

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**AYLTON BARTHOLAZZI JUNIOR**

**MEDIDAS LINEARES E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LCORL* E  
*LASP1* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A ALTURA DE EQUINOS DA RAÇA PÔNEI  
BRASILEIRO**

**Campos dos Goytacazes, RJ**

**Abril, 2015**

**AYLTON BARTHOLAZZI JUNIOR**

**MEDIDAS LINEARES E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LCORL* E  
*LASP1* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A ALTURA DE EQUINOS DA RAÇA PÔNEI  
BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.

**Profa: Celia Raquel Quirino**

**Campos dos Goytacazes, RJ**

**Abril, 2015**

**AYLTON BARTHOLAZZI JUNIOR**

**MEDIDAS LINEARES E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LCORL* E *LASP1* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A ALTURA DE EQUINOS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Em 08 de abril de 2015**

**Banca examinadora**

---

Profa. Celia Raquel Quirino (Doutora em Ciência Animal) – UENF Orientadora

---

Prof. Bruno Fagundes (Doutor em Ciência Animal) – UNIG

---

Profa. Ana Bárbara Freitas Rodrigues (Doutora em Produção Animal) – UENF

---

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (Doutor em Ciência Animal) – UENF

*Aos meus pais Aylton e Ernestina e  
minhas irmãs Michele e Milene pelo  
amor e confiança.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, que sempre esteve comigo, especialmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Aylton e Ernestina, que desde sempre me orientaram com amor, carinho e dedicação; pelo incentivo e referência, principalmente na formação do meu caráter.

Às minhas irmãs Michele e Milene, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À minha brilhante orientadora Prof<sup>a</sup>. Celia Raquel Quirino, pela orientação, dedicação, ensinamentos e amizade, o que serei grato eternamente.

Aos amigos do LRMGA – Biologia Molecular: Aline Pacheco, Amanda, Ana Carolina, Carol, Claudia, Déwany, Gleice, Julia, Miguel, Thiago e Wilder, pela colaboração, em sanarem todas as minhas dúvidas; pelo carinho e amizade com que convivemos.

À minha amada Mariana, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, confiança, paciência e compreensão dos momentos de ausência; mas principalmente, pelo imprescindível companheirismo durante todo este longo percurso.

Não só aos meus amigos adquiridos nesta caminhada, mas também, aos de república: Daniel, Jean, Marlon, Sérgio e Weverton; pelas conversas e momentos de descontração, e pela grande amizade e confiança que se formou durante todos esses anos.

A todos os Professores da UENF, que me deram as informações necessárias para a formação do conhecimento.

Aos Professores Dr. Bruno Fagundes, Dra. Ana Bárbara e Dr. Frederico por colaborarem fazendo parte da banca de defesa de tese.

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi caracterizar os pôneis da raça Pônei Brasileiro através de medidas lineares, avaliar o efeito do sexo, analisar mutações no gene *LCORL* e *LASP1* e suas associações com a estatura em equinos da raça Pônei Brasileiro. Durante os anos de 2011 e 2014 foram estudadas 14 medidas lineares, os índices corporais destas medidas em relação à altura da cernelha, diferentes índices morfológicos e o sistema eclético de proporções lineares de 214 animais adultos da raça Pônei Brasileiro. Foram coletadas amostras de pelo da base da cauda e genotipados um total de 124 equinos, 115 animais da raça Pônei Brasileiro de dois Haras do norte do estado do Rio de Janeiro e, 9 animais de alta estatura utilizados como controle para o estudo de associação com os marcadores moleculares. Os pôneis apresentaram estatura média de 0,845m na altura da cernelha. O dimorfismo sexual foi observado através dos índices das medidas lineares significativamente entre machos e fêmeas adultas. Foi realizada a amplificação dos fragmentos de DNA pela técnica da reação em cadeia da polimerase; após a amplificação foi realizada a digestão com enzima de restrição e foram submetidas à eletroforese capilar para a discriminação alélica por tamanho e identificação do polimorfismo. O SNP do gene *LCORL* mostrou efeito significativo ( $P < 0,05$ ) para o genótipo C/C na altura dos equinos. O SNP do gene *LASP1* não apresentou associação com a altura da cernelha dos pôneis. A identificação de SNPs em genes de menor efeito é necessária para permitir a seleção de equinos pôneis para uma menor estatura.

**Palavras chaves:** Associação Genômica, Caracterização Sexual, Dimorfismo, Medidas Corporais, SNP.

**Abstract:** The aim of this paper was to characterize the ponies of Ponei Brasileiro breed through linear measurements to evaluate the effect of gender, to analyze mutations in the gene LCORL e LASP1 and their associations with height in ponies of Ponei Brasileiro breed. During 2011 and 2014 it was made a study in 214 adult ponies about fourteen linear measurements, the body indexes of these measurements according to height at the withers, different morphological indexes and the eclectic system of linear proportions. Fur samples were collected from the base of tail and a total of 124 horses were genotyped: 115 ponies of Ponei Brasileiro breed from two ranch in the north of Rio de Janeiro state and 9 tall horses were used as control group to the study of molecular markers association. The medium stature of ponies was 0.845 in height at the withers. The sexual dimorphism was significantly observed between adult males and females using the linear measurements indexes. The amplification of DNA fragments was made using the Polymerase Chain Reaction technique; then the digestion was made using restriction enzyme and they were submitted to capillary electrophoresis technique in order to determine the allele by size and to identify the polymorphism. The SNP of LCORL gene had significant effect ( $P < 0.05$ ) for C/C genotype in horse's height. The SNP of LASP1 gene had no relation with height at the withers in ponies. The identification of SNPs in genes with lower effect is important to allow the selection of ponies for a lower stature.

**Key words:** Genomics association, Sexual characterization, Dimorphism, Body measurements, SNP

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>7</b>
1. Introdução.....	7
2. Objetivo.....	9
3. Revisão Bibliográfica.....	10
4. Referências bibliográficas.....	21
<b>CAPITULO 2: MEDIDAS LINEARES DE PÔNEIS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO.....</b>	<b>26</b>
Resumo.....	26
1. Introdução.....	27
2. Material e Métodos.....	28
3. Resultados e Discussão.....	34
4. Conclusão.....	44
5. Referências bibliográficas.....	45
<b>CAPITULO 3: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES <i>LCORL</i> E <i>LASP1</i> E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A ALTURA DE EQUINOS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO.....</b>	<b>47</b>
Resumo.....	47
1. Introdução.....	48
2. Material e Métodos.....	50
3. Resultados e Discussão.....	56
4. Conclusão.....	71
5. Referências bibliográficas.....	72



## CAPITULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

A população mundial de equinos manteve-se estável nas últimas décadas. É estimada atualmente em 58,472 milhões de equinos. No continente Americano, encontra-se mais da metade do rebanho mundial com 32,388 milhões de cabeças (FAO, 2011).

Antigamente a necessidade de utilização de tração animal em túneis e em minas iniciou a seleção e criação dos cavalos pôneis. Hoje, no Brasil, se destacam os equinos da raça Pônei Brasileiro. Em exposições e campeonatos é avaliado inicialmente o andamento por trás, de perfil e pela frente com dinâmica ao trote, visando apenas identificar problemas de locomoção e andamento, bem como desvios acentuados de aprumos. Logo após segue-se para o julgamento morfológico de acordo com o padrão racial (ABCCPÔNEI)

Originado do cruzamento das raças Shetland da Escócia, dos Falabella da Argentina, além de alguma influência de animais oriundos do Paraguai e Uruguai (ABCCPÔNEI), os pôneis da raça Pônei Brasileiro se difundiram pelo território nacional levando a fundação da Associação Brasileira dos Criadores do Cavallo Pônei – ABCCPÔNEI, com o estabelecimento dos padrões raciais e iniciando o livro de registros dos animais.

O cavalo pônei é muito procurado para sua utilização no lazer de crianças e na equoterapia por apresentar um porte pequeno que diminui os riscos de acidentes. São escassos os trabalhos de morfologia em pôneis, Costa *et al.*, (1998) e Quirino *et al.*, (2012) relataram mensurações no momento do registro dos animais.

O tamanho do corpo é um importante parâmetro para estudar as influências genéticas sobre as características quantitativas, e tem sido intensamente estudada em humanos e também em animais domésticos (SIGNER-HASLER *et al.*, 2012; METZGER *et al.*, 2013). Em equinos, o tamanho do corpo é um critério importante e

crucial para a classificação e avaliação de diferentes raças e a altura apresenta grande influência na aparência e função.

Estatura em todos os organismos é a interação aditiva de dezenas, se não centenas, de genes dentro de um indivíduo que determina a sua altura adulta final. Este caráter poligênico é principalmente devido à genética (80 - 90%) e é apenas ligeiramente afetada por outros fatores ambientais. Esta altura adulta tem mostrado ser bastante variável dentro de certas populações isoladas de espécies animais, incluindo os seres humanos (EBERTH, 2013).

Para a seleção dos cavalos pôneis e determinação do potencial dos reprodutores é necessário à mensuração e registro das medidas lineares dos animais, para dar suporte aos programas de seleção por tamanho do animal; sendo assim, este trabalho tem como objetivo de caracterizar os equinos da raça Pônei Brasileiro através de medidas lineares e analisar mutações no gene *LCORL* e *LASP1* e, suas associações com a estatura em equinos da raça Pônei Brasileiro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar os equinos da raça Pônei Brasileiro através de medidas lineares e analisar mutações no gene *LCORL* e *LASP1* e suas associações com a estatura em equinos da raça Pônei Brasileiro.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os equinos da raça Pônei Brasileiro através de 14 medidas lineares;
- Estimar as correlações entre as medidas lineares;
- Genotipar equinos da raça Pônei Brasileiro para mutações nos genes *LCORL* e *LASP1*;
- Determinar os genótipos na população e estimar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos nos locos;
- Verificar o efeito dos polimorfismos supracitados sobre a altura dos equinos e;
- Indicar aos criadores o direcionamento dos acasalamentos para obtenção de animais de menor porte.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A EQUINOCULTURA E A RAÇA PÔNEI BRASILEIRO

Segundo dados do IBGE (2011) o efetivo de equinos no Brasil foi de 5,508 milhões de cabeças em 2011, apresentando certa estabilidade em relação ao ano anterior com uma queda de -0,1%. A região Sudeste possui o maior rebanho, com 1,344 milhões de cabeças, 24,40% do total nacional.

O complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, desempenhando as funções de sela, carga e tração (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Segundo Lima *et al.*, (2006) o cavalo se destina a diferentes atividades como para o trabalho, no uso militar, e principalmente, nas diferentes atividades agropecuárias como o manejo do gado.

Através da equoterapia o cavalo é utilizado também como recurso terapêutico no tratamento de portadores de dificuldades nas áreas cognitiva, psicomotora e sócio-afetiva. Outra atividade realizada de longa data é o esporte equestre com diferentes modalidades e com crescimento expressivo em todo o mundo. Existem ainda outras atividades como o turismo equestre, escolas de equitação, Jockey Clubs, exposições e eventos (LIMA *et al.*, 2006).

Dentre as atividades empregadas, o uso da tração animal antigamente era indispensável para o homem. A seleção e criação dos cavalos pôneis teve seu início, porque a extração em minas com passagens estreitas e baixas, exigia cavalos fortes e bem pequenos.

Os pôneis da Raça Pônei Brasileiro descendem dos “Shetland” da Escócia, dos “Falabella” da Argentina, além de alguma influência de animais oriundos do Paraguai e Uruguai (ABCCPÔNEI).

Em 1970, foi criada a Associação Brasileiro de Criadores do Cavalo Piquira e Pônei, hoje denominada como Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Pônei - ABCCPÔNEI (BERGMANN *et al.*, 1998) que iniciou o livro de registro dos animais no Brasil.

Os equinos da raça Pônei Brasileiro apresentam massa e forma harmoniosa, ágil, de bom temperamento para o serviço, dócil, com proporções equilibradas entre a altura da cernelha e o comprimento do corpo. Frente ativa e leve, bem aprumado e com angulações de membros que favoreçam uma boa liberdade de movimentos ao passo, ao trote e ao galope (ABCCPÔNEI).

Como padrão racial, a sua altura não pode ultrapassar 1,00m para machos e 1,10m para fêmeas, sendo a estatura ideal 0,90m. Possuem cabeça de forma triangular com orelhas pequenas e bem implantadas, olhos vivos e expressivos, narinas delicadas, abertas e flexíveis. Seu pescoço tem comprimento e musculatura proporcionais com crinas fartas e sedosas. Tronco forte e compacto com dorso-lombo curto, reto e forte, garupa bem musculada, de forma arredondada e harmoniosamente ligada ao lombo. Membros proporcionais, fortes e bem aprumados (ABCCPÔNEI).

### 3.2. MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores genéticos são caracteres de herança mendeliana simples, em que o padrão fenotípico individual pode ser experimentalmente determinado, de modo a permitir que a segregação do *locus* marcador responsável pelo caráter seja acompanhada (REGINATO & VENERONI, 2009).

Segundo Bered *et al.*, (1997) estes marcadores genéticos podem ser divididos em dois grupos básicos; marcador morfológico e marcador molecular. O marcador molecular baseia-se nas mutações de sequências nucleotídicas dentro do genoma do indivíduo, que são os marcadores mais confiáveis disponíveis. Eles podem ser utilizados para investigar as variações genéticas no DNA entre: diferentes populações, indivíduos da mesma população e até mesmo de raças diferentes. A sua vantagem é ser capaz de encontrar variações genéticas de forma rápida e

direta, por isso têm-se desenvolvido rapidamente, e eles estão se tornando cada vez mais informativos (YANG *et al.*, 2013).

Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta capaz de detectar variações genéticas no DNA. Esses marcadores são numerosos e distribuídos por todo o genoma, possuem herança mendeliana e, geralmente expressam caráter co-dominante e muitas vezes são multialélicos (YANG *et al.*, 2013).

Segundo Garcia & Porto-Neto (2006) com a capacidade de cobrir todo o genoma animal, os marcadores moleculares têm sido usados como ferramenta útil no melhoramento animal, na seleção, nos testes de paternidade, na identificação e estimativa da distância genética entre animais.

A maioria das características de interesse econômico apresenta o padrão de herança poligênica, sendo determinadas por inúmeros genes de grande e/ou de pequeno efeito individuais e sob forte influência de fatores ambientais (COUTINHO *et al.*, 2010).

Uma das vantagens do uso de marcadores moleculares em programas de seleção é a de apresentar o potencial de complementar a seleção clássica. As principais vantagens na sua utilização estão relacionadas à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, uma vez que esta tecnologia emprega amostras de DNA, permitindo análises desde momentos imediatamente após o nascimento (GARCIA & PORTO-NETO, 2006).

Com o desenvolvimento das técnicas de análise de DNA, a possibilidade de analisar variações individuais nas sequências de DNA, independentemente de corresponderem a um peptídeo ou não, permitiu o desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares (REGINATO & VENERONI, 2009).

De forma geral, os marcadores moleculares podem ser basicamente classificados em duas categorias: marcadores baseados em técnicas de hibridização e marcadores baseados em técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (POLIDO *et al.*, 2012).

Os marcadores moleculares obtidos por hibridização são a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) e locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* ou variação de número de sequência repetidas em *tandem* - Minissatélites). Uma série de marcadores moleculares foi desenvolvida a partir da técnica dePCR, dentre eles os STR (*Short Tandem Repeats* ou microssatélites ou SSR – *Simple Sequence Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de base única), RAPD (*Random Amplified Polymorphism* ou polimorfismo de DNA arbitrariamente amplificado), entre outros (COUTINHO *et al.*, 2006).

### 3.3. MARCADORES SNPs

Atualmente, uma variedade de projetos de sequenciamento de DNA está em andamento, o que permitiu a descoberta de diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Os SNPs envolvem a substituição de um nucleotídeo por outro, a adição ou deleção de um ou de alguns nucleotídeos. Para que a variação seja considerada um SNP, ela tem que ocorrer em pelo menos 1% da população (BORÉM & CAIXETA, 2009). Há uma série de fatores para o crescente interesse no uso de SNPs como marcadores para análises genéticas.

Os SNPs localizados em regiões codificantes podem afetar diretamente a função da proteína. Foi também descoberto que muitos íntrons codificam RNAs intrônicos, cuja função mais provável é regular a expressão de proteínas reguladoras da transcrição genômica (NAKAYA *et al.*, 2007), colocando-os em igual importância com os SNPs localizados nas regiões codificantes. Esses SNPs podem ser diretamente responsáveis por algumas das variações entre os indivíduos nas características de grande importância (YANG *et al.*, 2013).

