução foi rapidamente derramada sobre o gel e incubou-se a 37°C por 15 a 20 minutos. Após o aparecimento das bandas azuladas típicas de PGD o gel foi fixado em solução de descoloração.

3.2.4. Isolamento de DNA genômico

Amostras de sangue coletadas em EDTA (3.1.2.2) foram centrifugadas a 1500 rpm, em centrífuga Excelsa Baby, por 5 minutos e o plasma foi descartado.

Ressuspendeu-se o sedimento de células em igual volume de solução de hemólise (3.1.6.1). A suspensão foi homogeneizada a 4°C por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 2000 rpm (Excelsa Baby) por 10 minutos. Esse

procedimento foi repetido até a obtenção de um sedimento de células brancas livre de hemoglobina.

As células brancas foram guardadas em solução de hemólise a 4°C por um período máximo de 20 dias.

No momento da extração de DNA, as amostras foram ressuspensas em 500 μ l de tampão de lise (3.1.6.2) e 100 μ l de solução de Pronase (3.1.6.3). Incubou-se a 37°C até a obtenção de aparência viscosa (aproximadamente 1 hora).

Procedeu-se à extração das proteínas em igual volume de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, preparada na proporção 25:24:1, respectivamente. Essa extração foi repetida pelo menos duas vezes, até a obtenção de interfase límpida entre o fenol e a suspensão de DNA.

Procedeu-se a uma extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e à precipitação do DNA com dois volumes de etanol gelado (-20°C).

O DNA desidratado pelo etanol foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e ressuspenso em 200 μ l de tampão TE (3.1.6.4).

As amostras foram tratadas com RNase segundo as recomendações do fabricante dessa enzima, e as concentrações de DNA determinadas por espectrofotometria em aparelho Beckman DU-50 ($\lambda_{260 \text{ nm}}$).

3.2.5. Digestão enzimática do DNA

As enzimas de restrição utilizadas na digestão de DNA genômico foram *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III. Em todas as reações foi utilizado o tampão da enzima fornecido pelo fabricante e 0.5 a 1 unidade de enzima para cada micrograma de DNA a ser digerido.

As reações foram incubadas a 37°C por 4 a 6 horas, sendo cuidadosamente homogeneizadas uma ou duas vezes durante este período.

Após a digestão, as amostras foram analisadas quanto à concentração e extensão da digestão em mini-géis de agarose. Correções na concentração foram realizadas para as amostras a serem comparadas.

3.2.6. Separação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de restrição de DNA foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose.

Os géis foram preparados com tampão Tris-acetato (3.1.3.3) e agarose a 0.7% dissolvida por aquecimento até o ponto de ebulição, e derramados em placas molde de 16 cm de comprimento e 12 cm de largura.

As amostras eram constituídas de 100 ng de DNA digerido. Em todos os géis incluiu-se um padrão de tamanho molecular (DNA de fago λ digerido com *Hind*III) marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

Antes de se aplicarem os géis, adicionou-se tampão da

amostra (3.1.3.4), na proporção de 1 parte de tampão para 10 partes de suspensão de DNA.

As eletroforeses foram realizadas a 25V por 20 horas, aproximadamente, ou até que a região de 600 pb atingisse o final do gel, o que era determinado pela migração do padrão.

3.2.7. Southern blots

Após a separação eletroforética, os géis foram corados por 30 a 60 minutos em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, e observados sob luz ultra-violeta (254 nm).

A transferência do DNA para membranas de hibridização foi realizada segundo modificações do método de SOUTHERN (1975) sugeridas por SAMBROOK *et alii* (1989).

De acordo com esse método os géis foram tratados com HCl 25mM por 15 minutos, afim de se hidrolisarem as moléculas de DNA. Esse procedimento visa a transferência homogênea dos fragmentos de diferentes tamanhos.

O DNA foi em seguida desnaturado por 1 hora na solução 3.1.9.1. e neutralizado em solução 3.1.9.2. por igual período de tempo.

Para a transferência capilar foi utilizado tampão 10X SSC obtido por diluição da solução estoque (3.1.9.3) na proporção de 1:1.

A transferência foi realizada por um período mínimo de 4 horas.

Após a transferência, as membranas foram submersas em 6X SSC por 5 minutos, e secas ao ar por igual período de tempo. O DNA foi fixado à membrana por calor, em forno a vácuo, à temperatura de 80°C, ou por exposição à radiação ultra violeta em equipamento apropriado.

3.2.8. Obtenção e seleção de sondas moleculares

3.2.8.1. Construção do banco de DNA genômico

Uma amostra de DNA genômico de equino foi digerida com a enzima de restrição *Sau3AI*, como descrito no item 3.2.5.

O vetor utilizado foi o plasmídeo pUC19, cortado com a enzima *BamHI*, cujo sítio de restrição está localizado no sítio de clonagem múltiplo desse plasmídeo. Esse vetor apresenta o gene para resistência a ampicilina, funcionando como marca seletiva para transformação. A marca seletiva de clonagem é uma parte do gene da β -galactosidase, gene *lac Z*, contendo as sequências regulatórias e a informação para os 146 primeiros aminoácidos dessa enzima. O sítio múltiplo de clonagem é inserido na região codificadora do gene *lac Z* sem interromper a leitura. Entretanto, ao se inserir um fragmento de DNA exógeno, o produto do gene *lac Z* fica alterado.

A seleção desses plasmídios híbridos é feita através de teste de α -complementação em linhagens bacterianas que produzam a porção carboxy-terminal da β -galactosidade.

Bactérias transformadas com plasmídios intactos exibirão α -complementação, desenvolvendo colônias azuis em

presença de substrato cromogênico (x-gal). Aquelas que na transformação receberam plasmídeo híbrido, não serão capazes de produzir β -galactosidase, desenvolvendo colônias brancas neste substrato.

Os fragmentos de DNA genômico foram ligados ao plasmídeo linearizado por adição de 1 unidade de T₄ ligase por micrograma de DNA. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente por 4 horas.

3.2.8.2. Transformação de bactérias

Para a manutenção e multiplicação dos plasmídios recombinantes, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5 α .

As células foram tornadas competentes, ou seja, capazes de receber DNA exógeno, através do método de COHEN *et alii* 1972, com algumas modificações.

Para a preparação das células competentes transferiu-se uma colônia de *E. coli* DH5 α , crescida em meio LB-ágar (3.1.7.3), para 5 ml de meio LB líquido (3.1.7.2). Essa cultura foi incubada a 37°C em banho-maria com agitação por aproximadamente 15 horas.