Nos SNPs a mutação ou polimorfismo mais comum encontrado nos alelos é a substituição de uma base nucleotídica por outra e pequenas inserções ou deleções que diferenciam os alelos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 2009); esta característica permite pequenas variações entre os alelos e algumas vezes ocasionam variação na tradução e expressão do gene.

Este marcador tem permitido o desenvolvimento de novas metodologias e estratégias para o mapeamento de genes de interesse e são extremamente úteis para promover o mapeamento fino, onde o objetivo é delimitar a menor região genômica que contém um QTL (Locos de Características Quantitativas) (CARLSON *et al.*, 2004).

Estes marcadores representam uma abordagem mais interessante para estudos de genotipagem, pois são geneticamente estáveis e passíveis de automatização (VIGNAL *et al.*, 2002) e são encontrados em abundância no genoma.

Segundo Kim e Misra (2007), para genotipagem dos SNPs os métodos mais utilizados são de extensão de *primer*, hibridização, ligação e clivagem enzimática.

Segundo Kwok (2001), a metodologia de extensão de *primer* pode ser agrupada em duas classes. Na primeira é utilizada uma adaptação do sequenciamento, com o emprego de didesoxinucleotídeos (ddNTPs), para identificação do nucleotídeo polimórfico com um *primer* comum para amplificação de ambos os alelos. A segunda classe consiste numa PCR alelo-específica, em que a DNA polimerase amplifica o DNA alvo somente se os *primers* forem perfeitamente complementares ao sítio do DNA alvo, utilizando-se assim *primers* específicos para detectar cada alelo.

A metodologia de hibridização baseia-se na utilização de sondas (pequenos fragmentos de DNA) que correspondente a fita simples da região do SNP do indivíduo (VEGA *et al.*, 2005). A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas marcadas específicas para cada alelo e visualizadas pela detecção de fluorescência.

A metodologia da ligação é possível, pois quando dois oligonucleotídeos hibridizam perfeitamente a uma fita simples de DNA, a enzima DNA-ligase tende a uni-los e formar um único nucleotídeo. A reação consta de três sondas, sendo duas alelo específicas marcadas cada uma com um corante fluorescente distinto e a terceira com biotina ligada, que se combinará à sonda alelo específica (LANDEGREN *et al.*, 1988). Quando ocorre ligação perfeitamente complementar de uma sonda alelo específica e, a ligação da sonda com biotina, a enzima DNA-ligase



as une, formando um único fragmento e passível de identificação por eletroforese capilar.

Algumas enzimas reconhecem sequências específicas do DNA e efetuam clivagem nesse ponto, são as chamadas enzimas de restrição. Essa característica destas enzimas permite a utilização da metodologia de clivagem para genotipagem dos SNPs. Um SNP pode criar ou destruir um sítio de ligação da enzima apresentando fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com o alelo presente (BERGER *et al.*, 2002). Dentro desta metodologia a mais utilizada é a PCR-RFLP, onde realiza uma amplificação loco que se situa a mutação a ser investigada e em seguida realiza a digestão com uma enzima de restrição específica para a região da mutação.

Uma nova tecnologia de análise de marcadores são os chips de SNPs, que permitem a investigação simultânea de grande número de marcadores dispersos em todo genoma do animal, permitindo a identificação de diversos genes que afetam a característica de interesse (WANG E BUCAN, 2008).

Os chips de alta densidade para equinos apresentam mais de 54 mil SNPs distribuído uniformemente sobre todo o genoma. Este ensaio revolucionário reduz o trabalho e potenciais erros de manipulação de amostras, permitindo a avaliação de um grande número de indivíduos em poucas horas (ILLUMINA, 2010).

Esta metodologia se baseia no princípio da hibridação de DNA de fita simples de que as bases nucleotídicas se ligam aos seus parceiros complementares especificamente, A liga-se a T e C liga-se a G. Os chips contém centenas de milhares de sequências de sondas de nucleotídeos únicos. Cada sonda é concebida para se ligar a uma subsequência de DNA alvo e permite a identificação dos alelos apresentados em cada ponto (LAFRAMBOISE, 2009).

### 3.4. SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

A seleção assistida por marcadores (Marker Assisted Selection - MAS) permite a seleção assistida de genes (FRANCO & MELO, 2006). A SAM é o processo decisório de escolha com base nos dados fenotípicos e moleculares que indica quais animais serão pais da próxima geração.

A eficiência das técnicas tradicionais de seleção, principalmente das características quantitativas, é bastante limitada; a SAM veio para aumentar a acurácia e facilitar a seleção de determinadas características de difícil seleção, como nas características de difícil mensuração, de baixa herdabilidade, na seleção de animais cujo sexo não permite a expressão da característica de interesse, ou para aquelas que se expressam tardiamente na vida do animal (WEIMER, 2003).

Van Eenennaam (2007), também ressalta que os benefícios da MAS são maiores nas características que têm baixa herdabilidade, nas que são difíceis ou caras para mensurar e nas que não podem ser medidas antes que o animal contribua para dar origem à próxima geração.

A seleção assistida por marcadores possui dois caminhos principais para identificar genes correlacionados com a característica de interesse: a busca do gene principal (gene candidato) e o mapeamento genético (MONTALDO & MEZA-HERRERA, 1998).

A busca do gene principal (candidato) é realizada com base em dois conhecimentos: a avaliação de genes com conhecida expressão de certas proteínas envolvidas na fisiologia da característica ou genes com efeitos detectados na característica em termos estatísticos, os lócus de característica quantitativa (QTLs) (GUIMARÃES *et al.*, 2007). A busca do gene candidato baseia-se no conhecimento prévio dos mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de produção em questão e na tentativa de pesquisar as variações polifórmicas neste gene e associar com níveis de produção. Quando se utiliza um QTL associado com a característica, realiza a investigação dos genes presentes neste loco e associação com a característica.

O segundo caminho para identificar genes correlacionados com a característica de interesse é através do mapeamento genético para identificação de

QTLs. Segundo Polido *et al.*, (2012), o mapeamento genético é a utilização da informação genômica e a associação dos marcadores moleculares a genes que codificam determinadas características. Os vários genes que afetam características quantitativas são individualizados mapeando-os em locais cromossômicos específicos (*loci*). Por essa razão, o termo *locus de característica quantitativa* foi proposto para o mapeamento dos fatores genéticos que afetam o valor de traços quantitativos.

Alguns critérios devem ser seguidos para conduzir com sucesso o mapeamento de genes. Deve-se ter uma população segregante, em desequilíbrio de ligação e contrastante tanto nos locos dos marcadores quanto nos caracteres fenotípicos a serem estudados (BORÉM E CAIXETA, 2009).

Após a obtenção da população inicia-se a construção dos mapas genéticos de ligação, onde realiza uma saturação de marcadores moleculares em todo o genoma e avalia a segregação destes marcadores na progênie. Com base na segregação estima-se estatisticamente as distâncias entre cada marcador utilizado, permitindo identificar a localização de todos os marcadores dispersos nos cromossomos. Com posse dos dados fenotípicos e do mapa de ligação realiza-se as análises estatísticas para identificar quais locos apresentam efeito sobre a característica e qual este efeito (aditiva, dominância parcial, dominância completa, sobredominância e epistasia) (CRUZ *et al.*, 2013).

### 3.5. ESTATURA DOS EQUINOS

O tamanho do corpo é um importante parâmetro para estudar as influências genéticas sobre as características quantitativas e tem sido intensamente estudada em humanos e também em animais domésticos (SIGNER-HASLER *et al.*, 2012; METZGER *et al.*, 2013). Em equinos, o tamanho do corpo é um critério importante e crucial para a classificação e avaliação de diferentes raças e a altura apresenta grande influência na aparência e função.

A estatura em todos os organismos é a interação aditiva de dezenas se não centenas de genes dentro de um indivíduo que determina a sua altura adulta final. Este caráter poligênico é principalmente devido à genética (80 - 90%) e é apenas

ligeiramente afetada por outros fatores ambientais. Esta altura adulta tem mostrado ser bastante variável dentro de certas populações isoladas de espécies animais, incluindo os seres humanos (EBERTH, 2013).

Em humanos já foram identificados mais de 200 locos de pequeno efeito relacionados à estatura (OKADA *et al.*, 2010; LANGO *et al.*, 2010). Estudos de associação genômica ampla em bovinos, equinos e cães, utilizando a informação genética foram eficientes a partir de estudos de associação genômica ampla, sugerindo fortemente que as regiões polimórficas que afetam estatura humana também afetam a estatura nestas espécies domésticas (EBERTH, 2013). Entretanto nos equinos poucos genes podem estar controlando esta característica.

Makvandi-Nejad *et al.*, (2012) realizaram um estudo de associação genômica ampla e identificaram 4 genes que explicam 83% da variação da estatura dos equinos. Foram identificadas mutações nos genes *LCORL*, *HMGGA2*, *ZFAT* e *LASP1* que haviam sido identificados por controlar a altura do humano (*LCORL*, *ZFAT* e *LASP1*) e em cães (*HMGGA2*).

O gene *LCORL* (ligand dependent nuclear receptor corepressor-like) foi associado por diversos autores como influenciando a altura de equinos (MAKVANDI-NEJAD *et al.*, 2012; METZGER *et al.*, 2013; TETENS *et al.*, 2013; BOYKO *et al.*, 2014) bovinos (PRYCE *et al.*, 2011; LINDHOLM-PERRY *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2014), em ovinos (KIJAS, 2014) e em humanos (GUDBJARTSSON *et al.*, 2008; WEEDON *et al.*, 2008; SORANZO *et al.*, 2009; SOVIO *et al.*, 2009; TAKEUCHI *et al.*, 2009; LANGO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010; N'DIAYE *et al.*, 2011; VANDERVALK *et al.*, 2015).

Segundo Metzger *et al.*, (2013), a mutação encontrada no gene *LCORL* está situada no locus do fator de transcrição TFIID, influenciando a transcrição pela RNA polimerase II. O TFIID supostamente desempenha um papel na influência de genes responsáveis para o desenvolvimento dos ossos, podendo os ossos não atingirem o crescimento esperado.

O gene *LASP1* medeia a migração e a sobrevivência de células e a sua expressão é induzida por IGF1 (SIGNER-HASLER *et al.*, 2012). Hermann-Kleiter *et al.*, (2009), identificaram que a expressão do *LASP1* influencia a diferenciação de

condrócitos na coluna vertebral e observou fenótipos em ratos apresentando defeitos da coluna vertebral.

Outro fator que influencia a altura dos equinos é o nanismo, este é considerado um dos defeitos congênitos mais reconhecidos de animais e seres humanos e pode ser hereditária ou esporádica em causa e de expressão determinado por genes diferentes aos associados com a altura dos equinos. Existem duas categorias morfológicas gerais dentro desta doença extremamente diversificada. Estas categorias são: nanismo desproporcional e proporcional. Dentro de cada um destes, existem numerosos fenótipos que têm sido extensivamente descritas em seres humanos, e, em menor grau, em cães, bovinos, ratos, galinhas e outras espécies domésticas (EBERTH, 2013).

As principais alterações observadas nos animais afetados são: o retardo do crescimento fisário de membros e costelas, o crescimento mais rápido da cabeça e do tronco em relação às demais regiões, anormalidades cranianas tais como cabeça desproporcionalmente grande, olhos e órbitas grandes e protuberantes, proporção maior da região frontal em relação à nasal, alterações na oclusão dentária, estreitamento de vias aéreas, encurtamento e deformidades dos membros, ocasionando restrição na flexão ou extensão, articulações com aumento de volume, hiperextensão das articulações metacarpo e/ou metatarsalângicas, baixa estatura desproporcional, deformações progressivas nos cascos e desenvolvimento de artrites, devido à má formação dos membros, alterações na coluna vertebral que podem aparecer tardiamente e tórax mais largo com estreitamento na junção costochondral (BACK *et al.*, 2008; EBERTH, 2013).

O mecanismo que desencadeia este distúrbio de crescimento ainda foi pouco estudado na espécie equina, entretanto acredita-se que o nanismo esteja relacionado com uma herança genética recessiva (BACK *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos atuais foram desenvolvidos na tentativa de elucidar o nanismo. Orr *et al.*, (2010), através da associação genômica ampla comparando 10 animais anões e 10 animais normais identificaram um gene no cromossomo 14 como possível causador do nanismo em equinos Friesian, onde os animais anões apresentavam uma mutação em homozigose neste gene.

Eberth (2013), por sua vez, realizou um estudo de associação genômica ampla comparando 20 equinos com nanismo e 26 pôneis normais, encontrando associação do gene *ACAN* no cromossomo 1, identificando 4 mutações (no exon 2, 6, 11 e 15) que determinam causas diferentes de acordo com as associações destes, variando desde a morte embrionária, animais com nanismo até o nascimento de animais com fenótipos normais.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCCPÔNEI. Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Pônei. Disponível em: <<http://www.ponei.org.br/pag.php?titulo=historia>> Acesso em 20/01/2014.

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.119-129, (supl. especial). 2010.

BACK, W.; LUGT, J.; NIKKELS, P.G.J.; BELT, A.; KOLK, J.; & STOUT, T.A.E. Phenotypic diagnosis of dwarfism in six Friesian horses. Equine Veterinary Journal, v.40, n.3, p. 282-287. 2008.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. Ciência Rural, Santa Maria, v.27, n.3, p.513-520. 1997.

BERGAMANN, J.A.G.; COSTA, M.D.; MOURÃO, G.B. Formação e estrutura genética da raça pônei da raça Brasileira. Revista Brasileira de Zootecnia, v.27, n.3, p.491-497, 1998.

BERGER, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L.; CLARKE, N. D. Biochemistry 6.1: the basic tools of gene exploration. 5.ed. New York: W. H. Freeman, 2002.

BOYKO, A.R.; BROOKS, S.A.; ASHLEY BEHAN-BRAMAN, A.; CASTELHANO, M.; COREY, E. *et al.*, Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in Thoroughbreds. BMC Genomics, v.15, n.259, 2014.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. Viçosa-MG: UFV, 2ed, 2009. 532p.

CARLSON, C.S.; EBERLE, M.A.; KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D.A. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. Nature, v.429, p.446-52, 2004.

COSTA, M.D.; BERGAMANN, J.A.G.; PEREIRA, C.S. *et al.*, Avaliação dos fatores genéticos e de ambiente que interferem nas medidas lineares dos pôneis da raça brasileiras. Revista Brasileira de Zootecnia, v.27, n.3, p.491-497, 1998.

COUTINHO, H.D.M.; MILITÃO NETO, V.; VERDE, L.C. Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v.10, n.2, p.177-188. 2006.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. Estudos Avançados, 24 (70), p.123-147. 2010.

CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C.; BHERING, L.L. Genômica Aplicada. Suprema, Visconde do Rio Branco - MG, xiv, p.424, 2013.

EBERTH, J.E. Chondrodysplasia-like dwarfism in the miniature horse. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da University of Kentucky, 83p. 2013.

FAO- Food and Agriculture Organization. United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em 21/01/2014.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. Edit. Folha de Viçosa, 2009, p. 351-355.

FRANCO, M. M.; MELO, E. O. Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. Brasília. DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 14 p.

GARCIA J.F. & PORTO-NETO L.R. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. Acta Scientiae Veterinariae. 34 (Supl 1): 197-203. 2006.

GUDBJARTSSON, D.F.; WALTERS, G.B.; THORLEIFSSON, G.; STEFANSSON, H.; HALLDORSSON, B.V.; *et al.*, Many sequence variants affecting diversity of adult human height. Nat Genet, n.40, p.609–615, 2008.

GUIMARÃES, E.P.; RUANE, J.; SHERF, B.D.; SONNINO, A.; DARGIE, J.D. Marker-assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish. Food & Agriculture Organization of the United Nations - FAO, Rome, p.471, 2007.

HERMANN-KLEITER, N.; GHAFARI-TABRIZI, N.; BLUMER, M.J.; SCHWARZER, C.; MAZUR, M.A. *et al.*, Lasp1 misexpression influences chondrocyte differentiation in the vertebral column. Int J Dev Biol, n.53, p.983–991, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 39, p.1-63, 2011.

ILLUMINA (2010) EquineSNP50 Genotyping Bead Chips. Data Sheet: SNP Genotyping. San Diego, California.

KIJAS, J.W. Haplotype-based analysis of selective sweeps in sheep. Genome, v.57, n.8, p.433-437, 2014.

KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. Annu. Rev. Biomed. Eng., n.28, p.289-320, 2007.