Inoculou-se 1 ml dessa cultura em 100 ml de meio LB líquido e incubou-se a 37°C sob agitação, por aproximadamente 2 horas, tempo necessário para se obter densidade óptica de 0,6.

As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, em centrífuga IEC Centra-TR. O sedimento formado foi ressuspensão em tampão de transformação gelado

(3.1.7.1) e colocou-se a suspensão em banho de gelo durante a noite.

As células foram novamente sedimentadas por centrifugação e ressuspensas em 2 ml de tampão de transformação gelado.

Em cada transformação adicionou-se aproximadamente 10 ng de plasmídeo para 100 μ l de células.

A mistura bactéria-DNA foi mantida em gelo por 30 minutos e submetida a choque térmico em banho-maria, a 42°C, por 45 segundos, após o que, foi inoculada em 1 ml de meio SOC (3.1.7.6) e incubada a 37°C por 1 hora.

Ao final deste período, diluições seriadas dessa cultura foram inoculadas em placas de meio seletivo (3.1.7.4.) e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas.

3.2.8.3. Isolamento de DNA plasmidial

Utilizou-se extração de plasmídeo em pequena escala para a seleção de transformantes.

Cada colônia branca das placas de transformantes foi inoculada em 2 ml de meio LB líquido contendo 50 μ g de ampicilina por mililitro de meio.

As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação, por período de 15 a 18 horas, e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidade.

As células foram sedimentadas por centrifugação a

12.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o sedimento em 100 μ l de solução de lisozima (3.1.8.1). Essa suspensão foi mantida em gelo por 30 minutos, após os quais adicionaram-se 200 μ l de SDS alcalino (3.1.8.3) homogeneizando-se por 5 minutos em temperatura ambiente, ou até a obtenção de uma solução transparente.

Adicionaram-se 150 μ l de acetato de sódio 3M (3.1.8.2.) e colocou-se em gelo por 40 minutos, a fim de se precipitar as proteínas e o DNA de alto peso molecular.

As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos e o sobrenadante transferido para tubos limpos.

O DNA plasmidial foi precipitado duas vezes por adição de dois volumes de etanol gelado, seguido de centrifugação por 1 minuto e ressuspensão em 100 μ l de tampão TE (3.1.6.4).

Após a extração, o DNA plasmidial foi digerido com diferentes enzimas de restrição e analisado em géis de agarose. O plasmídeo pUC19 linearizado e DNA de fago λ digerido com *Hind*III foram utilizados como padrões. O tamanho molecular foi determinado por interpolação logarítmica com a curva padrão.

Os plasmídios cujo tamanho excedia em pelo menos 200 pares de base o tamanho calculado para pUC19 foram selecionados e identificados segundo a nomenclatura: pESn, onde E identifica a origem dos fragmentos clonados (DNA de eqüinos), S identifica a enzima que gerou tais fragmentos (*Sau*3AI) e n o número em ordem de isolamento.

Tais plasmídios foram selecionados quanto à capacidade de detectar polimorfismo de DNA (RFLPs), diretamente em hibridizações com DNA genômico.

3.2.9. Métodos de Hibridização

Existem diversos métodos de hibridização para DNA imobilizado em suporte sólido que variam basicamente quanto à estringência, ou seja, o grau em que se permite a formação de moléculas híbridas, e quanto ao tipo de bloqueamento das membranas.

Com respeito à estringência pode-se dizer que esta é influenciada pelo tipo de solvente utilizado, sendo maior para uma dada temperatura quando em presença de solventes orgânicos, como a formamida. Outros fatores, como a temperatura e a concentração de sais durante a hibridização e a remoção da sonda, também afetam o grau de estringência.

O bloqueio das membranas de hibridização pode utilizar diversos agentes, entre eles a solução de Denhardt e detergentes como o sódio-dodecil-sulfato (SDS).

Neste trabalho foram testados três métodos de hibridização com diferentes graus de estringência e bloqueamento.

Em todas as hibridizações utilizou-se como sonda plasmídios pESn marcados com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP através de reação de extensão de "primer", usando-se Oligolabeling Kit (Pharmacia) de acordo com as indicações do fornecedor. Cada hibridização foi conduzida com 10^6 a 10^7 cpms de sonda.

3.2.9.1. Método de hibridização a 45°C

Os filtros foram selados individualmente em filme plástico, em presença de 10 ml de solução de pré-hibridização A (3.1.10.1), e incubados por 2 horas a 45°C em banho-maria.

A solução de pré-hibridização foi descartada e adicionaram-se 15 ml de solução de hibridização A (3.1.10.2).

Um volume de sonda radioativa correspondente a 10^6 - 10^7 cpms de atividade foi desnaturado por 10 minutos a 100°C, rapidamente resfriado em gelo e adicionado através de pequena abertura no filme plástico com auxílio de seringa descartável. A abertura foi selada e procedeu-se à hibridização a 45°C por 16 horas, sob agitação.

Após a hibridização retiraram-se as membranas, guardando-se a solução de hibridização para reutilização.

A remoção do excesso de sonda foi constituída de três lavagens:

- 1^a. lavagem: 200 ml de 2X SSC + 0,5% SDS a 65°C por 5 minutos;
- 2^a. lavagem: 200 ml de 2X SSC + 0,1% SDS à temperatura ambiente por 30 minutos;
- 3^a. lavagem: 200 ml de 0,1X SSC + 0,5% SDS à temperatura ambiente por 60 minutos.

As membranas foram então secas ao ar por 5 minutos e autorradiografadas em filme Kodak X-Omat[®] tipo AR5 a -70°C, em presença de um intensificador.

3.2.9.2. Método de hibridização a 65°C

Procedeu-se à pré-hibridização com 15 ml de solução 3.1.10.3 a 65°C por 1 hora.

A mesma solução foi utilizada na hibridização, sendo adicionados 20 $\mu\text{g/ml}$ de sspDNA (3.1.10.6.2) e 10^6 a 10^7 cpms de sonda.

A hibridização foi realizada a 65°C sob agitação por 16 a 20 horas.

A remoção do excesso de material radioativo foi realizada em 6 lavagens:

- duas lavagens em 2X SSC à temperatura ambiente por 5 minutos;
- duas lavagens em 2X SSC + 1% de SDS a 65°C por 30 minutos;
- duas lavagens em 0,1X SSC à temperatura ambiente por 30 minutos.

As membranas foram então autorradiografadas como descrito anteriormente.

3.2.9.3. Método de Hibridização a 68°C

A pré-hibridização foi realizada com 20 ml de solução 3.1.10.5 por 1 hora a 68°C.

Sem desprezar essa solução adicionaram-se à membrana 10^6 - 10^7 cpms de sonda e incubou-se a 68°C por 16 horas.

Realizou-se uma única lavagem em 2X SSC + 0,1% de

SDS, a 68°C por 15 minutos.

As membranas foram então autorradiografadas como descrito anteriormente.

3.2.10. Ensaio de comparação de métodos de hibridização

A eficiência dos métodos de hibridização a 45°C e a 65°C foi comparada quanto à intensidade do sinal e à clareza da imagem autorradiográfica.

Com essa finalidade correu-se um gel de agarose a 0,8% com duas repetições de diluições decimais do plasmídeo pES16 de 100 ng a 1 pg de DNA, a 100V por 2 horas.

O gel foi cortado em duas seções, cada uma contendo todas as diluições, e transferido para membrana Genescreen[®] (NEN).

Procedeu-se à hibridização pelos métodos 3.2.9.1 e 3.2.9.2 com 10^6 cpms da sonda pES16.

Após a hibridização procedeu-se à autorradiografia a -70°C como descrito anteriormente.

3.2.11. Ensaio de comparação da qualidade de membranas

Com a finalidade de determinar a membrana ideal para as hibridizações, realizou-se o seguinte experimento.

Foram preparadas diluições de plasmídeo pES85 contendo 10 ng, 1 ng e 0,1 ng de DNA. A cada diluição

acrescentou-se 1 μ g de DNA genômico de equino digerido com a enzima *EcoRI*.

As diluições foram aplicadas em um gel de agarose a 0,7%, em ordem decrescente de concentração, em três repetições.

A eletroforese foi realizada a 25V por 20 horas e, ao final, cortou-se o gel no sentido do comprimento obtendo-se três tiras iguais.

Cada seção do gel foi transferida para uma membrana de nylon diferente, sendo elas: Genescreen[®] e Genescreen Plus[®] (NEN), e Biotrans[®] (Bio Rad), respectivamente.

As três membranas foram então submetidas à hibridização a 65°C (3.2.9.2) com 10⁶cpms da sonda pES85.

Após a hibridização as membranas foram colocadas lado a lado e autorradiografadas por 5 dias a -70°C.

3.3.Métodos estatísticos

Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento de blocos ao acaso.

As frequências gênicas da albumina e esterase foram calculadas por simples contagem.

A hipótese de equilíbrio genético foi testada pelo método do qui-quadrado com correção de Yates.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Polimorfismo bioquímico

4.1.1. Polimorfismo da Albumina

Três fenótipos de albumina, que são A, AB e B, foram observados na amostra estudada.

O padrão eletroforético obtido é idêntico ao descrito por GAHNE (1966) para o pH 5,4. Este padrão pode ser visualizado na figura 1.

Os três fenótipos são controlados por dois alelos codominantes, alelos Al^A e Al^B , com frequências 0,54 e 0,46, respectivamente. A validade das frequências gênicas é bastante limitada devido ao tamanho da amostra estudada, 12 animais na geração parental. A indisponibilidade na literatura de dados de frequências gênicas para a raça Mangalarga Marchador não permite a comparação desses resultados com outras populações dessa raça.

De acordo com a literatura, existe uma prevalência do alelo Al^B nas raças européias, sendo o alelo Al^A mais frequente na raça Árabe e também nas raças espanholas (ARIZA *et alli*, 1979).

Figura 1. - Zimograma da albumina em pH 5,4 (presente trabalho). A distância percorrida em centímetros é dada à esquerda e a taxa de migração (RF) é dada à direita da figura.

A raça Alter, formadora do Mangalarga Marchador, tem sua origem em eqüinos de raça espanhola, mais particularmente na raça Andaluz.

A introgressão de animais da raça Árabe na raça Alter, bem como na raça Mangalarga, é bastante discutível, admitindo-se a ocorrência de alguma introgressão. Tendo como base a origem da raça, seria esperado, portanto, a ocorrência de uma maior frequência do alelo Al^A . Entretanto, devido às limitações da amostra estudada não nos é permitido obter conclusões definitivas quanto ao

grau de diferenciação genética do Mangalarga em relação à sua origem.

A presença do alelo Al^I não foi constatada nesse estudo. Esse alelo apresenta distribuição rara, tendo sido observado em animais das raças de trote sueca e italiana, com frequências de 0,049 e 0,008, respectivamente (OURAGH, 1988).

O comportamento desse locus marcador em diferentes cruzamentos é condizente com a presença de dois alelos codominantes, produzindo as proporções mendelianas clássicas (Tabela I).

Tabela I - Herança dos alelos de albumina.

Tipo de Cruzamento	Fenótipos da Progenie			Total
	A	AB	B	
B X AB		1	2	3
B X A		4		4
A X AB	1	3		4

A análise estatística (Tabela II) sugere que os dois alelos se encontram em equilíbrio na população estudada. A ocorrência de equilíbrio genético para os alelos de albumina em uma população submetida à seleção artificial, condição essa contrária ao teorema de Hardy-Weinberg, pode ser explicada pela ausência de correlação entre o locus da albumina e os caracteres selecionados na população.

A condição de equilíbrio tem sido verificada para muitos loci de marcadores bioquímicos em diferentes populações animais.

Tabela II - Distribuição observada e esperada dos genótipos de albumina na geração parental, e respectivas frequências gênicas.

	Genótipos				Freq. Gênicas	
	Al ^A Al ^A	Al ^A Al ^B	Al ^B Al ^B	Total	Al ^A	Al ^B
observado	4	5	3	12	0,54	0,46
esperado	3,5	5,96	2,54	12		

Análise estatística: $\chi^2 = 0,309$ n.s.; $\chi^2_{\text{corrigido}} = 0,358$ n.s.
ao nível de 5% de significância, GL = 1.

4.1.2. Polimorfismo da Esterase

Apenas dois dos onze alelos descritos para o locus Es foram encontrados na amostra de Mangalarga Marchador.

Através da comparação do comportamento dos fenótipos heterozigotos em pH 5,4 e pH 8,5 com os padrões descritos por GAHNE (1966), encontramos evidências de serem estes os alelos F e I de esterase.

A representação diagramática dos fenótipos de esterase nos dois valores de pH é apresentada na figura 2.