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 2, p. 235-258, 2001.



LAFRAMBOISE, T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 13. 2009.

LAGE, M.C.G.R.; BERGMANN, J.A.G.; PROCÓPIO, A.M.; PEREIRA, J.C.C.; BIONDINI, J. Associação entre medidas lineares e angulares de equinos da raça Mangalarga Marchador. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.4, p.968-979, 2009.

LANDEGREN, U.; KAISER, R.; SANDERS, J.; HOOD, L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, v 241, n. 4869, p. 1077-1080, 1988.

LANGO, A.H.; ESTRADA, K.; LETTRE, G.; BERNDT, S.I.; WEEDON, M.N. *et al.*, Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*, n.467, p.832–838, 2010.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 250p. 2006.

LINDHOLM-PERRY, A.K.; KUEHN, L.A.; OLIVER, W.T.; SEXTEN, A.K.; MILES, J.R. *et al.*, Adipose and Muscle Tissue Gene Expression of Two Genes (NCAPG and LCORL) Located in a Chromosomal Region Associated with Cattle Feed Intake and Gain. *PLoS ONE*, v.8, n.11, 2013.

LIU, J.Z.; MEDLAND, S.E.; WRIGHT, M.J.; HENDERS, A.K.; HEATH, A.C. *et al.*, Genome-wide association study of height and body mass index in Australian twin families. *Twin Research and Human Genetics*, n.13, p.179–193, 2010.

MAKVANDI-NEJAD, S.; HOFFMAN, G.E.; ALLEN, J.J.; CHU, E.; GU, E.; *et al.*, Four Loci Explain 83% of Size Variation in the Horse. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, e39929, 2012.

METZGER, J.; SCHRIMPF, R.; PHILIPP, U.; DISTL, O. Expression Levels of LCORL Are Associated with Body Size in Horses. *PLoS ONE*, v.8, n.2, 2013.

MONTALDO, H.H.& MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.2, p.83-89, 1998.

NAKAYA, H.I.; AMARAL, P.P. ; LOURO, R.; LOPES, A.; FACHEL, A.; MOREIRA, Y.J.C.B.; EL-JUNDI, T.; DA SILVA, A. M.; REIS, E.M.; VERJOVSKI, A. S. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biology*, v. 8, p. R43, 2007.

N'DIAYE, A.; CHEN, G.K.; PALMER, C.D.; GE, B.; TAYO, B. *et al.*, Identification, replication, and fine-mapping of Loci associated with adult height in individuals of african ancestry. *PLoS Genet*, n.7, 2011.

PRYCE, J.E.; Hayes, B.J.; Bolormaa, Goddard, S.M.E. Polymorphic Regions Affecting Human Height Also Control Stature in Cattle. *Genetics*, n.187, p.981–984, 2011.

OKADA, Y.; KAMATANI, Y.; TAKAHASHI, A.; MATSUDA, K.; HOSONO, N.; *et al.*, A genome-wide association study in 19 633 Japanese subjects identified LHX3-QSOX2 and IGF1 as adult height loci. *Hum Mol Genet* 19: 2303–2312, 2010.

ORR, N.; BACK, W.; GU, J.; LEEGWATER, P.; GOVINDARAJAN, P.; CONROY, J. & BRAMA, P.A.J. Genome-wide SNP association–based localization of a dwarfism gene in Friesian dwarf horses. *Animal Genetics*, v. 41, s. 2, p. 2-7, 2010.

POLIDO, P.B.; FERREIRA, F.G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S.G.H. de. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR, Umuarama*, v. 15, n. 2, p. 161-169, jul./dez. 2012.

QUIRINO, C.R.; MATOS, L.F.; BARTHOLAZZI JÚNIOR, A.; CASTRO, T. DE; SILVA, R.C; SILVA, J.L.L. Caracterização de pôneis da raça Brasileira através de medidas lineares. *Actas Iberoamericanas de Consevación Animal*, v.2, p.71-74, 2012.

REGITANO, L.C.A. & VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. *Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil*. 2009.

SIGNER-HASLER, H.; FLURY, C.; HAASE, B.; BURGER, D.; SIMIANER, H.; *et al.*, A genome-wide association study reveals Loci influencing height and other conformation traits in horses. *PLoS ONE*, n.7, 2012.

SOVIO, U.; BENNETT, A.J.; MILLWOOD, I.Y.; MOLITOR, J.; O'REILLY, P.F.; *et al.*, Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern Finland birth cohort 1966. *PLoS Genet*, n.5, 2009.

SORANZO, N. *et al.*, Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel Loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS Genet.*, v.5, n.4, 2015.

TAKEUCHI, F.; NABIKA, T.; ISONO, M.; KATSUYA, T.; SUGIYAMA, T. *et al.*, Evaluation of genetic loci influencing adult height in the Japanese population. *J Hum Genet*, n.54, p.749–752, 2009.

TETENS, J.; WIDMANN, P.; KÜHN, C.; THALLER, G. A genome-wide association study indicates LCORL/NCAPG as a candidate locus for withers height in German Warmblood horses. *Anim Genet.*, v.44, n.4, p.467-71, 2013.

VAN DER VALK *et al.*, A novel common variant in DCST2 is associated with length in early life and height in adulthood. *Hum Mol Genet.*, v.24, n.4, 2015.

VAN EENENNAAM, A. Marker assisted selection in beef cattle. Disponível em: <[http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker\\_Assisted\\_Selection\\_in\\_Beef\\_Cattle.pdf](http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf)>. Acesso em: 05 de junho 2007.

VEGA, F. M; LAZARUK, K. D.; RHODES, M. D.; WENZ, M. H. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP genotyping assays and the SNPLex genotyping system. *Mutation Research*, v. 573, n. 1-2, p. 111-135, 2005.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

WANG, K., BUCAN, M. Copy number variation detection via high-density SNP genotyping. *CSH Protocols*, v.3, p.6, 2008.

WARMUTH, V.; ERIKSSONA, A.; BOWER, M.A.; BARKER, G.; BARRETT, E.; HANKS, B.K.; LI, S.; LOMITASHVILI, D.; OCHIR-GORYAEVA, M.; SIZONOV, G.V.; SOYONOV, V. AND MANICA, A. Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109 no. 21, p. 8202–8206. 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/21/8202>> Acesso em 28/01/2014.

WEIMER, T. A. Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal. In: MARKES, E. K. (Org.). *Diagnóstico genético-molecular*. Canoas: ULBRA, 2003. p. 203-218.

WEEDON, M.N.; LANGO, H.; LINDGREN, C.M.; WALLACE, C.; EVANS, D.M.; *et al.*, Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet*, n.40, p.575–583, 2008.

XU, L.; BICKHART, D.M.; COLE, J.B.;SCHROEDER, S.G.; SONG, J.; TASSELL, C.P.V.; SONSTEGARD, T.S.; LIU, G.E. Genomic Signatures Reveal New Evidences for Selection of Important Traits in Domestic Cattle. *Mol. Biol. Evol.*, v.32, n.3, p.711–725, 2014.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2013, v.4, n.2., 2013. Disponível em: <<http://www.jasbsci.com/content/4/1/2>> Acesso em 28/01/2014.

## **CAPITULO 2. MEDIDAS LINEARES DE PÔNEIS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO.**

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi caracterizar os pôneis da raça Pônei Brasileiro através de medidas lineares, índices corporais, índices morfológicos e avaliar o efeito do sexo. Foram realizadas medidas lineares e os índices corporais destas medidas em relação à altura da cernelha e diferentes índices morfológicos (índice de força, índice de carga 1 e índice de carga 2). Foram também estimadas as proporções do sistema eclético de proporções lineares. Foi realizada a análise de variância para verificar o efeito do sexo e foram estimadas as correlações entre as medidas lineares e os índices morfológicos. Os pôneis apresentaram estatura média de 0,845m na altura da cernelha. Segundo o índice corporal os pôneis foram classificados como brevelíneos e aptos para tração. O dimorfismo sexual foi observado nos índices das medidas lineares com proporções maiores em algumas características nos machos e outras nas fêmeas. As correlações entre as medidas lineares foram de moderadas a altas, positivas e significativas, exceto entre o comprimento do pescoço e comprimento da canela. Conclui-se que os equinos da raça Pônei Brasileiro são animais de estatura pequena, cujas medidas foram influenciadas pelo sexo apresentando dimorfismo sexual. As correlações entre as medidas lineares e dos índices indicariam que selecionando o cavalo pônei para uma medida linear poderá se obter também, resposta positiva nas outras medidas e também nos índices.

**Palavras chaves:** Caracterização Sexual, Conformação, Medidas Corporais, Proporções.

## 1. INTRODUÇÃO

O cavalo pônei é muito procurado para sua utilização no lazer de crianças e na equoterapia por apresentar um porte pequeno que diminui os riscos de acidentes.

Para a seleção dos cavalos pôneis e determinação do potencial dos reprodutores é necessária a mensuração e registro das medidas lineares dos animais, para dar suporte aos programas de seleção por tamanho do animal. Tem sido constante a busca por dispositivos e técnicas com maior acurácia, praticidade e econômica para quantificação das medidas lineares dos eqüinos, das diversas partes anatômicas e zootécnicas (LAGE *et al.*, 2009).

A fim de identificar dimorfismo sexual em equinos Oom & Ferreira (1987) relataram que as proporções corporais são avaliadas com base em índices para facilitar as avaliações de animais com diferentes medidas (comprimento, perímetro e peso), respeitando a variabilidade de formas e tamanhos. Este sistema permite isolar os efeitos relacionados à maior altura ou comprimento.

O Sistema Eclético de Proporções Lineares proposto por Lesbre (1930) vêm sendo utilizado até hoje no estudo das proporções de cavalos de sela. Este sistema se baseia no comprimento da cabeça e sua proporção com as demais medidas lineares, permitindo a avaliação do animal como um todo e avaliando as proporções ideais no indivíduo.

São escassos os trabalhos de morfologia em pôneis, Costa *et al.*, (1998) e Quirino *et al.*, (2012) relataram mensurações no momento do registro dos animais.

Segundo Eberth (2013) a estatura dos animais e humanos é determinada por dezenas a centenas de genes dentro de um indivíduo e a altura adulta apresenta grande variação dentro de certas espécies animais e os seres humanos.

A identificação com acurácia dos genes que controlam esta característica permitirá a seleção de equinos com tamanhos mais adequados para a prática de certas atividades esportivas e de trabalho. Assim, se permitirá que a seleção

clássica possa ser complementada pela seleção assistida por marcadores moleculares.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar pôneis da raça Pônei Brasileiro do estado do Rio de Janeiro, Brasil através de medidas lineares, índices corporais e índices morfológicos, e avaliar a importância do efeito do sexo sobre estas características.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas medidas de conformação de 78 garanhões e 136 éguas adultos (com idade igual ou superior a 3 anos) da raça Pônei Brasileiro, do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

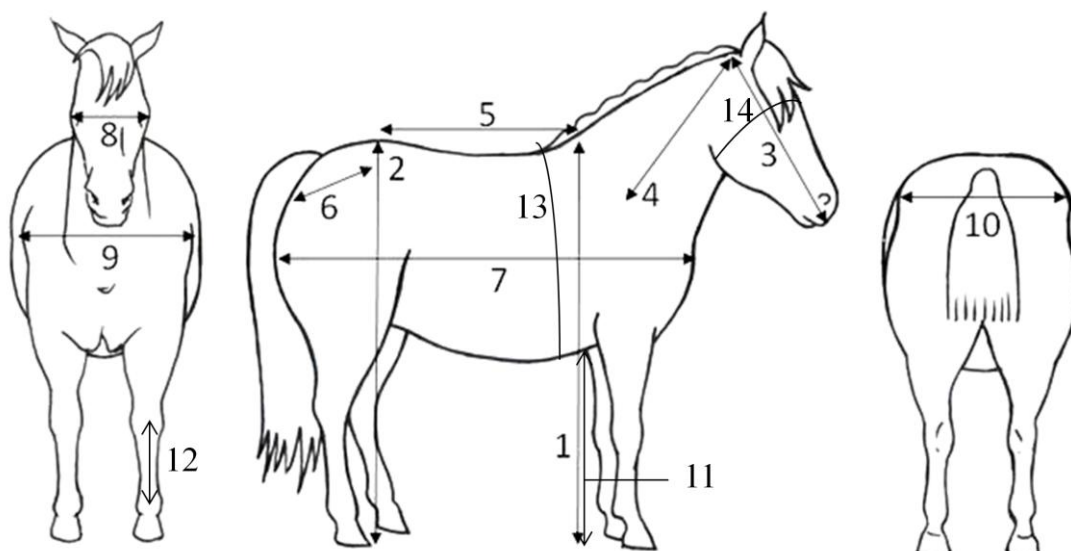
A localização geográfica precisamente do norte do estado do Rio de Janeiro situa-se a latitude = 21,7 S e longitude = 41,3 W.

Foram estudadas 14 medidas lineares, 3 índices morfológicos e 13 índices corporais apresentadas na Quadro 1.

Quadro 1. Descrição das medidas lineares.

<b>Medida Linear</b>	<b>Descrição</b>
Altura da cernelha	Medida tomada das extremidades livres do 5 <sup>o</sup> ou 6 <sup>o</sup> processo espinhoso torácico até o solo.
Altura na garupa	Medida do ponto mais alto da transição lombro-sacra, especificamente sobre a tuberosidade sacral do íleo, até o solo.
Comprimento da cabeça	Distância entre a extremidade lábio rostral, e a região nucal (osso interparietal e a protuberância externa do osso occipital).
Comprimento do pescoço	Distância entre a borda cranial da asa do atlas e a borda cranial do terço médio do músculo supra-espinhoso.
Comprimento do dorso-lombo	Distância entre os processos espinhosos de t5 e t6 até a 6 <sup>o</sup> vértebra lombar.
Comprimento da garupa	Distância entre as o ângulo látero-cranial da tuberosidade coxal e o ângulo látero-caudal da tuberosidade isquiática.
Comprimento do corpo	Distância entre a parte cranial do tubérculo maior do úmero e a tuberosidade isquiática.
Largura da cabeça	Distância compreendida entre a parte livre da borda supra-orbital direita até a borda supra-orbital esquerda.
Largura do peito	Distância entre as partes craniais do tubérculo maior dos úmeros direito e esquerdo.
Largura da garupa	Distância entre os pontos mais proeminentes da tuberosidade coxal direita e esquerda.
Altura no tórax	Altura tomada do esterno até o solo.

Comprimento da canela anterior	Comprimento do 3 <sup>o</sup> metacarpo: medida feita as margens das epífises proximal e distal do 3 <sup>o</sup> metacarpo.
Perímetro torácico	Circunferência tomada do tórax do animal, passando imediatamente após a cernelha (espaço definido pelo processo espinhoso de t5 – t6), passando pelo espaço intercostal da 8 <sup>o</sup> e 9 <sup>o</sup> costela, até a articulação da última costela com o processo xifóide.
Diâmetro da cabeça	Circunferência entre a parte livre da borda supra-orbital direita e borda esquerda e pela face ventral da mandíbula próxima ao ângulo da mandíbula.



**Figura 1.** Representação das medidas lineares dos pôneis da raça Pônei Brasileiro: 1. Altura da cernelha, 2. Altura na garupa, 3. Comprimento da cabeça, 4. Comprimento do pescoço, 5. Comprimento do dorso-lombo, 6. Comprimento da garupa, 7. Comprimento do corpo, 8. Largura da cabeça, 9. Largura do peito, 10. Largura da garupa, 11. Altura no tórax, 12. Comprimento da canela anterior, 13. Perímetro torácico e 14. Diâmetro da cabeça.

As medições foram feitas usando um hipômetro zoométrico, fita métrica não elástica e compasso zoométrico. Durante as medições, os equinos estavam em estação sobre uma superfície firme.



Foram calculados os índices morfológicos; índice corporal, índice de carga 1 e índice de carga 2, descritos por Oom & Ferreira (1987), McManus *et al.*, (2005) e Mariz *et al.*, (2014).

O Índice Corporal (IC) que evidencia relações existentes entre as medidas de comprimento corporal e perímetro torácico foi calculado segundo, classificando os animais em longilíneos, mediolíneos e brevilíneos.

$$IC = \frac{\text{Comprimento do corpo}}{\text{Perímetro torácico}} \times 100$$

Onde animais com  $IC \geq 90$  são classificados como longilíneos; de  $86 \leq IC < 88$  classificados como mediolíneos e  $IC < 86$  como brevilíneos.

O Índice de carga 1 (ICG1) indica o peso, que o animal pode suportar sem esforço exagerado sobre o dorso, trabalhando a trote ou a galope.

$$ICG1 = \frac{\text{Perímetro torácico}^2}{\text{Altura da cernelha}} \times 56$$

Índice de carga 2 (ICG2) sugere o peso, que o animal pode suportar sem esforço exagerado sobre o dorso, trabalhando a passo.

$$ICG2 = (PT^2 \times 95)/AC$$

Foram calculados os índices corporais para todas as medidas segundo Purzyc *et al.*, (2010). Os índices foram calculados obtendo-se a razão de cada medida pela altura da cernelha.

Índice de largura da cabeça:

$$ILC = \frac{\text{Largura da Cabeça}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento da cabeça:

$$ICCA = \frac{\text{Comprimento da Cabeça}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice diâmetro da cabeça:

$$IDCA = \frac{\text{Diâmetro da Cabeça}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento do pescoço:

$$ICP = \frac{\text{Comprimento do Pescoço}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de altura do Tórax:

$$\text{IAT} = \frac{\text{Altura do Tórax}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de altura na garupa:

$$\text{IAG} = \frac{\text{Altura na Garupa}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de Perímetro torácico:

$$\text{IPT} = \frac{\text{Perímetro torácico}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de largura no peito:

$$\text{ILP} = \frac{\text{Largura do Peito}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento da canela:

$$\text{ICC} = \frac{\text{Comprimento da Canela}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento dorso-lombo:

$$\text{ICD} = \frac{\text{Comprimento Dorço-Lombo}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento da garupa:

$$\text{ICG} = \frac{\text{Comprimento da Garupa}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de largura da garupa:

$$\text{ILG} = \frac{\text{Largura na Garupa}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Índice de comprimento do corpo:

$$\text{ICCO} = \frac{\text{Comprimento do Corpo}}{\text{Altura da cernelha}} \times 100$$

Também foram estimadas as proporções corporais das medidas lineares em relação ao comprimento da cabeça, conforme proposto no sistema eclético de proporções lineares por Lebre, 1930. A inclusão deste sistema métrico neste trabalho teve como intuito gerar dados iniciais para comparações futuras de outros trabalhos a serem realizados com animais da raça Pônei Brasileiro e outras raças de equinos pôneis.

Foi realizada a consistência de dados de todas as medidas (média, desvio padrão e coeficiente de variação) e a análise de variância das características para

verificar o efeito do sexo. Foram calculadas as correlações entre as medidas lineares e os índices morfológicos (SAS, 2009).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coeficientes de variação da maioria das características analisadas foram menores que 10% e houve efeito do sexo para algumas características. A tabela 1 apresenta a média geral das medidas lineares e dos índices morfológicos de força, de carga 1, de carga 2 dos pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro.

Os animais da raça Pônei Brasileiro apresentaram estatura média de 0,845m na altura da cernelha, abaixo do relatado por Costa *et al.*, (2001) com animais também da região Sudeste com altura da cernelha de 0,958m.

A menor altura da cernelha encontrada pode-se dever, possivelmente pela seleção para animais de menor porte realizada até o momento e/ou pelo aumento da consaguinidade nos rebanhos como sugerida por Bergmann *et al.*, (1997). Moro *et al.*, (1998) avaliando animais pôneis da raça espanhola Vasto-Potoka, observaram média de 1,256m na altura da cernelha, apresentando estatura superior a raça Pôneis Brasileiro.

A medida de comprimento dorso lombo nos animais avaliados foi similar ao valor encontrado por Costa *et al.*, (2001), relativo a animais registrados de 1975 até 1997. A altura da cernelha, altura da garupa, comprimento do crânio, comprimento da garupa, comprimento do corpo, largura da cabeça, largura do peito e largura da garupa apresentaram grande diminuição métrica comparados aos apresentados por Costa *et al.*, (2005). Em controvérsia, o comprimento do pescoço foi levemente superior no atual estudo com acréscimo a média de 0,03m.

O comprimento dorso lombo foi similar ao relatado por Costa *et al.*, (2001) possivelmente pelo interesse dos criadores em não alterá-la visando à necessidade de uma amplitude torácica e abdominal suficiente para as fêmeas suportarem uma gestação até o parto. Entretanto ocorreu uma diminuição do comprimento do corpo de aproximadamente 0,13m em comparação com o resultado apresentado por Costa *et al.*, (2001), e que poderia ser explicado pela diminuição do comprimento da garupa dos animais atuais que foi de 0,23m e de 0,35m observado por Costa *et al.*, (2001).

A medida de altura do tórax apresentou média de 0,430m, diâmetro do crânio 0,610m de média, o perímetro torácico média de 1,078m e o comprimento da canela com média de 0,159m.

O índice corporal apresentou média de 81.59, classificando os animais de uma forma geral como brevelíneos (< 86), caracterizando como equinos aptos para tração. Função esta, compatível com a finalidade tradicional dos equinos da raça Pônei Brasileiros para tração leve de charretes ou sela (MARQUES, 2003).

O índice de carga 1 referente ao peso suportado quando o animal trabalha ao trote ou a galope apresentou média de 77,68Kg, enquanto que o índice de carga 2 sugere o peso, que o animal pode suportar sem esforço exagerado sobre o dorso, trabalhando a passo teve média de 131,77Kg. Estes valores indicariam a capacidade destes animais de suportarem peso de crianças ou pessoas de peso leve.

McManus *et al.*, (2005) avaliando equinos da raça Campeiro classificaram como um cavalo de pequeno ou de médio porte, encontraram média de altura da cernelha de 1,44m e índice de carga 1 de 117,165 e índice de carga 2 de 198,763. Pimentel *et al.*, (2014), estudando asininos com altura da cernelha de 1,17m e perímetro torácico de 1,29m, encontraram índice de carga 1 e de carga 2, de 79 Kg e 134,42Kg respectivamente, valores ligeiramente superiores ao encontrado no presente trabalho com equinos da raça Pônei Brasileiro.

A tendência genética das medidas lineares descrita por Costa *et al.*, (2001) foi favorável à redução do porte dos animais exceto para comprimento dorso lombo, largura do peito e largura da garupa, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho no qual se verifica a diminuição da altura dos animais e valor similar nos dois estudos no comprimento dorso lombo.

**Tabela 1.** Médias e respectivos desvios padrão das medidas lineares (em metros) e índices de pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro no estado do Rio de Janeiro.

Característica	N	Média	± Desvio	Min	Max
Largura da cabeça	214	0,153	0,015	0,105	0,200
Comprimento do crânio	214	0,359	0,034	0,230	0,430
Diâmetro do crânio	214	0,610	0,065	0,380	0,870
Comprimento do pescoço	214	0,430	0,062	0,240	0,641
Altura da cernelha	214	0,845	0,092	0,540	1,160
Altura do tórax	214	0,430	0,045	0,310	0,600
Altura da garupa	214	0,859	0,091	0,545	1,220
Perímetro torácico	212	1,078	0,015	0,595	1,440
Largura do peito	214	0,216	0,031	0,130	0,304
Comprimento da canela	197	0,158	0,018	0,115	0,210
Comprimento dorso lombo	207	0,418	0,081	0,180	0,620
Comprimento da garupa	214	0,235	0,034	0,114	0,330
Largura da garupa	214	0,295	0,048	0,130	0,432
Comprimento do corpo	214	0,879	0,124	0,465	1,280
Índice corporal	212	81,59	4,77	67,41	101,35
Índice de carga 1 (Kg)	212	77,68	16,02	36,38	122,34
Índice de carga 2 (Kg)	212	131,77	27,17	61,71	207,55

N: número de animais; Min: valor mínimo; Max: Valor máximo.

É interessante salientar que no Brasil são escassos os estudos de morfometria em pôneis.

Na tabela 2 estão relacionados as médias das medidas lineares e dos índices morfológicos (de força, de carga 1, de carga 2) por sexo, dos equinos da Raça Pônei Brasileiro. Foram observadas diferenças devidas ao sexo para algumas características.

As fêmeas adultas apresentaram maiores médias e diferentes ( $P < 0,05$ ) no comprimento do crânio, altura da cernelha, altura da garupa, perímetro torácico, comprimento dorso-lombo, comprimento da garupa, largura da garupa, comprimento do corpo, índice de força, índice de carga 1 e índice de carga 2. McManus *et al.*, (2005), em animais da raça Campeiro, também encontraram diferença em relação ao sexo dos animais na altura da cernelha, altura da garupa, comprimento do corpo, no índice de carga 1 e índice de carga 2.

As medidas de comprimento do crânio, altura da cernelha, altura da garupa e perímetro torácico (tabela 2) foram menores nos machos possivelmente pela seleção mais rigorosa dos reprodutores comparada com as matrizes.

O comprimento dorso lombo, comprimento da garupa e largura da garupa apresentaram maiores médias nas fêmeas. Estes valores estariam relacionados à necessidade de uma maior amplitude destas regiões para suportar a prenhez e para o momento do parto, sendo estas medidas avaliadas positivamente nos julgamentos dos campeonatos da raça. O comprimento do corpo como esperado foi maior nas fêmeas do que nos machos, pois esta medida é afetada pelo comprimento dorso lombo e pelo comprimento da garupa que foram maiores nas fêmeas.

Os machos e fêmeas não apresentaram diferenças ( $P>0,05$ ) na largura da cabeça, diâmetro do crânio, comprimento do pescoço, altura do tórax, largura do peito, comprimento da canela e índice corporal, portanto não houve dimorfismo sexual nestas medidas.

Em pôneis da raça Vasto-Potoka, Moro *et al.*, (1998), encontraram diferenças significativas entre o sexo dos animais apenas na largura no peito, largura da cabeça e perímetro da canela. Kaproń *et al.*, (2013), encontraram dimorfismo sexual em equinos da raça Wielkopolski da Polônia, na altura da cernelha e na circunferência da canela.

O índice corporal não apresentou diferenças ( $P>0,05$ ), caracterizando tanto os machos quanto as fêmeas com melhor aptidão para tração. O índice de carga 1 e 2 foi maior nas fêmeas possivelmente pelo maior perímetro torácico nas fêmeas comparadas aos machos, onde, o perímetro torácico é a medida principal nestes cálculos.

**Tabela 2.** Médias e respectivos desvios padrão das medidas lineares (em metros) e índices por sexo de pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro no estado do Rio de Janeiro.

Característica	Machos		Fêmeas	
	Média	± Desvio	Média	± Desvio
Largura da cabeça	0,154 <sup>a</sup>	0,012	0,156 <sup>a</sup>	0,013
Comprimento do crânio	0,360 <sup>b</sup>	0,025	0,369 <sup>a</sup>	0,026
Diâmetro do crânio	0,614 <sup>a</sup>	0,045	0,628 <sup>a</sup>	0,053
Comprimento do pescoço	0,438 <sup>a</sup>	0,056	0,438 <sup>a</sup>	0,057
Altura da cernelha	0,846 <sup>b</sup>	0,060	0,874 <sup>a</sup>	0,071
Altura do tórax	0,434 <sup>a</sup>	0,038	0,438 <sup>a</sup>	0,039
Altura da garupa	0,855 <sup>b</sup>	0,055	0,890 <sup>a</sup>	0,074
Perímetro torácico	1,068 <sup>b</sup>	0,112	1,131 <sup>a</sup>	0,122
Largura do peito	0,222 <sup>a</sup>	0,027	0,221 <sup>a</sup>	0,027
Comprimento da canela	0,158 <sup>a</sup>	0,016	0,162 <sup>a</sup>	0,017
Comprimento dorso lombo	0,393 <sup>b</sup>	0,056	0,452 <sup>a</sup>	0,071
Comprimento da garupa	0,235 <sup>b</sup>	0,023	0,244 <sup>a</sup>	0,028
Largura da garupa	0,154 <sup>a</sup>	0,012	0,156 <sup>a</sup>	0,013
Comprimento do corpo	0,867 <sup>b</sup>	0,086	0,924 <sup>a</sup>	0,096
Índice corporal	81.41 <sup>a</sup>	4.05	81.66 <sup>a</sup>	4.74
Índice de carga 1	75.72 <sup>b</sup>	13.30	82.69 <sup>a</sup>	13.86
Índice de carga 2	128.45 <sup>b</sup>	22.56	140.29 <sup>a</sup>	23.51

Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem ( $P < 0,05$ ) no test t a 5% de probabilidade.

Na tabela 3 são apresentados os índices de cada medida linear relacionados com a altura da cernelha, de acordo com sexo. Os índices das medidas lineares são utilizados para minimizar os efeitos da variação de altura do rebanho e destacam as diferenças entre o sexo de acordo com as proporções destas medidas.

Os machos e fêmeas adultos não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos índices de comprimento do crânio, diâmetro da cabeça, altura da garupa, comprimento da canela e comprimento da garupa. O índice altura da garupa não apresentou diferença entre sexo. Como a altura da garupa apresenta valores similares à altura da cernelha, o índice foi próximo de 1 nos dois sexos (1,011 nos machos e 1,018 nas fêmeas). O índice de comprimento da garupa foi similar entre machos e fêmeas, divergindo do encontrado anteriormente ao se avaliar a média do comprimento da garupa. Pode-se atribuir a diferença encontrada anteriormente na Tabela 2, à maior altura das fêmeas em relação aos machos e não uma diferença proporcional a altura.



Os machos apresentaram maiores índices corporais e foram diferentes ( $P < 0,05$ ) para largura da cabeça, comprimento do pescoço, altura do tórax e largura do peito. Como observado por Purzyc *et al.*, (2010) os machos apresentam a parte anterior do corpo mais desenvolvido que as fêmeas, similar com o observado neste estudo. O índice altura do tórax foi maior nos machos possivelmente pela necessidade das fêmeas de maior amplitude toracoabdominal que lhes permitem suportar uma prenhez.

Nas fêmeas o índice de diâmetro do tórax, índice de comprimento dorso lombo, índice de largura da garupa e o índice de comprimento do corpo apresentaram maior média e foram diferentes dos machos ( $P < 0,05$ ), fortalecendo a hipótese sugerida neste trabalho da diferenciação sexual devido às necessidades fisiológicas destas regiões nas fêmeas durante a gestação e parto. Resultados semelhantes foram observados por Purzic *et al.*, (2011) em cavalos Hulkul, e por Pinto *et al.*, (2005) no índice de perímetro torácico, que apresentou valor médio maior em potras em relação aos potros.

**Tabela 3.** Médias e respectivos desvios-padrão dos índices das medidas lineares em relação à altura da cernelha de acordo o sexo de pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro no estado do Rio de Janeiro.

Índice	Machos		Fêmeas	
	Média	± Desvio	Média	± Desvio
Índice largura da cabeça	0,183 <sup>a</sup>	0,013	0,179 <sup>b</sup>	0,013
Índice comprimento do crânio	0,426 <sup>a</sup>	0,029	0,423 <sup>a</sup>	0,026
Índice diâmetro da cabeça	0,726 <sup>a</sup>	0,044	0,720 <sup>a</sup>	0,045
Índice comprimento do pescoço	0,522 <sup>a</sup>	0,060	0,502 <sup>b</sup>	0,057
Índice altura do tórax	0,518 <sup>a</sup>	0,046	0,501 <sup>b</sup>	0,027
Índice altura da garupa	1,011 <sup>a</sup>	0,025	1,018 <sup>a</sup>	0,028
Índice perímetro torácico	1,262 <sup>b</sup>	0,101	1,297 <sup>a</sup>	0,096
Índice largura do peito	0,262 <sup>a</sup>	0,029	0,253 <sup>b</sup>	0,023
Índice comprimento da canela	0,187 <sup>a</sup>	0,016	0,188 <sup>a</sup>	0,017
Índice comprimento dorso-lombo	0,463 <sup>b</sup>	0,050	0,512 <sup>a</sup>	0,077
Índice comprimento da garupa	0,277 <sup>a</sup>	0,024	0,280 <sup>a</sup>	0,026
Índice largura da garupa	0,342 <sup>b</sup>	0,035	0,356 <sup>a</sup>	0,034
Índice comprimento do corpo	1,024 <sup>b</sup>	0,064	1,056 <sup>a</sup>	0,058

Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem ( $P < 0,05$ ) no test t a 5% de probabilidade.

O sistema eclético de proporções proposto por Lesbre (1930) é utilizado por vários autores para avaliar equinos principalmente de sela (CABRAL *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2014). Este sistema utiliza o comprimento do crânio como base para comparar as demais medidas.