Os dois alelos encontrados na amostra apresentam o

mesmo comportamento observado para os alelos F e I por GAHNE (1966), ou seja, uma maior separação das bandas do heterozigoto em pH 5,4.

Figura 2. - Diagrama dos fenótipos de esterase em pH 5,4 e pH 8,5. (Adaptado de GAHNE, 1966)

A frequência dos alelos F e I na amostra do Haras Catuaí foi de 0,42 e 0,58 respectivamente.

De acordo com a literatura o alelo I é o mais frequente em todas as raças de eqüinos, com frequências variando entre 0,73, na raça italiana Salernitana (GAHNE, 1966), a 0,939 no Puro Sangue Inglês (PODLIACHOUK *et alii*, 1975).

A ocorrência de uma frequência relativamente alta do alelo F na amostra do Haras Catuaí pode ser resultante, tanto do tamanho da amostra, quanto da estreita base genética da população em questão.

A inexistência de dados de frequências gênicas para essa raça, na literatura, não nos permite avaliar o quanto as frequências obtidas para esse local são representativas da raça Mangalarga Marchador.

Em nenhum dos cruzamentos analisados foi detectada a presença do alelo recessivo O, codificando para ausência de atividade da enzima.

O padrão eletroforético da esterase obtido no presente trabalho é apresentado na figura 3.

Figura 3. - Zimograma dos fenótipos de esterase em pH 5,4 (presente trabalho). Os valores da esquerda representam a distância percorrida em centímetros. Os valores de RF são dados à direita de cada banda.

Apesar do reduzido número de animais, a análise estatística sugere que os dois alelos se encontram em equilíbrio na população (Tabela III).

Tabela III - Distribuição dos fenótipos de esterase na geração parental e respectivas frequências gênicas.

	Fenótipos				Freq. gênicas	
	F	FI	I	Total	F	I
observado	1	8	3	12	0.42	0.58
esperado	2,12	5.85	4.03	12		

Análise estatística : $\chi^2 = 1.645$ n.s. ; $\chi^2_{\text{corrigido}} = 2.284$ n.s.
ao nível de 5% de significância, GL=1.

4.1.2. Sistemas eritrocitários

Dois sistemas de enzimas eritrocitárias foram estudados no presente trabalho.

As duas enzimas, PGD e PHI, mostraram-se monomórficas na amostra do Haras Catuaí.

O sistema PGD (6 - fosfogluconato - desidrogenase) apresenta três alelos descritos em eqüinos, que são: F, D e S. A presença do alelo F é predominante em todas as raças estudadas, com frequências variando de 0,6 a 0,9. O alelo D é o de menor frequência, variando entre 0,001 e 0,1 (OURAGH, 1985).

Acredita-se, de acordo com essas frequências gênicas, que o alelo encontrado no presente trabalho seja o alelo

F. Entretanto não se pode descartar completamente a possibilidade de tratar-se do alelo S, uma vez que este é encontrado com frequências relativamente altas (0,35 a 0,6) no cavalo Árabe (PODLIACHOUK *et alli*, 1975; TROMMERSHAUSEN & CLARK, 1985).

No locus PHI (fosfohexose - isomerase) o único alelo observado na amostra parece tratar-se do alelo I, cuja frequência em eqüinos varia de 0,9 a 1.

A ausência de polimorfismo para esse sistema, na amostra estudada, é, portanto, justificada em vista da ocorrência rara dos demais alelos de PHI.

4.2. Polimorfismo de restrição do DNA

4.2.1. Obtenção de sondas

De acordo com a metodologia adotada, fragmentos de DNA genômico, resultantes de digestão com a enzima *Sau3AI*, foram inseridos no sítio de restrição para *BamHI* do vetor pUC19, localizado no sítio de clonagem deste vetor.

Após a transformação de bactérias com os plasmídios híbridos, 190 colônias brancas (lac^-), resistentes à ampicilina, foram isoladas.

Dessas colônias foram selecionadas aquelas que apresentavam plasmídios contendo fragmento de DNA exógeno de tamanho superior a 200 pb, totalizando 39 clones diferentes com fragmentos variando de 200 a 9000 pares de base.

As duas enzimas utilizadas realizam cortes no DNA,

gerando extremidades coesivas complementares que, quando ligadas, podem ou não restituir a sequência de reconhecimento para as enzimas. Dessa forma muitos dos clones obtidos perderam o sítio para a enzima *Bam*HI, sendo necessária a digestão simultânea com as enzimas *Hind*III e *Eco*RI, as quais delimitam o sítio de clonagem de pUC19, para o isolamento da sequência exógena.

Apesar da relativa desvantagem de ordem prática desse procedimento, o uso da enzima *Sau*3AI, que reconhece sequência de quatro pares de base na construção do banco genômico, apresenta a vantagem de produzir uma gama maior de fragmentos, permitindo uma maior exploração do DNA genômico, quando comparado a enzimas como a *Bam*HI, que reconhece sequências de seis pares de base.

4.2.2. Avaliação dos métodos de hibridização

A comparação de dois métodos de hibridização, hibridização a 45°C e a 65°C, demonstrou claramente a maior eficiência do segundo quanto à sensibilidade e à presença de fundo. Essas diferenças podem ser visualizadas na figura 4.

Observa-se, na hibridização a 45°C, o desaparecimento do sinal (banda) em concentrações de DNA inferiores a 1ng. Essa menor sensibilidade parece ser resultante de um bloqueio inadequado da membrana, permitindo que a sonda se ligue à esta mesmo na ausência de DNA, ocasionando um desperdício da sonda por ligação com a membrana. Além da redução da intensidade do sinal, o bloqueio inadequado resulta no aparecimento de fundo radioativo, característica bastante desfavorável à análise de RFLPs.

Na hibridização a 65°C, observa-se uma maior intensidade do sinal, detectando a presença de concentrações de DNA da ordem de 100 pg.

Através deste método, fomos também capazes de detectar a presença das bandas de plasmídeo circular, resultantes de digestão parcial do DNA, presentes em pequena concentração na amostra.

Figura 4. - Comparação de dois métodos de hibridização. Hibridização a 45°C (esquerda) e a 65°C (direita). As duas membranas contém diluições decimais de DNA variando de 100 ng a 1 pg (direita para esquerda).

O grau de bloqueio da membrana no método a 65°C é aumentado pela presença de 1% de SDS no tampão de pré-hibridização.

A menor intensidade do fundo radioativo é também decorrente de condições mais severas de remoção de sonda durante as lavagens, bem como do aumento da temperatura de hibridização e conseqüente aumento da estringência.