A relação entre largura da cabeça, comprimento do pescoço e comprimento dorso lombo sobre o comprimento do crânio foi superior ao proposto por Lesbre (1930) (Tabela 4). Os pôneis apresentaram uma estrutura mais longilínea comparado aos animais de sela avaliados por Lesbre (1930). A largura da garupa e o comprimento do corpo apresentaram valores similares, entretanto, a decomposição do comprimento do corpo em comprimento dorso lombo e comprimento da garupa apresentou variações.

O comprimento dorso lombo foi superior ao proposto por Lesbre (1930) e o comprimento da garupa foi inferior. Apesar do interesse dos criadores em selecionar animais de menor porte, observa-se que não haveria o interesse por parte dos criadores em diminuir o comprimento dorso lombo, principalmente nas fêmeas. Nos campeonatos e julgamentos realizados o comprimento dorso lombo é avaliado rigorosamente e citado por diversas vezes nas resenhas dos juízes.

O comprimento dorso lombo está relacionado à capacidade de suportar uma gestação sem grandes prejuízos na fisiologia do sistema respiratório e na capacidade de ingestão de alimentos, supondo-se que uma maior amplitude toracoabdominal permite a presença do feto sem prejudicar o funcionamento dos órgãos adjacentes.

A relação de altura da cernelha, a altura da garupa e o comprimento da garupa apresentaram valores inferiores aos propostos por Lesbre (1930), possivelmente pela intensa seleção realizada pelos criadores para a diminuição do porte destes animais.

**Tabela 4.** Relação entre as medidas lineares e o comprimento do crânio (CCR) segundo o Sistema Eclético de Proporções (LESBRE,1930) do rebanho total, de garanhões e de éguas pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro no estado do Rio de Janeiro.

Relação	Machos	Fêmeas	Rebanho Total	(LESBRE, 1930)
Largura da cabeça/CCR	0,43	0,42	0,43	0,33
Diâmetro do crânio/CCR	1,70	1,70	1,70	-
Comprimento do pescoço/CCR	1,22	1,19	1,20	1
Altura da cernelha/CCR	2,33	2,36	2,35	2,5
Altura do tórax/CCR	1,22	1,19	1,20	-
Altura da garupa/CCR	2,36	2,41	2,39	2,5
Perímetro torácico/CCR	2,93	3,05	3,00	-
Largura do peito/CCR	0,61	0,60	0,60	-
Comprimento da canela/CCR	0,44	0,44	0,44	-
Comprimento dorso lombo/CCR	1,08	1,21	1,16	0,83
Comprimento da garupa/CCR	0,64	0,66	0,65	0,83
Largura da garupa/CCR	0,79	0,84	0,82	0,83
Comprimento do corpo/CCR	2,38	2,49	2,45	2,5

CCR: Comprimento do crânio.

As correlações entre as medidas lineares foram de moderadas a altas, positivas e significativas entre todas as medidas ( $P < 0,01$ ), exceto entre o comprimento do pescoço e comprimento da canela (Tabela 5). Lage *et al.*, (2009), também encontraram correlações significativas moderadas a altas entre as medidas de altura e perímetro torácico em equinos.

As correlações apresentadas entre as medidas lineares permitem a seleção para uma característica e conseqüentemente a melhora das demais medidas morfológicas.

O índice corporal não apresentou correlação com a maior parte das características ( $P > 0,05$ ) e apresentou baixa correlação, negativa e significativa com o perímetro torácico que é o denominador da razão deste índice.

A correlação foi igual a 1 entre o índice de carga 1 e o índice de carga 2, apresentando ainda correlações com as demais características, destacando-se a alta correlação com o diâmetro do crânio (0,79), perímetro torácico (0,95), largura do peito (0,77) e comprimento do corpo (0,81). Estas correlações indicariam que a

seleção para aumento das medidas lineares representaria também, aumento na capacidade de carga dos pôneis.

As correlações observadas neste estudo com moderadas a alta magnitude, permitiriam a seleção através da avaliação de apenas algumas características como a altura da cernelha, altura de garupa e o comprimento do corpo. Medidas estas que são facilmente mensuráveis e serviram de suporte para as demais medidas e índices.

**Tabela 5.** Correlações das medidas lineares e índices de pôneis adultos da raça Pônei Brasileiro no estado do Rio de Janeiro.

Caract	LC	CCr	DCrân	CPes	ACern	ATóra	AGar	PTor	LBies	CCan	CDL	CGar	LGar	CCor	ICorp	IC1	IC2
LC	-																
CCr	0.74**	-															
DCrân	0.73**	0.74**	-														
CPesc	0.53**	0.60**	0.53**	-													
ACern	0.73**	0.80**	0.83**	0.62**	-												
ATóra	0.53**	0.63**	0.56**	0.51**	0.81**	-											
AGar	0.74**	0.81**	0.81**	0.64**	0.97**	0.79**	-										
PTor	0.73**	0.72**	0.88**	0.52**	0.84**	0.50**	0.84**	-									
LBies	0.64**	0.60**	0.77**	0.46**	0.71**	0.49**	0.72**	0.84**	-								
CCan	0.39**	0.44**	0.52**	0.19	0.63**	0.59**	0.62**	0.52**	0.47**	-							
CDL	0.57**	0.60**	0.74**	0.35**	0.79**	0.56**	0.77**	0.78**	0.60**	0.68**	-						
CGar	0.70**	0.73**	0.72**	0.49**	0.75**	0.54**	0.76**	0.77**	0.66**	0.40**	0.65**	-					
LGar	0.70**	0.75**	0.81**	0.54**	0.81**	0.60**	0.81**	0.85**	0.73**	0.46**	0.73**	0.73**	-				
CCor	0.77**	0.79**	0.87**	0.61**	0.91**	0.64**	0.91**	0.92**	0.78**	0.54**	0.81**	0.79**	0.86**	-			
ÍCorp	0.01	0.06	-0.14	0.12	0.04	0.17	0.07	-0.28**	-0.27**	0.05	-0.01	-0.04	-0.07	0.06	-		
IC1	0.62**	0.59**	0.79**	0.42**	0.66**	0.31**	0.66**	0.95**	0.80**	0.40**	0.69**	0.67**	0.77**	0.81**	-0.45**	-	
IC2	0.62**	0.59**	0.79**	0.42**	0.66**	0.31**	0.66**	0.95**	0.80**	0.40**	0.69**	0.67**	0.77**	0.81**	-0.45**	1**	-

Caract: Característica; LC: Largura da cabeça; CCrân: Comprimento do crânio; DCr: Diâmetro da cabeça; CPesc: Comprimento do pescoço; ACern: Altura da cernelha; ATórax: Altura no tórax; AGar: Altura na garupa; PTor: Perímetro torácico; LBies: Largura do Peito; CCan: Comprimento da canela; CDL: Comprimento do dorso-lombo; CGar: Comprimento da garupa; LGar: Largura da garupa; CCor: Comprimento do corpo; ICop: Índice do corpo; IForça: Índice de força; IC1: Índice de carga 1; IC2: Índice de carga 2.

\* P<0,05; \*\* P<0,01

#### 4. CONCLUSÕES

Os equinos pônei da raça Brasileiro são animais de estatura pequena, cujas medidas foram influenciadas pelo sexo indicando dimorfismo sexual nos animais.

O índice corporal classificou os animais como brevelíneos caracterizando como equinos aptos para tração.

As correlações entre as medidas lineares, índice de força, de carga 1 e de carga 2, em geral foram de moderadas a altas. Portanto, sugere-se que, selecionando o cavalo pônei para altura da cernelha, altura de garupa e comprimento do corpo, teria também uma resposta desejada nas outras características e índices estudados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGMANN, J.A.G., COSTA, M.D., MOURÃO, G.B. Efeito da endogamia sobre características morfológicas em pôneis da raça Brasileira. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.49, p.103-111, 1997.

CABRAL, G.C.; FERNANDO QUEIROZ DE ALMEIDA, F.Q.A.; QUIRINO, C.R.; AZEVEDO, P.C.N. DE; PINTO, L.F.B.; SANTOS, E.M. Avaliação morfométrica de eqüinos da raça Mangalarga Marchador: índices de conformação e proporções corporais. R. Bras. Zootec., v.33, n.6 (1), p.1798-1805, 2004.

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; PEREIRA, C.S. *et al.*, Avaliação dos fatores genéticos e de ambiente que interferem nas medidas lineares dos pôneis da raça brasileiras. Revista Brasileira de Zootecnia, v.27, n.3, p.491-497, 1998.

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; PEREIRA, C.S.; PEREIRA, J.C.C.; REZENDE, A.S.C. Tendência genética de medidas lineares de pôneis da raça Brasileira. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.53, n.2, 2001.

KAPROŃ, M.; CZERNIAK, E.; ŁUKASZEWICZ, M.; DANIELEWICZ, A. Genetic parameters of body conformation and performance traits of Wielkopolski horses registered in the successive volumes of the Herdbook. Archiv Tierzucht, v.56, n.12, p.127-136, 2013.

LAGE, M.C.G.R.; BERGMANN, J.A.G.; PROCÓPIO, A.M.; PEREIRA, J.C.C.; BIONDINI, J. Associação entre medidas lineares e angulares de equinos da raça Mangalarga Marchador. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, n.4, p.968-979, 2009.

LESBRE, F. X. *Precis d'ExterieurduCheval*. Paris. 608p., 1930.

MARIZ, T.M.A.; ESCODRO, P.B.; DITTRICH, J.R.; NETO, M.S.; LIMA, C.B.; RIBEIRO, J.S. Padrão biométrico, medidas de atrelagem e índice de carga de equideos de tração urbana do município de Arapiraca, Alagoas. Archives of Veterinary Science, v.19, n.2, p.01-08, 2014.

MARQUES, C.V.B. Manual técnico das raças pôneis: Studbook brasileiro do cavalo pônei. Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Pônei. 96 p., 2003.

MCMANUS, C.; FALCÃO, R.A.; SPRITZE, A.; COSTA, D.; LOUVANDINI, DIAS, H.; L.T.; TEIXEIRA, R.A.; REZENDE, M.J.M.; GARCIA, J.A.S. Caracterização morfológica de eqüinos da raça Campeiro. R. Bras. Zootec., v.34, n.5, p.1553-1562, 2005.

MORO, P. e CASAL, J.I.I. Del. Estudio zoométrico en la raza poni Vasco-Pottoka. Arch. Zootec. 47: 537-546. 1998.

NOBRE, A.D. O Futuro Climático da Amazônia: Relatório de Avaliação Científica. Articulación Regional Amazônica, São Paulo, 42p., 2014.

OOM, M.M.; FERREIRA, J.C. Estudo biométrico do cavalo Alter. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.83, n.482, p.101-148, 1987.

PIMENTEL, M.M.L.; PINHEIRO, M.; FILHO, H.M.; SAKAMOTO, F.V.N., NOBRE, F.V.; DIAS, R.V.C. Parâmetros biométricos de asininos (*Equus asinus*) utilizados em provas de corrida no estado do Rio Grande do Norte. Acta Veterinaria Brasilica, v.8, n.2, p.136-143, 2014.

PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R.; CABRAL, G.C.; AZEVEDO, P.C.N.; SANTOS, E.M. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise discriminante. Rev. Bras. Zootec., v.34, n.2, p.600-612, 2005.

PURZYC, H.; KOBRYNCZUK, F.; BOJARSKI, J. Sexual dimorphism in Hucul horses using discriminant analysis. Animal, 5:4, pp 506–511, 2010.

QUIRINO, C.R.; MATOS, L.F.; BARTHOLAZZI JÚNIOR, A.; CASTRO, T. DE; SILVA, R.C; SILVA, J.L.L. Caracterização de pôneis da raça Brasileira através de medidas lineares. Actas Iberoamericanas de Consevación Animal, v.2, p.71-74, 2012.

SANTIAGO, J.M.; REZENDE, A.S.C.; LANA, Â.M.Q.; FONSECA, M.G.; ABRANTES, R.G.P.; LAGE, J.; ANDRADE, J.M.; RESENDE, T.M. Comparação entre as medidas morfométricas de equinos Mangalarga Marchador de marcha batida e marcha picada. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.66, n.2, p.635-639, 2014.

SAS. Statistical Analysis Systemy software release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2009.



### **CAPITULO 3. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LCORL* E *LASP1* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A ALTURA DE EQUINOS DA RAÇA PÔNEI BRASILEIRO.**

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi analisar mutações no gene *LCORL* e *LASP1* e suas associações com a altura de animais da raça Pônei Brasileiro. Foram coletadas 124 amostras de pelo sendo, 115 animais da raça Pônei Brasileiro, e 9 equinos de alta estatura utilizados como controle do estado do Rio de Janeiro. Foram tomadas as medidas de altura da cernelha e altura da garupa para o estudo de associação com os marcadores moleculares de cada animal. A extração de DNA foi realizada pelo método alcalino de extração. Foi realizada a amplificação dos fragmentos do gene *LCORL* e *LASP1* de DNA pela técnica da reação em cadeia da polimerase; após a amplificação foi realizada a digestão com enzima de restrição e foram submetidas à eletroforese capilar para a discriminação alélica por tamanho e identificação do polimorfismo. Foi realizada a análise de variância para verificar diferenças na altura da cernelha e da garupa devidas ao genótipo do animal. Foi calculada a correlação entre as alturas e os genótipos dos animais. No gene *LCORL* a frequência do genótipo T/T e a frequência do alelo T foi de 99,17% e do genótipo C/C e a frequência do alelo C foi de 0,83%. Os genótipos G/G, A/G e A/A do gene *LASP1* apresentaram frequência genotípica de 3,28%, 42,62% e 54,10%, respectivamente. O SNP do gene *LCORL* mostrou efeito significativo ( $P < 0,05$ ) sendo que o genótipo C/C apresentou o maior valor na altura dos equinos, e foi capaz de diferenciar ( $P < 0,05$ ) os animais com altura de superior a 1,60m. O SNP do gene *LASP1* não apresentou associação com a altura da cernelha dos pôneis ( $P > 0,05$ ). A identificação de SNPs em genes de menor efeito seria necessária para permitir a seleção de equinos pôneis de menor estatura.

**Palavras chaves:** Associação Genômica, Medidas Corporais, PCR-RFLP, SNP.

## 1. INTRODUÇÃO

Os equinos destinam-se a diferentes atividades como: para o trabalho, uso militar, atividades agropecuárias como o manejo do gado, e também, através da equoterapia como recurso terapêutico no tratamento de portadores de dificuldades nas áreas cognitiva, psicomotora e sócio-afetiva. Outra atividade realizada de longa data é o esporte equestre com diferentes modalidades e com crescimento expressivo em todo o mundo (LIMA *et al.*, 2006).

Em geral, a seleção dos equinos baseiam-se nas características de mensurações subjetivas como andamento, premiações em exposições (COSTA *et al.*, 2005), sendo utilizados poucos reprodutores e matrizes para a reprodução. Entretanto as associações das raças, principalmente de pôneis, mantêm limiares de medidas morfológicas como a altura da cernelha e altura da garupa para que estes animais sejam registrados.

Para aumentar a eficiência da seleção, atualmente surgiu a possibilidade da utilização de marcadores moleculares em programas de seleção com potencial de complementar a seleção clássica. As principais vantagens na sua utilização estão relacionadas à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, uma vez que esta tecnologia emprega amostras de DNA, permitindo análises logo após o nascimento (GARCIA & PORTO-NETO, 2006).

A maioria das características de interesse econômico apresenta o padrão de herança poligênica, sendo determinadas por inúmeros genes de grande e/ou de pequeno efeito individuais (COUTINHO *et al.*, 2010).

Em diversos estudos, na estatura em humanos já foram identificados mais de 200 locos de pequeno efeito (OKADA *et al.*, 2010; LANGO *et al.*, 2010). Em estudos de estatura em bovinos, cavalos e cães, utilizando a informação genética, a partir de estudos de associação genômica ampla, já foram identificados diferentes genes antes relacionados com a estatura em humanos, sugerindo fortemente que as regiões polimórficas que afetam estatura humana também afetariam a estatura nestas espécies domesticadas (EBERTH, 2013).

Em equinos Makvandi-Nejad *et al.*, (2012) identificaram mutações de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) em 4 genes que explicam 83% da

variação da estatura dos equinos. Estes autores identificaram mutações nos genes *LCORL*, *HMGA2*, *ZFAT* e *LASP1* que haviam sido identificados por controlar a altura do humano (*LCORL*, *ZFAT* e *LASP1*) e em cães (*HMGA2*).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as mutações no gene *LCORL* e *LASP1* e sua associação com a altura em equinos da raça Pônei Brasileiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS DE DNA E COLETA DE DADOS

Foram coletadas amostras de pelo da base da cauda e genotipados um total de 124 equinos (com idade igual ou superior a 3 anos), sendo 115 animais da raça Pônei Brasileiro de dois Haras do norte do estado do Rio de Janeiro e 9 equinos de alta estatura utilizados como controle (Mangalarga Marchador, Mangalarga Paulista, Pampa, Lusitano, Árabe, Lusitano x Árabe, Quarto de Milha, Paint Horse e Percheron).

Em cada animal foram tomadas as medidas de altura da cernelha e de garupa utilizando um hipômetro zoométrico, fita métrica não elástica e compasso zoométrico. Durante as medições, os equinos estavam em uma superfície firme em estação.

### 2.2. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de fonte de DNA foram provenientes de pelos coletados da porção inicial da cauda dos animais, sendo estes avaliados em microscópio óptico para selecionar pelos com os bulbos pilosos íntegros.

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando 5 bulbos dos pelos coletados de cada animal. Estes bulbos foram cortados e colocados em microtubos onde ocorreu a reação de extração de DNA.

A reação de extração dos materiais provenientes dos pelos teve início com uma solução de lise (200mM de NaOH) adicionada em cada tubo contendo os bulbos. Para separar as possíveis células ainda presas ao pelo, esta mistura foi levemente agitada com auxílio da pipeta. Um aquecimento de 96°C por 15 minutos sucedeu esta etapa, com isto as membranas celulares foram desnaturadas. Posteriormente, foi efetuada uma centrifugação à 14000 rpm por 2 minutos, a qual permitiu a separação do DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a lise celular, ficaram dispersas na solução. Finalmente, para cessar a atividade da primeira solução, foi necessário adicionar uma solução

neutralizante (200mM de HCL e 100mM de Tris HCL) reduzindo o pH de toda a reação, aproximando-se ao pH neutro.

A quantificação do DNA foi realizada no aparelho NanoDrop® e para cada amostra o DNA extraído foi diluído para uma concentração final de 10ng/ uL.

### 2.3. AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS DOS GENES *LCORL* E *LASP1*

Foi realizada a genotipagem dos animais, para mutações dos genes *LCORL* (T/C, cromossomo: 3, rs68603064) e *LASP1* (G/A, cromossomo: 11, rs68876319).

Para cada loco a ser estudado foram desenhados primers com o auxílio do programa Gene Runner® e avaliados através do programa Primer Express® (Tabela 1).

**Tabela 1.** Primers para amplificação dos fragmentos dos genes *LCORL* e *LASP1*.

Loco	PrimerA 5´ - 3´	PrimerB5´ - 3´	Ta	Fragmento (pb)
<i>LCORL</i>	gtcaaagccagaggtggagag	acctctggcttgaccgg	65 <sup>o</sup> C	290
<i>LASP1</i>	ggatgactggcctaagcttg	gtgacagcactggggcact	66 <sup>o</sup> C	204

Ta= Temperatura de anelamento.

Foi realizada a PCR para cada um dos locos com um volume final de 20µl por reação, utilizando 1x tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (incluindo Mg<sup>+2</sup>)], 0,5mM mix de dNTPs Promega®, 1U *Taq* DNA polimerase Promega®, 0.5µM de cada primer -Invitrogen® (Tabela 1), água deionizada e 50 ng do conteúdo obtido da extração do DNA. Em cada reação de PCR foi feito um controle negativo.

A reação de PCR, para as mutações do gene *LCORL* e *LASP1*, foi realizada em termociclador Applied Veriti® 96-Well com desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguido por 40 ciclos de amplificação, com desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento dos primers com temperatura padronizada em cada primer por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após o último ciclo, as reações foram submetidas a uma etapa final de 5 minutos a 72°C para a extensão final das fitas.

Alíquotas de 3µl das amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% com 20 centímetros de tamanho. Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de peso molecular 100bp DNA Ladder Promega® para a confirmação dos fragmentos amplificados. A coloração dos géis de poliacrilamida foi executada mergulhando-os por 5 minutos em uma solução fixadora, composta de álcool, ácido acético e água. Depois, foi adicionada uma solução de nitrato de prata por 10 minutos. As soluções foram descartadas e o gel lavado com água destilada. Por fim, os géis foram mergulhados na solução reveladora, composta de hidróxido de sódio, formol e água, até que as bandas do gel correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados aparecessem. Após a confirmação da amplificação pela visualização em gel de poliacrilamida, as amostras foram submetidas à clivagem por enzima de restrição.

#### 2.4. GENOTIPAGEM PARA OS GENES *LCORL* E *LASP1*

As reações de clivagem por enzima de restrição foram realizadas para identificar os diferentes alelos em cada loco das mutações estudadas. As enzimas de restrição foram escolhidas pelo software NEBcutter® V2.0, na qual foram submetidas parte das sequências onde as mutações estão localizadas (Tabela 2). Foram escolhidas as enzimas que reconhecem e clivam a sequência quando esta apresenta o alelo mutante. Sendo assim, as amostras clivadas indicaram indivíduos portadores da mutação, já as amostras não clivadas, indicaram indivíduos não portadores da mutação.

Para o loco do gene *LCORL* foi escolhida a enzima BsrI e para o loco do gene *LASP1* foi escolhida a enzima MwoI. Foi realizada uma simulação da digestão de todo o fragmento a ser amplificado pela PCR com a enzima escolhida para esta sequência (softwares Webcutter®2.0 e Restriction Mapper®) para confirmar a capacidade da digestão no loco da mutação e identificar outros possíveis sítios de fragmentação pela enzima escolhida.

Todas as reações de clivagem com enzima de restrição foram realizadas para um volume final de 20µl, sendo utilizado 1x de tampão específico para cada enzima de restrição, 5U de enzima de restrição, 4µl do produto da PCR e água deionizada.

Para todas as reações foi feito um controle negativo. As amostras foram colocadas no termociclador Applied Veriti® 96-Well a temperatura específica de funcionamento de cada enzima (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência SNPs dos genes *LCORL* e *LASP1*, enzima de restrição, temperatura de incubação e fragmentos esperados em cada genótipo.

GENE	ID	Sequência do SNP	ER	Ti	FE (pb)
<i>LCORL</i>	rs68603064	ttgcctggctagagaagcattcca	BsrI	37°C	t/t: 134; 85; 71
		g[c/t]ttatttctgtaccccaaagg			t/c: 205; 134; 85; 71
		cagaa			c/c: 205; 85
<i>LASP1</i>	rs68876319	agaaaactcgaacagggcagtc	MwoI	60°C	a/a: 204
		ccc[a/g]ccccacaaaccccc			a/g: 204; 123; 81
		aaaacgacag			g/g: 123; 81

ID: Identificação do SNP no National Center for Biotechnology Information. ER: Enzima de restrição. Ti: Temperatura de incubação. FE: Fragmentos esperados em pares de bases.

O produto das reações com as enzimas de restrição supracitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. As amostras e um padrão de peso molecular de 25bp DNA Ladder Promega® foram aplicados nos poços do gel para a confirmação dos fragmentos clivados. Os géis foram corados com solução de nitrato de prata e revelados com solução de hidróxido de sódio e formol. Os géis foram fotodocumentados no aparelho DNR - MiniBisPro®. Após esta visualização, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar usando o equipamento *Fragment Analyzer™* (Advanced Analytical) para a discriminação alélica por tamanho e identificação do polimorfismo.

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas ( $x_i$ ) de cada *loco* foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GenePop® versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), segundo as equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

Em que:

$x_i$  é a frequência do alelo  $i$ ;

$n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo  $i$ , respectivamente;

$n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Em que:

$x_i^2$  é a frequência esperada dos homozigotos do alelo  $i$ ;

$2 x_i x_j$  é a frequência esperada do heterozigoto  $ij$ ;

$2 x_j^2$  é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GenePop® versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

A diversidade genética média foi calculada para cada loco utilizando o programa Arlequin® (SCHNEIDER *et al.*, 2000) conforme a equação abaixo apresentada por Nei (1987):

$$H = \sum_{j=i}^r h_j / r$$

Em que:

$r$  é o número de locos utilizados;

$h_j$ , de acordo com a equação de Nei (1987) é a heterozigose esperada para cada locus na  $j$ -ésima população, estimada por:



$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Em que:

**m** é o número de alelos.

Esta medida de heterozigose média é equivalente à proporção média de heterozigotos por *locus* em uma população com padrão de acasalamento aleatório e, também, é igual à proporção de *loci* heterozigotos em um indivíduo escolhido aleatoriamente.

Outro parâmetro para medir a diversidade gênica é o FST. Este é o coeficiente de endogamia em um par de populações, dado pela probabilidade de dois alelos tomados ao acaso em duas populações serem idênticos por descendência (déficit de heterozigotos entre populações). Foi utilizado para se estimar a diversidade genética entre duas ou mais populações. Os cálculos foram feitos por meio do programa Arlequin® (Schneider *et al.*, 2000), utilizando-se método baseado na correlação entre alelos (Weir e Cockerham, 1984).

O estudo da altura da cernelha e da garupa de acordo com o genótipo do animal foi realizado pela análise de variância usando o seguinte modelo:

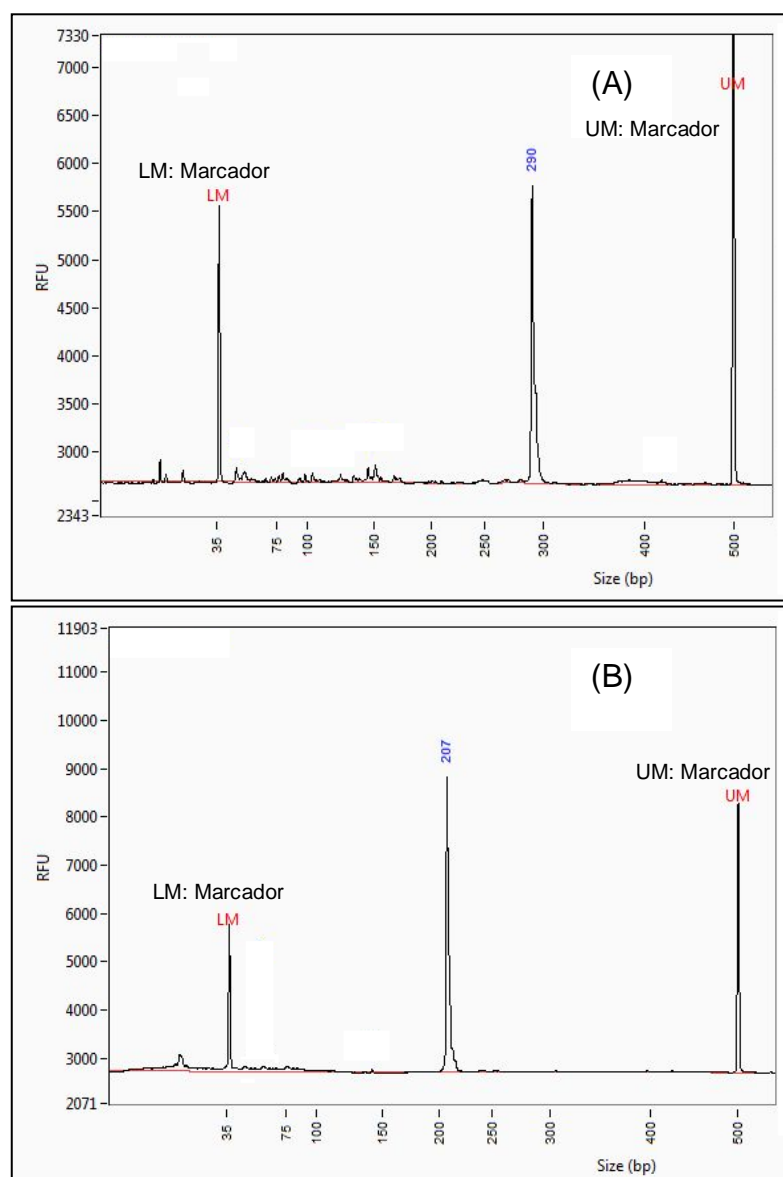
$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$$

onde  $Y_{ij}$  é a observação para a altura da cernelha e altura da garupa;  $\mu$  é a média da característica;  $G_i$  é o efeito do  $i$  ésimos genótipo e  $\varepsilon_{ij}$  é o erro aleatório. Foi utilizado o procedimento PROC GLIMMIX do software SAS® 9.2 (2009).

Foi utilizado o programa Structure® como método de avaliação de agrupamento populacional, baseado no modelo desenvolvido por Pritchard *et al.*, (2000), para a inferência de estrutura populacional utilizando dados genotípicos. As análises foram realizadas com  $K = 3$  como parâmetro predefinido para o número de populações assumidas como parentais, com 30.000 interações para o período *burn-in* e 100.000 interações adicionais para obter as estimativas dos parâmetros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos amplificados por PCR dos locos nos genes *LCORL* e *LASP1* apresentaram bandas consistentes, sem inespecificidade e dentro da expectativa dos primers desenhados para os locos com tamanhos de 290 pb e 204pb, respectivamente. Os fragmentos apresentaram uma variação máxima de  $\pm 3$  pares de bases entre os indivíduos na genotipagem em eletroforese capilar (Figura 1).

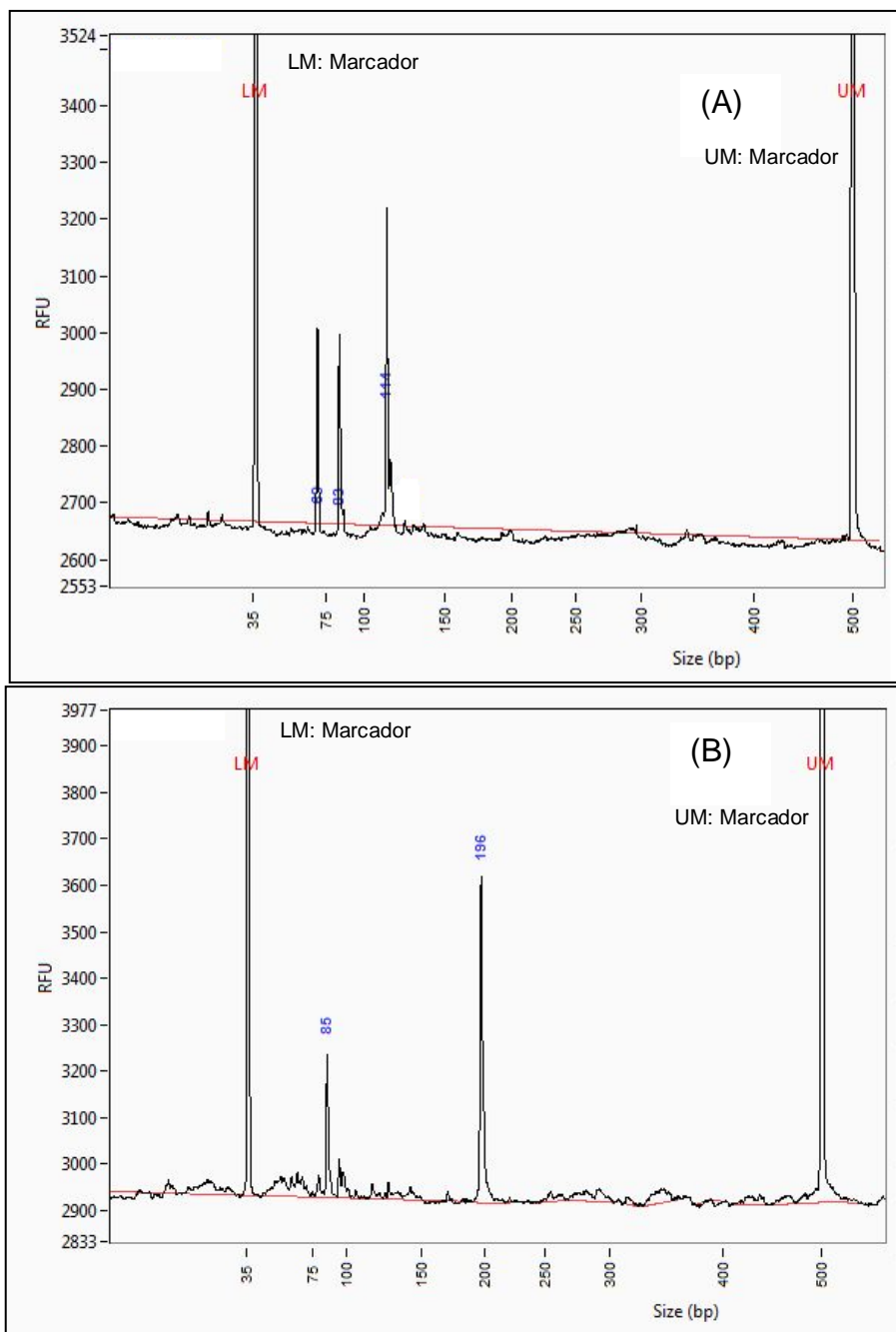


**Figura 1.** Eletroforese Capilar do fragmento amplificado por PCR. (A) Loco do gene *LCORL*. (B) Loco do gene *LASP1*.

As enzimas de restrição utilizadas neste trabalho (*BrsI* e *MwoI*) apresentaram-se específicas para a sequência de fusão e, mostraram eficiência satisfatória na digestão dos diferentes alelos dos genes *LCORL* e *LASP1* (Figura 2, 3 e 4).