Neste experimento de comparação de métodos de hibridização não foi incluído o método de hibridização a 68°C, uma vez que só viemos a tomar contato com esse procedimento na fase de conclusão do trabalho experimental.

Entretanto, os resultados obtidos em hibridizações a 68°C com amostras de DNA genômico mostraram-se bastante satisfatórios, com uma redução favorável do fundo radioativo, resultando em imagens autorradiográficas bastante superiores às obtidas com os métodos anteriores.

Além da qualidade das hibridizações a 68°C, esse método apresenta outras vantagens: - a redução do custo devido à exclusão da dextrana sulfato e da solução de Denhardt do procedimento e - a redução do tempo despendido nas lavagens da membrana.

4.2.3. Comparação da eficiência das membranas de hibridização

Existem diferentes tipos de suporte disponíveis para a imobilização de ácidos nucleicos, com características peculiares do material utilizado na composição da membrana

e da presença ou ausência de cargas elétricas na superfície dessa.

Os filtros de nitrocelulose tem sido utilizados nos últimos 20 anos como suporte de eleição para a imobilização de DNA.

Apesar de sua relativa eficiência tais filtros apresentam a desvantagem de fixar o DNA através de interações hidrofóbicas, que permitem a gradual liberação das moléculas de DNA durante os processos de hibridização e lavagem.

A introdução das membranas de nylon representou um grande avanço nas técnicas de hibridização de ácidos nucleicos. Essas membranas apresentam uma maior resistência mecânica e maior capacidade de retenção de ácidos nucleicos, permitindo a rehibridização sucessiva do material com diferentes sondas (REED & MAN, 1985).

A única desvantagem desse tipo de suporte é a ocorrência de fundo radioativo mais elevado, principalmente quando se utilizam sondas de RNA. Esse problema pode ser facilmente solucionado pela adição de agentes bloqueadores apropriados, discutidos anteriormente.

Existem dois tipos básicos de membranas de nylon: as membranas de nylon originais, e as modificadas pela adição de carga elétrica na superfície.

A presença de carga elétrica promove a ligação covalente do DNA à membrana.

No presente trabalho foram testadas duas membranas de nylon positivamente carregadas, Biotrans[®] (BioRad) e Gene Screen Plus[®] (NEN), e uma membrana não carregada GeneScreen[®] (NEN), quanto à capacidade de retenção de DNA.

A comparação da eficiência das membranas em hibridizações com sequências de DNA de homologia total e homologia parcial demonstrou claramente a superioridade da membrana GeneScreen Plus[®] (Figura 5).

Figura 5. Comparação da capacidade de retenção de DNA em três membranas de nylon. Os valores apresentados na margem superior referem-se à quantidade de plasmídeo em nanogramas.

Nessa figura observa-se que a membrana de nylon não-modificada (GeneScreen[®]) apresenta uma pobre capacidade de retenção de DNA, permitindo a liberação deste durante o processo de hibridização. A perda de DNA resulta em sinais muito fracos, mesmo frente a 10 ng de DNA plasmidial. As duas membranas modificadas apresentam melhor desempenho quando comparadas à não-modificada. Entretanto, a intensidade do sinal obtido com a membrana GeneScreen Plus[®] é muito superior àquela obtida com Biotrans[®], permitindo a detecção de bandas de DNA genômico, localizadas acima das duas bandas do plasmídeo, resultantes da hibridização com sequências de homologia parcial.

Observa-se também que a intensidade do fundo radioativo é diretamente proporcional à capacidade de retenção da membrana, confirmando a necessidade de se usarem métodos adequados de bloqueamento na resolução desse problema.

Esses resultados evidenciam a importância da escolha do suporte na maximização do processo de hibridização.

Como foi discutido anteriormente, diversos são os fatores que afetam a qualidade de uma hibridização. A maximização desse processo é de especial interesse quando se visa a detecção de DNA de sequência única e quando se trabalha com quantidades limitadas de material, como é o caso da utilização de RFLPs em medicina legal.

4.2.4. Análise de RFLPs.

O estudo da variação no padrão de restrição do DNA de eqüinos utilizou como sondas os plasmídios pESn intactos

ou linearizados, de acordo com o tamanho do plasmídio.

Devido ao tempo despendido nos processos de hibridização, aproximadamente 15 dias entre a digestão do DNA a ser testado e a obtenção da imagem autorradiográfica, apenas 5 dos 39 plasmídios isolados foram testados.

Nossos esforços foram focalizados na sonda pES₃, que contém um fragmento de DNA de eqüino de aproximadamente 1,6 kb, uma vez que esta foi capaz de detectar RFLPs para as enzimas *Hind*III e *Eco*RI.

Na figura 6 observa-se o padrão de restrição para *Hind*III detectado pela sonda pES₃, em hibridização a 65°C.

A genealogia dos animais é dada na parte superior da figura. Os animais 1 a 3 pertencem à raça de pôneis Shetland, e os animais 4 a 9 são da raça Mangalarga Marchador.

Cinco fragmentos de restrição foram observados com a enzima *Hind*III: fragmentos C, D, E, F e G (figura 6).

Desses, apenas os fragmentos de 1,9 kb (F) e 1,3 kb (G) apresentaram variação individual, estando os demais presentes em todas as amostras.

Os fragmentos A e B, de 12,2 e 10 kb respectivamente, são resultantes da digestão parcial da sequência C+D+E. Essa conclusão é baseada na ocorrência de quantidades decrescentes dos fragmentos C e D em presença de quantidades crescentes de A e B. Além disso, o aparecimento dos fragmentos maiores mostrou-se variável ao longo das repetições.

Figura 6. Padrão de restrição de nove amostras de DNA digeridas com *Hind*III e hibridizadas com a sonda pESa.

Acredita-se que os fragmentos de 1,9 kb e 1,3 kb, observados em animais da raça Shetland (animais 1 a 3 da fig.6) sejam resultantes da ocorrência de dois sítios de restrição para a enzima *HindIII*, localizados no fragmento D (3,9 kb). De acordo com o modelo proposto, o fragmento D daria origem aos fragmentos F e G, além de uma sequência de 600 pb.

A presença desse terceiro RFLP - sequência de 600 pb - não foi detectada nessas hibridizações. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de homologia dessa sequência com a sonda pESa.

A hipótese dos fragmentos não estarem localizados em um único locus não foi analisada pela falta de dados mais informativos referentes a cruzamentos.

O padrão de restrição para a enzima *EcoRI*, em hibridização a 68°C, é apresentado na figura 7.