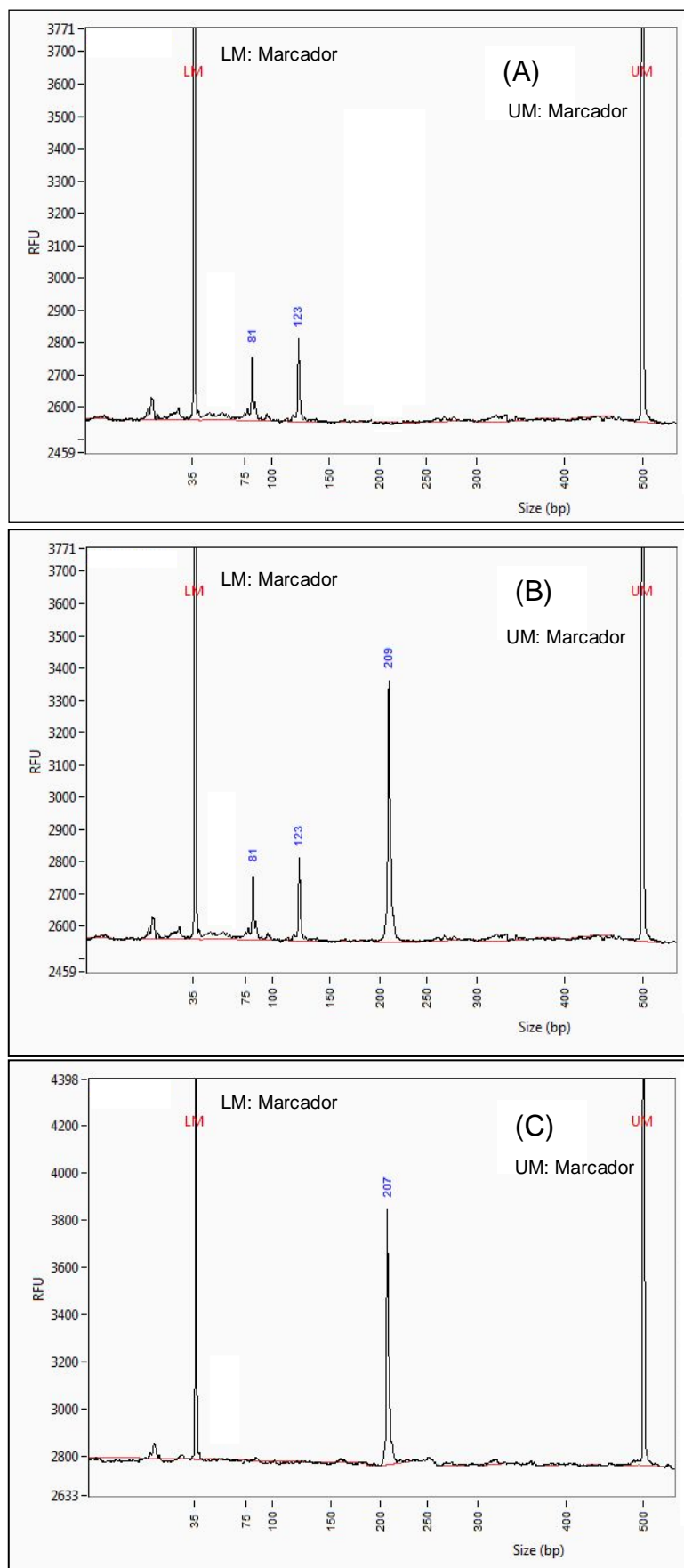
No loco da mutação do gene *LCORL* foram identificados os genótipos T/T e C/C, não apresentando nenhum indivíduo com alelo C/T. Os fragmentos apresentados após clivagem no genótipo T/T foram de 134pb, 85pb e 71pb, enquanto no genótipo C/C os fragmentos foram de 205pb e 85pb. A clivagem do fragmento de 85pb apresentado nos dois genótipos corresponde a um segundo sítio de fusão da enzima *BrsI*, comum em todos os indivíduos e não correspondente a nenhuma mutação (Figuras 2 e 4A).

Os genótipos encontrados no loco da mutação do gene *LASP1* foram G/G, A/G e A/A. Os fragmentos após clivagem no genótipo G/G foram de 123pb e 81pb, no genótipo A/G os fragmentos foram de 204pb, 123pb e 81pb, e no genótipo A/A o fragmento não foi clivado por não apresentar neste genótipo a sequência de fusão da enzima *MwoI* apresentando o mesmo fragmento obtido após amplificação pela PCR de 204pb (Figuras 3 e 4).



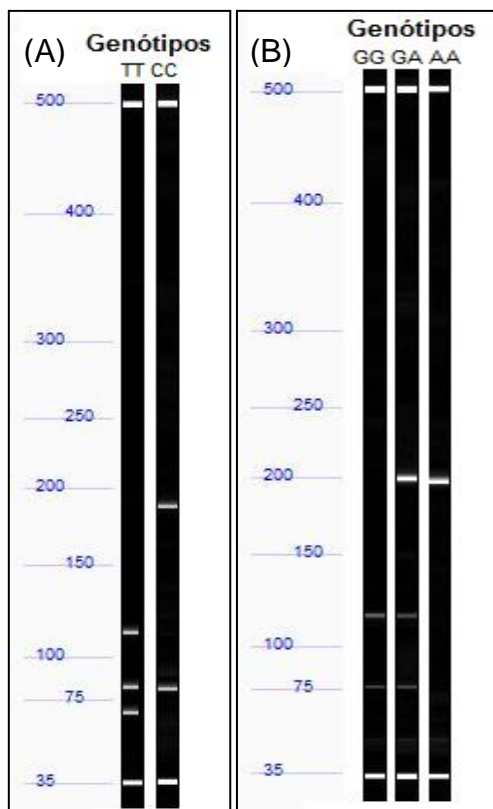
LM: marcador 25 pb; UM: marcador 500pb.

**Figura 2.** Curva da Eletroforese Capilar no loco do SNP do gene *LCORL*. (A) Genótipo T/T. (B) Genótipo C/C.



LM: marcador 25 pb; UM: marcador 500pb.

**Figura 3.** Curva da Eletroforese Capilar no loco do SNP do gene *LASP1*. (A) Genótipo G/G. (B) Genótipo A/G. (C) Genótipo A/A.



**Figura 4.** Gel da Eletroforese Capilar e genótipos no loco do SNP do gene (A) *LCORL* e (B) *LASP1*.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da frequência genotípica, frequência alélica e Equilíbrio de Hardy–Weinberg nos genes *LCORL* e *LASP1* para os SNPs avaliados.

No gene *LCORL* a frequência do genótipo T/T e a frequência do alelo T foi de 99,17% e do genótipo C/C e a frequência do alelo C foi de 0,83%. Os equinos avaliados neste trabalho apresentaram grande frequência do alelo T e do genótipo T/T, onde apenas um equino da raça Percheron apresentou o alelo C em homozigose. A elevada frequência do genótipo T/T caracteriza o SNP como não polimórfico para os indivíduos do estudo, segundo McManus *et al.*, (2011), considera-se um loco polimórfico quando o alelo mais comum tem a frequência inferior a 90%.

Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Makvandi-Nejad *et al.* (2012) que avaliaram diferentes raças de equinos de tamanhos variados, encontrando em animais pôneis o genótipo T/T e para a raça Percheron de grande porte identificou exclusivamente o genótipo C/C para esta mutação no loco do gene *LCORL*.

Os valores de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) no gene *LCORL* mostram equilíbrio com o SNP avaliado; embora nota-se a elevada frequência do alelo T, a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Vale ressaltar que este é calculado com base nas frequências alélicas observadas e os genótipos dos indivíduos, entretanto por ser um loco não polimórfico, não se pode considerar este loco em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foi também calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população diferente para o loco no gene *LCORL*. No Haras 1 e Haras 2 o equilíbrio foi nulo pois só apresentou o alelo T e não permitiu a avaliação por não apresentar polimorfismo, entretanto nos animais do Controle o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 0.05891, com um indivíduo homocigoto C/C e oito indivíduos homocigotos T/T, apresentando esses indivíduos capacidade de segregar seus alelos.

Possivelmente a grande frequência do genótipo T/T nos equinos da raça Pônei Brasileiro, está associado à influência deste genótipo na altura dos equinos de pequeno porte, como sugerido por alguns autores (MAKVANDI-NEJAD *et al.*, 2012; METZGER *et al.*, 2013; TETENS *et al.*, 2013; BOYKO *et al.*, 2014).

Os genótipos G/G, A/G e A/A do gene *LASP1* apresentaram frequência genotípica de 3,28%, 42,62% e 54,10%, respectivamente. A frequência alélica do alelo G foi de 25,82% e do alelo A foi de 74,18%. Makvandi-Nejad *et al.*, (2012), por outro lado encontraram uma alta frequência do alelo G nos animais de raças pôneis, e alta frequência do alelo A nos equinos de alta estatura. Possivelmente esta diferença se deve a maior altura dos animais utilizados ou a não associação deste loco com a altura dos equinos.

O SNP avaliado no gene *LASP1* encontra-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ) pela baixa frequência genotípica de homocigotos para o alelo G, e, portanto, possuem capacidade de segregar.

Avaliando as populações separadamente, podemos observar que os animais do Haras 1 não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg (0.40785), possivelmente pela maior quantidade de homocigotos nesta população, enquanto os animais do Haras 2 e Controle apresentaram-se dentro do equilíbrio (0.0306 e 0.0106, respectivamente).

**Tabela 3.** Frequência genotípica, frequência alélica e Equilíbrio de Hardy–Weinberg nos genes *LCORL* e *LASP1* para os SNPs avaliados.

Gene	Frequência Genotípica (n <sup>0</sup> )	Frequência Alélica	P-HW
<i>LCORL</i>	T/T: 99,17% (120)	T: 99,17%	0.0043**
	C/C: 0,83% (1)	C: 0,83%	
	C/T: 0% (0)		
<i>LASP1</i>	G/G: 3,28%(4)	G: 25,82%	0.1436
	A/G: 42,62%(52)	A: 74,18%	
	A/A: 54,10%(66)		

\*A probabilidade de equilíbrio Hardy–Weinberg foi testada a 5% (Valores de Qui- quadrado > 0,05 significam que o SNP está em desequilíbrio).

n<sup>0</sup>: número de indivíduos. P-HW: probabilidade de equilíbrio Hardy–Weinberg.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos índices genéticos populacionais de: heterozigose observada, heterozigose esperada, heterozigose média esperada ou diversidade alélica e, o índice de endogamia (Fis) dos locos das mutações dos genes *LCORL* e *LASP1*.

No SNP estudado do gene *LCORL* a heterozigose esperada foi de 0,199, entretanto não foi encontrado nenhum indivíduo heterozigoto. A diversidade alélica foi de 0,02, indicando uma baixa diversidade para esta mutação, conseqüentemente o nível de endogamia da população foi elevado (1,00), indicando que a população do estudo é endogâmica para a mutação no gene *LCORL*. Possivelmente este nível de endogamia está associado à influência deste genótipo na altura dos equinos de pequeno porte e da intensa seleção realizada para esta característica nos animais estudados.

Na mutação do gene *LASP1* a heterozigose observada foi superior a heterozigose esperada, 0,550 e 0,469 respectivamente, indicando ganho de heterozigosidade que juntamente com o valor da diversidade alélica do loco (0,38), caracteriza o SNP com alta diversidade na população.



**Tabela 4.** Índices genéticos de equinos do norte do estado do Rio de Janeiro segundo as mutações dos genes *LCORL* e *LASP1*.

Gene	Heterozigose Observada (Ho)	Heterozigose Esperada (He)	Diversidade Alélica	Fis
<i>LCORL</i>	0,000	0,199	0,02	1,0000
<i>LASP1</i>	0,550	0,469	0,38	-0,1729

Fis: índice de endogamia.

Na tabela 5 apresentam-se os valores do índice de fixação ( $F_{st}$ ) que avalia o valor da divergência entre as populações. De acordo com Slatkin (1995) valores de  $F_{st}$  abaixo de 0,15 indicam ausência de estrutura genética; de 0,15 a 0,25 mostram uma estruturação genética moderada e maior que 0,25 indica alta estruturação.

Foram avaliados os três grupos populacionais utilizados no estudo, Haras 1, Haras 2 e Controle. Entre o Haras 2 e o grupo Controle foi observado uma estruturação genética moderada ( $F_{st} = 0,18168$ ), indicando uma similaridade entre estas populações. Foi ainda observado ausência de estruturação genéticas entre o Haras 1 e Haras 2, e entre o Haras 1 e o grupo Controle. Estes cálculos são baseados nas freqüências genotípicas das populações, onde os animais do Haras 1 não apresentou homocigotos G/G para o loco do gene *LASP1* diferenciando dos outros grupos.

Na análise de agrupamento populacional (Tabela 6) realizada pelo Programa Structure 2.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000), as três populações se distribuem igualmente nos três grupos escolhidos inicialmente para análise. Os três grupos foram compostos por uma distribuição de 33,3% de cada população; ou seja, cada indivíduo apresentou uma similaridade aproximada de 0,333 com cada um dos grupos, indicando que as três populações não diferiram em grupos de adequação. A probabilidade de similaridade de cada indivíduo em relação aos três grupos pode ser claramente visualizada na Figura 5 e 6.

Na Figura 6 encontra-se a representação esquemática da disposição dos indivíduos em relação a cada grupo. Pode-se observar que os indivíduos de todas as três populações apresentam-se no centro, entre os três grupos e sobrepostos devido à similaridade.

**Tabela 5.** Valores de índice de fixação (Fst) e de probabilidade gerado entre cada população de equinos do norte do estado do Rio de Janeiro.

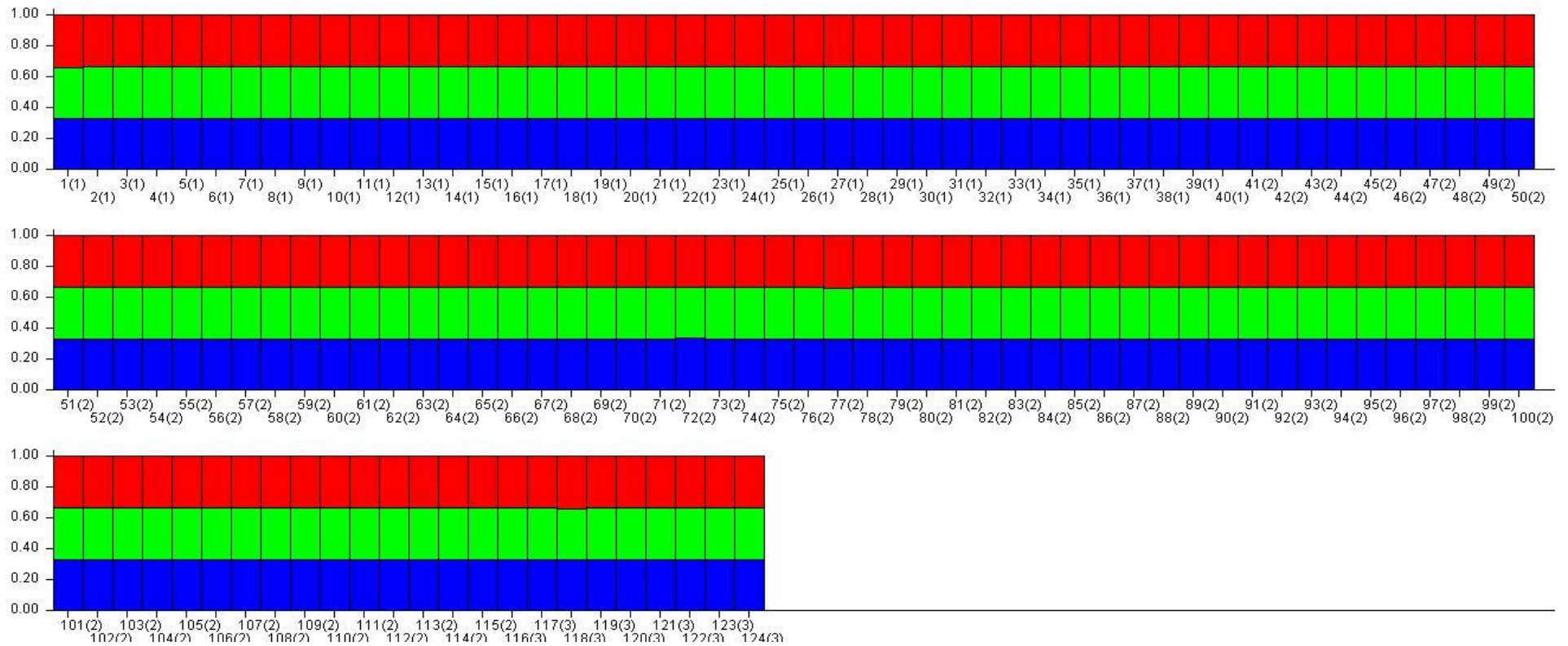
<b>População</b>	<b>Haras 1 Fst(P)</b>	<b>Haras 2 Fst(P)</b>	<b>Controle Fst(P)</b>
<b>Haras 1</b>	-		
<b>Haras 2</b>	-0.00299 (0.387)	-	
<b>Controle</b>	0.10522 (0.027)	0.18168* (0,000)	-

Fst: índice de fixação; P: probabilidade.