Seis fragmentos foram observados com essa enzima, sendo que os fragmentos de 4 kb e 3,2 kb apresentaram variações individuais (bandas D e E da figura 7).

Ao contrário do que foi observado com a enzima *HindIII*, o polimorfismo para *EcoRI* ocorre tanto entre raças quanto dentro das duas raças analisadas.

De acordo com o padrão encontrado, sugere-se que o fragmento de 3,2 kb (E) seja resultante da perda de um sítio de restrição para *EcoRI* no fragmento de 2,2 kb (F) com a adição de aproximadamente 1 kb.

O fragmento D (4 kb) seria resultante da inclusão de um sítio de restrição no fragmento C (4,3 kb), que resulta, além do fragmento D, numa sequência de 300 pb.

Figura 7. Padrão de restrição detectado pela sonda pES3 em nove amostras de DNA digeridas com *EcoRI*.

A análise dos cruzamentos sugere que o animal 1 (figura 7) é heterozigoto para o fragmento D, uma vez que este fragmento não é observado na progênie.

O mesmo pode-se dizer com referência aos indivíduos 4 e 6. Quanto a este último, observa-se que apenas um dos indivíduos da progênie, animal 8, herdou o fragmento D de sua mãe.

O fenótipo do animal 9 dessa figura é idêntico ao do animal 7, tendo sido determinado em outra repetição deste experimento.

Uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na formação desses RFLPs poderia ser obtida pela análise do padrão de restrição com as duas enzimas, simultaneamente, como sugerem BECKMANN *et alii* (1986).

A hipótese de tais fragmentos representarem seqüências de DNA de cópia única encontra algumas restrições, sendo a principal delas a quantidade de DNA utilizada no presente trabalho.

Segundo SAMBROOK *et alii* (1989) a quantidade de DNA necessária à detecção de seqüências de DNA de cópia única no genoma de mamíferos é da ordem de 10 μ g para sondas com atividade específica de 10⁹cpm/ μ g.

Apesar da sensibilidade dos métodos de hibridização a 65°C e a 68°C, considera-se pouco provável que uma seqüência de cópia única fosse detectada em 100 ng de DNA.

A questão da natureza do fragmento contido na sonda pESa pode vir a ser elucidada através do seqüenciamento desta e da análise mais detalhada de pedigrees.

Métodos como a hibridização "in situ" poderiam também ser úteis no mapeamento dessa sequência (BOTSTEIN *et alii*, 1980).

A desvantagem do uso de sondas de sequências ao acaso é o tempo despendido, na seleção dos fragmentos através de hibridizações com DNA genômico.

De acordo com nossas observações, alguns dos fragmentos do banco de DNA genômico contem sequências homólogas, como foi o caso da sonda pES12 que resultou em padrões de restrição semelhantes aos obtidos com pES3.

A classificação do banco de DNA em grupos de clones que contém fragmentos homólogos, através da hibridização *in situ* das colônias de transformantes, poderia ser uma estratégia válida na sistematização do processo de seleção.

Os resultados obtidos com a sonda pES3 confirmam que o polimorfismo de DNA para uma dada combinação enzima X sonda é geralmente da ordem de 2 a 3 fragmentos polimórficos (GEORGES *et alii*, 1987; THEILMANN *et alii*, 1989), à excessão das sondas de DNA minissatélite.

Entretanto, o número de combinações enzima X sonda é praticamente ilimitado, fornecendo um número de marcadores capaz de mapear todo o genoma de um mamífero.

5. CONCLUSÕES

O estudo de marcadores genéticos de eqüinos realizado neste trabalho permitiu obter as seguintes conclusões:

1. Foram detectados três fenótipos para albumina na amostra estudada. Esses fenótipos se mostraram controlados por dois alelos codominantes com frequências de 0,54 e 0,46.
2. A enzima esterase apresentou dois alelos, identificados como alelos F e I, com frequências de 0,42 e 0,58 na amostra de Mangalarga Marchador. A presença do alelo recessivo O não foi detectada nesse estudo.
3. A amostra de Mangalarga Marchador se encontra em equilíbrio para os dois loci, entretanto, devido ao reduzido tamanho da amostra estudada, não nos é permitido concluir sobre o significado desse resultado.
4. Não foi detectado polimorfismo para as enzimas PGD e PHI, estando esse resultado de acordo com a literatura, onde as formas variantes dessas enzimas são consideradas raras para a maioria das raças de eqüinos.
5. O estudo de polimorfismo do DNA revelou a importância da combinação de método e suporte de hibridização na

maximização dos resultados com sondas radioativas.

Entre os métodos testados as hibridizações a 65°C e a 68°C foram as que resultaram em melhores padrões de restrição de DNA.

6. A maior eficiência dos suportes de nylon modificados foi demonstrada, tendo sido observadas diferenças significativas na qualidade da imagem autorradiográfica mesmo entre diferentes preparações de nylon positivamente carregados.
7. A análise de RFLPs demonstrou a ocorrência de polimorfismos entre e dentro das raças Mangalarga Marchador e pôneis Shetland, detectados pela sonda pES3. O grau de polimorfismo do DNA para essa sonda não difere muito daquele observado para os sistemas de proteínas, entretanto a possibilidade de se obter um número maior de polimorfismos através do uso de outras enzimas de restrição constitui a grande vantagem desse marcador.
8. O uso de sondas de fragmentos ao acaso de banco genômico foi capaz de produzir resultados semelhantes aos obtidos com sondas de cDNA na literatura. Essa estratégia permite a descoberta de novos polimorfismos e a ampliação do universo de marcadores genéticos disponíveis para o mapeamento genômico, identificação animal e estudo de correlações com caracteres produtivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L.; ARNASON, Th.; SANDBERG, K. Biochemical polymorphism in relation to performance in horses. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 73: 419-427, 1987.
- ANDERSSON, L.; JUNEJA, R. K.; SANDBERG, K. Genetic linkage between the loci for phosphohexose isomerase (PHI) and a serum protein (XK) in horses. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxsford, 14: 45-50, 1983a.
- ANDERSSON, L. & SANDBERG, K. A linkage group composed of three coat color genes and three serum protein loci in horses. **Journal of Heredity**, Washington, 73: 91-94, 1982.
- ANDERSSON, L.; SANDBERG, K.; ADALSTEINSSON, S.; GUNNARSSON, E. Linkage of the equine serum esterase (Es) and mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase (GOTm) loci. **Journal of Heredity**, Washington, 74: 361-364, 1983b.
- ANDRESEN, E. & JENSEN, P. Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and the PHI (phosphohexose isomerase) locus in pigs of the Danish Landrace breed. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, 29: 502-504, 1977.

- ARBER, W. Host-controlled modifications of bacteriophage. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, 19: 365-378, 1965.
- ARIZA, A.; ANDRES, D. F.; AGUILAR, P.; ALVAREZ, A.; GARZON, R. Polimorfismos bioquímicos en caballos. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, 28: 221-240, 1979.
- BECK, S. L. **Equinos: raças, manejo, equitação**. 2ª.ed. São paulo, Editora dos Criadores, 1989. 703p.
- BECKMANN, J. S.; KASHI, Y; HALLERMAN, A. N.; SOLLER, M. Restriction fragment lenght polymorphism among Israeli Holstein-Friesian dairy bulls. **Animal Genetics**, Oxford, 17: 25-38, 1986.
- BECKMANN, J. S & SOLLER, M. Restriction fragment lenght polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 67: 35-43, 1983.
- BENGTTSSON, S. & SANDBERG, K. A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, 4: 83-87, 1973.
- BISHOP, D. & SKOLNICK, M. H. Numerical considerations for linkage studies using polymorphic DNA markers in humans. **Bambury Rep 4: cancer incidence in defined populations**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1980. p. 421-433.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using

- restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, 32: 314-331, 1980.
- BOUQUET, Y.; VAREWYCK, H.; Van de WEGUE, A.; Van ZEVEEREN, A. Une étude du cheval de trait belge par les systèmes marqueurs de substances sanguines. **Annales de Medecine Veterinaire**, Brussels, 131: 633-643, 1987.
- BOWLING, A. T. & CLARK, R. S. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, 16: 93-108, 1985.
- BOWLING, A. T. & CLARK, R. S. Excess of heterozygotes at albumin locus in American Standardbred horses. **Animal Genetics**, Oxford, 19: 331-341, 1988.
- BOWLING, A. T. & RYDER, O. A. Genetic studies of blood markers in Przewalski's horses. **Journal of Heredity**, Washington, 78: 75-80, 1987.
- BOWLING, A. T. & WICTUM, E. Preliminary evidence for a fourth allele at the phosphohexose isomerase (Phi) locus of horse erythrocytes. **Animal Genetics**, Oxford, 19: 47-49, 1988.
- BRAEND, M. Genetics of horse acidic prealbumins. **Genetics**, Princeton, 65: 495-503, 1970.
- BRAEND, M. & EFREMOV, G. Haemoglobin, haptoglobin and albumins of horses. In: **EUROPEAN CONFERENCE ON ANIMAL BLOOD GROUPS AND BIOCHEMICAL POLYMORPHISM**, 9., Prague, 1964. **Proceedings**. House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1965. p. 253-259.

- BRILES, W. E. & ALLAN, C. P. The blood group system of chicks II. The effects of genotype on lineability and egg production in several commercial inbred lines. **Genetics, Princeton, 46: 1273-1294, 1961.**
- BRILES, W. E.; STONE, H. A.; COLE, R. K. Marek's disease: effects of β histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. **Science, Washington, 195: 193-195, 1977.**
- BURR, B.; EVOLA, S. V.; BURR, F. A.; BECKMANN, J. S. The applications of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: SETLOW, J. K. & HOLLAENDER, A. (eds.) **Genetic engineering, principles and methods, vol 5. Plenum Press, New York, 1983. p.45-59.**
- CHAKRABORTY, R.; MEAGHER, T. R.; SMOUSE, P. E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. **Genetics, Princeton, 118: 527-536, 1988.**
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Washington, 69: 2110-2114, 1972.**
- COTHRAN, E. G.; Mac CLUER, J. W.; WEITKAMP, L. R.; BAYLEY, E. Genetic differentiation associated with gait within American Standardbred horses. **Animal Genetics, Oxford, 18: 285-296, 1987.**

- FILDES, R. A.; PARR, C. W. Human red-cell phosphogluconate dehydrogenases. *Nature*, London, **30(4909)**: 890-891, 1963.
- GAHNE, B. Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterase of horses. *Genetics*, Princeton, **53**: 681-694, 1966.
- GEORGES, M.; LEQUARRÉ, A. S.; HANSET, R.; VASSART, G. Restriction fragment length polymorphic markers in the Belgian White and Blue breed. *Animal Genetics*, Oxford, **18(suppl. 1)**: 77-78, 1987.
- GIANNI, A. M.; BREGNI, M.; CAPPELLINI, M.D.; FIORELLI, G.; TARAMELLI, R.; GIGLIONI, B.; COMI, P.; OTTOLENGUI, S. A gene controlling fetal hemoglobin expression in adults is not linked to the non- α globin cluster. *E M B O Journal*, Oxford, **2**: 911-925, 1983.
- GRDZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, **39**: 439-446, 1974.
- HANSEN, M. P.; Van ZANDT, J. N.; LAW, G. R. J. Differences in susceptibility to Marek's disease in chickens carrying two different β locus bloodgroup alleles. *Poultry Science*, Ithaca, **46**: 1268, 1967.
- JEFFREYS, A. J. Hypervariable DNA and genetic fingerprints. In: LERMAN, L. S. *DNA probes: applications in genetic and infectious disease and*

cancer. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
p. 57-61.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L.
Individual-specific "fingerprints" of human DNA.
Nature, London, 316: 76-79, 1985.

KAMINSKI, M.; GAJOS, E. Comparative examination of
carboxylic esterases in sera of horse, donkey and their
hybrids. **Nature, London, 201: 716-718, 1964.**

KAMINSKI, M.; Van de WEGHE, A.; BOUQUET, Y.; PODLIACHOUK,
L. Marqueurs génétiques sanguins chez les chevaux de
trait en France. **Annales de Génétique et de
Sélection Animale, Versailles, 8: 449-460. 1976.**

KELLY, T. J. & SMITH, H. O. A restriction enzyme from
Haemophilus influenzae. II. Base sequence of the
recognition site. **Journal of Molecular Biology,**
London, 51: 393-409, 1970.

McDERMID, M. C.; AGAR, N. S.; CHAI, C. K.
Electrophoretic variations of red cell enzyme systems
in farm animals. **Animal Blood Groups Biochemical
Genetics, Oxford, 6: 127-174, 1975.**

MONTGOMERY, R.; DRYER, R. L.; CONWAY, T. W.; SPECTOR, A.
A. Protein structure. In: MONTGOMERY, R. et alii.
Biochemistry: a case oriented approach. 4.ed. St.
Louis, Mosby, 1983. cap.2, p.62 - 63.

NEIMANN-SØRENSEN, A.; ROBERTSON, A. The association
between blood groups and several production
characteristics in three Danish cattle breeds. **Acta
Agriculturae Scandinavica, Stockholm, 11: 163-169, 1961.**

- OKI, Y.; OLIVER, W. T.; FUNNEL, H. S. Multiple forms of cholinesterase in horse plasma. **Nature**, London, **203**: 605-606, 1964.
- OP'T HOF, J.; OSTERHOFF, D. R. Isoenzyme polymorphism of 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) in the family Equidae. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, **4**: 111-113, 1973.
- OURAGH, L. Les variants électrophorétiques protéiques chez le cheval. Une mise au point. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Maisons Alfort, **163**(1): 57-65. 1987.
- PETIT, C. & AUDEVAL-GÉRARD, C. Contrôle de filiation chez les animaux domestiques: Apports de la biologie moléculaire. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, **139**(9): 819-825, 1988.
- PODLIACHOUK, L.; KAMINSKI, M.; Van de WEGHE, A.; BOUQUET, Y.; ZWOLINSKI, J.; SIUDZINSKI, S. Marqueurs génétiques sanguins chez les chevaux de course. **Annales de Génétique et de Sélection Animale**, Versailles, **7**(4): 339-355, 1975.
- RASMUSEN, B. A. Linkage of genes for PHI, halothane sensitivity, A-O inhibition, H red blood cell antigen and 6-PGD variants in pigs. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, **12**: 207-209, 1981.
- REED, K. C. & MANN, D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. **Nucleic Acids Research**, London, **13** (20): 7207-7221, 1985.

- RIBEIRO, D. B. **O cavalo: raças, qualidades e defeitos.**
Rio de Janeiro, Globo, 1988. 318p.
- SAISON, R. & GIBLETT, E. R. 6-Phosphogluconic dehydrogenase polymorphism in the pig. **Vox Sanguinis**, Basel, 16: 514-516. 1969
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Analysis and cloning of eukariotic genomic DNA. In: SAMBROOK, J. *et alii* **Molecular cloning, a laboratory manual** 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. vol.2, cap. 9.
- SANDBERG, K. A third allele in the horse albumin system. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, 3: 207-210, 1972.
- SANDBERG, K. Phosphohexose isomerase polymorphism in horse erythrocytes. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, 41: 79-82, 1973.
- SANDBERG, K. Linkage between the K blood group locus and the 6-PGD locus in horses. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics**, Oxford, 5: 137-141, 1974.
- SANDBERG, K. & ANDERSSON, L. Genetic linkage in the horse. I Linkage relationships among 15 blood marker loci. **Hereditas**, London, 100: 199-208, 1984.
- SANDBERG, K. & BENGTSSON, S. Polymorphism of hemoglobin and 6-phosphogluconate dehydrogenase in horse erythrocytes. In: EUROPEAN CONFERENCE ON ANIMAL BLOOD GROUPS AND BIOCHEMICAL POLYMORPHISM, 12., Budapest, 1970. **Proceedings**. Budapest, Akademiai Kiado, 1972. p. 525-531.

SANDBERG, K. & JUNEJA, R. K. Close linkage between the albumin and Gc loci in the horse. *Animal Blood Groups. Biochemical Genetics*, Oxford, 9: 169-173, 1978.

SCOTT, A. M. Improved separation of polymorphic esterases in horses. In: EUROPEAN CONFERENCE ON ANIMAL BLOOD GROUPS AND BIOCHEMICAL POLYMORPHISM, 12., Budapest, 1970. *Proceedings*. Budapest, Akademiai Kiado, 1972. p. 551-553.

SMITH, G. R.; KUNES, S. M.; SCHULTZ, D. W.; TAYLOR, A.; TRINAN, K. L. Structure of chi hotspots of generalized recombination. *Cell*, Cambridge, 24: 429-436, 1981.

SMITH, H. O. & WILCOX, K. W. A restriction enzyme from *Haemophilus influenza*. I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*, London, 51: 379-391, 1970.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum of normal human adults. *Biochemical Journal*, London, 61: 620-641, 1955.

SOLOMON, E. BODMER, W. F. Evolution of sickle variant gene. *Lancet*, London, 8122: 923, 1979.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, London, 98: 503-517, 1975.

STEINMETZ, M.; STEPHAN, D.; LINDAHL, K. F. Gene organization and recombinational hotspots in the murine

- major histocompatibility complex. *Cell*, Cambridge, 44: 895-904, 1986.
- STORMONT, C. & SUZUKI, Y. Genetic control of albumin phenotypes in horses. *Proceedings Soc. Exp. Biol. and Med.* 114: 673-675, 1963.
- STORMONT, C. & SUZUKI, Y. Paternity tests in horses. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, 55: 365-377, 1965.
- THEILMANN, J. L.; SKOW, L. C.; BAKER, J. F.; WOMACK, J. E. Restriction fragment length polymorphisms for growth hormone, prolactin, osteonectin, α crystallin, γ crystallin, fibronectin and 21-steroid hydroxylase in cattle. *Animal Genetics*, Oxford, 20: 257-266, 1989.
- TORRES, A. P. *Melhoramento dos rebanhos*. São Paulo, Edições Melhoramento, 1947. 243p.
- TROMMERSHAUSEN-SMITH, A. Linkage of tobiano coat spotting and albumin markers in a pony family. *Journal of Heredity*, 69: 214-216, 1978.
- WEITKAMP, L. R. & ALLEN, P. Z. Evolutionary conservation of equine Gc alleles and of mammalian Gc/albumin linkage. *Genetics*, Princeton, 92: 1347-1354, 1979.
- WEITKAMP, L. R., COSTELLO, L. P.; GUTTORMSEN, S. A. Equine marker genes: polymorphism for haptoglobin and assignment of the locus for haptoglobin to equine linkage group II. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics*, Oxford, 16(suppl. 1): 78-79, 1985.
- WEITKAMP, L. R.; MAC CLUER, J. W.; GUTTORMSEN, S. S.; KING, R. H. Standardbred stallion gene transmission

for twelve protein systems: evidence for selection in trotters. *Animal Genetics*, Oxford, 19: 317-330, 1988

YOUNG, W. J. X-linked electrophoretic variation in 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, Washington, 57(2): 58-60, 1966.