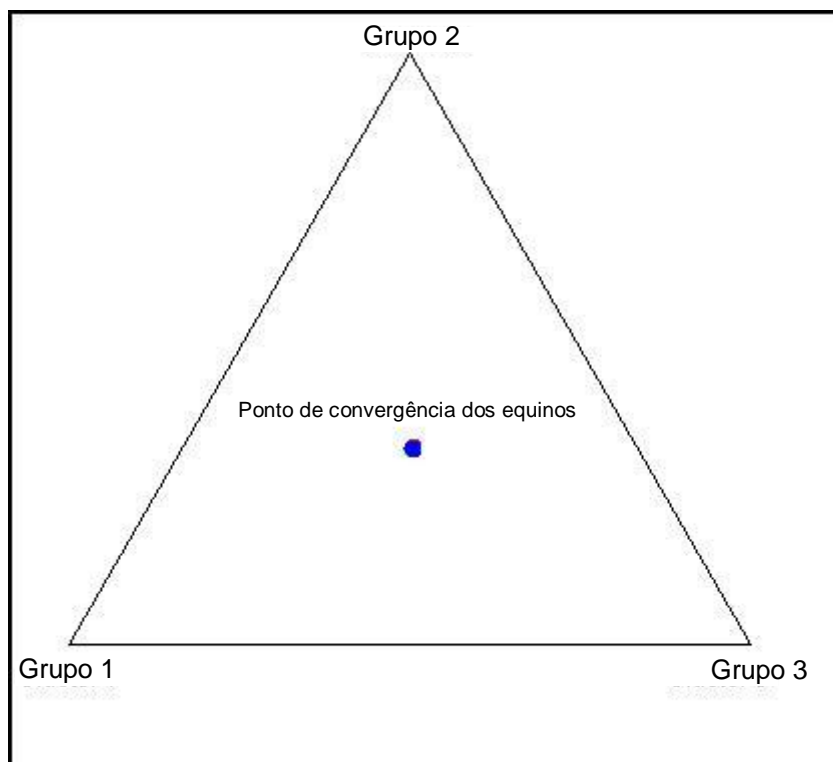
**Tabela 6.** Proporção de adequação de cada população de equinos do norte do estado do Rio de Janeiro em cada um dos três grupos pré-definidos.

<b>População</b>	<b>n<sup>0</sup></b>	<b>Grupos</b>		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Haras 1</b>	40	0.333	0.334	0.333
<b>Haras 2</b>	75	0.333	0.333	0.333
<b>Controle</b>	9	0.333	0.334	0.333

n<sup>0</sup>: Número de indivíduos.



**Figura 5.** Representação da probabilidade de cada equino pertencer a cada grupo. (Vermelho: Grupo 1, Verde: Grupo 2, Azul: Grupo 3)



**Figura 6.** Representação esquemática da disposição dos indivíduos em relação a cada grupo.

A Tabela 7 apresenta as médias de altura da cernelha e garupa para os genótipos nos SNPs dos genes *LCORL* e *LASP1*. Houve diferenças nas características devidas a presença dos SNPs ( $P < 0,05$ ).

O SNP do gene *LCORL* mostrou média diferente ( $P < 0,05$ ) para o genótipo C/C na altura dos equinos em relação ao genótipo T/T. A média de altura da cernelha e altura de garupa para o genótipo C/C 1,69m, o genótipo T/T apresentou as menores médias altura da cernelha e altura de garupa (0,927m e 0,940m, respectivamente). O genótipo C/C foi encontrado em apenas um indivíduo da raça Percheron pertencente ao grupo controle com altura da cernelha de 1,69m.

Este SNP do gene *LCORL* é apontado por Makvandi-Nejad *et al.* (2012) como a mutação de maior associação com a altura dos equinos. Todos os equinos da raça Pônei Brasileiro apresentaram o genótipo T/T relacionado à baixa estatura, possivelmente pela elevada associação deste SNP com a estatura. Também apresentaram o genótipo T/T oito dos nove animais do grupo controle, exceto o equino da raça Percheron que apresentou o genótipo G/G. A média de altura da cernelha destes animais foi de 1,52m, com menor altura o equino da raça

Mangalarga Marchador (1,47m), e com maior altura o animal da raça Quarto de Milha (1,58m).

**Tabela 7.** Médias e respectivos desvios padrão da altura da cernelha e altura da garupa (em metros) para o SNPrs68603064 no gene *LCORL* e rs68876319 no gene *LASP1* de acordo com o genótipo de equinos do norte do estado do Rio de Janeiro.

<i>LCORL</i>	[T/T]		[C/T]		[C/T]	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Altura da cernelha	0,927 <sup>b</sup>	±0,171	-	-	1,690 <sup>a</sup>	±0,00
Altura da garupa	0,940 <sup>b</sup>	±0,171	-	-	1,690 <sup>a</sup>	±0,00
<i>LASP1</i>	[G/G]		[A/G]		[A/A]	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Altura da cernelha	0,929 <sup>ab</sup>	±0,048	1,003 <sup>a</sup>	±0,255	0,872 <sup>b</sup>	±0,056
Altura da garupa	0,954 <sup>ab</sup>	±0,043	1,013 <sup>a</sup>	±0,252	0,886 <sup>b</sup>	±0,062

Médias na mesma linha com letras diferentes sobrescritas diferem significativamente no teste t a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

A mutação do loco do gene *LCORL* apresentou correlações moderadas de 0,38 ( $P < 0,001$ ) com a altura da cernelha e de 0,37 ( $P < 0,001$ ) com a altura da garupa. Estes resultados indicam a associação da mutação com a altura dos animais e a medida que os genótipos passam de T/T (menor altura) para C/C (maior altura), a altura da cernelha e a altura da garupa dos animais tendem a aumentar.

Estes resultados corroboram com os achados obtidos por Makvandi-Nejad *et al.* (2012), que identificaram uma frequência de 100% do genótipo T/T em animais pôneis de diferentes raças e de animais das raças PR Paso Fino e Friesian de grande porte que apresentam média de altura da cernelha até 1,60m. O genótipo C/C foi encontrado por Makvandi-Nejad *et al.* (2012), com frequência de 100% em animais das raças Suffolk, Ardennais, Brabant, Belgian, Clydesdale e Percheron, raças que apresentam média de altura da cernelha acima de 1,60m, e frequência alélica de 50% para o alelo C e T em animais da raça Shire com média de altura da cernelha de 1,85m.

Tetenns *et al.* (2013) avaliaram 782 garanhões da raça alemã Warmblood através da genotipagem com chip de alta densidade (Chip 50K Illumina®) e inferiram a associação genômica com a estatura dos animais, identificando o SNP T<C do gene *LCORL* como responsável por 18% da variação total da altura dos animais avaliados.

Metzger *et al.* (2013), identificaram através de associação genômica que o genótipo T/T foi quase perfeitamente associado a todas as raças de pônei até o valor limite de 1,48m para a altura da cernelha. Cavalos que variam entre 1,30m a 1,60m de altura da cernelha apresentaram genótipos T/T e C/T, enquanto os cavalos de maior altura e mais pesados mostraram predominantemente, o genótipo C/C.

Avaliando a expressão do gene *LCORL*, Metzger *et al.* (2013) observaram que em heterozigotos C/T os níveis de expressão de *LCORL* diminuíram significativamente em 40%, e em homozigotos C/C diminuíram 56% em relação aos cavalos de menores tamanho T/T. Análises de bioinformática indicaram que esta mutação SNP (T<C), interrompe um sítio de ligação putativo do fator de transcrição TFIID que é importante para o processo de transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento do esqueleto ósseo.

Pode-se considerar que, o SNP do gene *LCORL* seria possivelmente capaz de diferenciar animais com altura da cernelha de aproximadamente, 1,60m. Indivíduos abaixo desta altura tendem a apresentar o genótipo T/T e, indivíduos acima desta altura tende a apresentar o genótipo C/C.

Para o SNP do gene *LASP1* houve diferenças nas médias dos genótipos A/A e A/G ( $P<0,05$ ). O genótipo heterozigoto A/G, com altura média da cernelha da 1,003m e na altura da garupa de 1,013m, apresentou maior altura do que o genótipo A/A. As médias para a altura da cernelha e de garupa para o genótipo G/G foram de 0,927m e 0,940m, respectivamente, similar ao genótipo A/A, que apresentou média de altura da cernelha de 0,872m e para a altura de garupa de 0,886m.

Esta diferença seria causada pela presença deste genótipo (A/G) em todos os animais utilizados como controle que elevou a média de altura para este genótipo. Apesar da diferença de altura entre os animais, o SNP do gene *LASP1* não foi capaz

de diferenciar os equinos dentro do grupo Controle; e também, não foi capaz de diferenciar os equinos da raça Pônei Brasileiro entre si.

Ao avaliar apenas a altura dos equinos da raça Pônei Brasileiro, verificou-se que os genótipos apresentaram médias semelhantes para as alturas da cernelha e da garupa, com o genótipo A/G apresentando média na altura da cernelha de 0,890m e na altura de garupa de 0,901m. Para o genótipo G/G as médias para a altura da cernelha e de garupa foram de 0,927m e 0,940m, respectivamente. O genótipo A/A, apresentou média de altura da cernelha de 0,872m e para a altura da garupa de 0,886m.

Petersen *et al.* (2013), através da genotipagem de SNPs e associação genômica ampla, identificaram um loco no gene *LASP1* no cromossomo 11 como possível gene candidato associado à altura dos equinos. Jun *et al.* (2014), avaliando cavalos da raça Marwari também por associação genômica ampla, identificaram o gene *LASP1* como possível gene candidato para a estatura.

Makvandi-Nejad *et al.* (2012) identificaram quatro mutações com alta associação com a altura, o SNP localizado no gene *LASP1* foi o de menor associação dentre as quatro mutações. Diferente do encontrado neste trabalho, Makvandi-Nejad *et al.* (2012) encontraram uma alta frequência do alelo A (associado a maior estatura) em equinos de alta estatura, e alta frequência do alelo G, em equinos de baixa estatura. Entretanto em animais da raça Friesian de estatura média a alta, a frequência do alelo A foi aproximadamente 33%, e similar a encontrada em animais de raças pôneis (Falabella, Welsh Pony e Dartmoor Pony).

Possivelmente a associação encontrada por Makvandi-Nejad *et al.* (2012), foi em decorrência do baixo número de animais genotipados por chip de alta densidade (Chip 50K Illumina®) (16 raças e 48 indivíduos no total). Assim, apesar dos elevados custos, a genotipagem de um número maior de indivíduos de cada raça, possivelmente possa inferir com maior acurácia as mutações (de maior e menor influência) associadas à estatura dos equinos.

Estudos envolvendo outros SNPs associados ao crescimento são necessários para estudar as interações genéticas com a estatura dos equinos.

A identificação de SNPs em genes de menor efeito seria necessária para permitir a seleção de equinos pôneis para uma menor estatura.



#### 4. CONCLUSÕES

A associação do polimorfismo do gene *LCORL* com medidas lineares de altura, confirmaria a influência do gene no crescimento e estatura dos equinos. O genótipo T/T afeta o crescimento caracterizando animais de menor estatura, enquanto o genótipo C/C é encontrado em animais de alta estatura.

O SNP presente no gene *LASP1* não apresentou associação com a altura nos animais da raça Pônei Brasileiro avaliados neste trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.M.; GUIMARAES, S.F.; MACHADO, T.M.; LOPES, P.S.; PEREIRA, C.S.; SILVA, F.R.; RODRIGUES, M.T.; COLUMBIANO, V.S.; FONSECA, C.G. Genetic diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats and the naturalized Brazilian Moxoto breed. In: Genet. Mol. Biol., v.29, n.1, p. 67–74, 2006.

BOYKO, A.R.; BROOKS, S.A.; BEHAN-BRAMAN, A.; CASTELHANO, M.; COREY, E.; KYLE C OLIVEIRA, K.C.; SWINBURNE, J.E.; TODHUNTER, R.J.; ZHANG, Z.; AINSWORTH, D.M.; ROBINSON, N.E. Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in Thoroughbreds. BMC Genomics, V.15, n.259, 2014.

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; RESENDE, A.S.C.; FONSECA, C.G. Análise temporal da endogamia e do tamanho efetivo da população de equinos da raça Mangalarga Marchador. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.57, n.1, p.112-119, 2005.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. Estudos Avançados, 24 (70), p.123-147. 2010.

EBERTH, J.E. Chondrodysplasia-like dwarfism in the miniature horse. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da University of Kentucky, 83p. 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. Edit. Folha de Viçosa, p. 351-355, 2009.

GARCIA J.F. & PORTO-NETO L.R. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. Acta Scientiae Veterinariae. 34 (Supl 1): 197-203. 2006.

JUN, J.; CHO, Y.S.; HU, H.; KIM, H.M.; JHO, S. *et al.*, Whole genome sequence and analysis of the Marwari horse breed and its genetic origin. BMC Genomics, v.15, s.9, 2014.

LANGO, A.H.; ESTRADA, K.; LETTRE, G.; BERNDT, S.I.; WEEDON, M.N. *et al.*, Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. Nature, n.467, p.832–838, 2010.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 250p. 2006.

MAKVANDI-NEJAD, S.; HOFFMAN, G.E.; ALLEN, J.J.; CHU, E.; GU, E.; *et al.*, Four Loci Explain 83% of Size Variation in the Horse. PLoS ONE, v. 7, n. 7, e39929, 2012.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P>S.; SEIXAS, L.; MELO, C.B. de. Estatísticas para descrever genéticas de populações. INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. Série Técnica: Genética, 50p., 2011. Disponível em <[http://animal.unb.br/imagens/Serie\\_tecnica\\_genetica\\_populacoes.pdf](http://animal.unb.br/imagens/Serie_tecnica_genetica_populacoes.pdf)>. Acesso em 14/02/2015.

METZGER, J.; SCHRIMPF, R.; PHILIPP, U.; DISTL, O. Expression Levels of LCORL Are Associated with Body Size in Horses. *Plos One*, v.8, n.2, 2013.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press. 1987.

OKADA, Y.; KAMATANI, Y.; TAKAHASHI, A.; MATSUDA, K.; HOSONO, N.; *et al.*, A genome-wide association study in 19 633 Japanese subjects identified LHX3-QSOX2 and IGF1 as adult height loci. *Hum Mol Genet* 19: 2303–2312, 2010.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento Genético aplicado à produção animal. Editora FEPMVZ, 5 edição, Belo Horizonte, 617p. 2008.

PEREIRA, G.L. SNPs em genes candidatos para potencial atlético como possíveis marcadores para desempenho em corrida em equinos da raça Quarto de Milha. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 69p, 2014.

PETERSEN, J.L.; MICKELSON, J.R.; RENDAHL, A.K.; VALBERG, S.J.; ANDERSSON, L.S. *et al.*, Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds. *PLOS Genetics*, v.9, n.1, 2013.

PIROLI, R.A. Caracterização da variabilidade de genes relacionados à fisiologia do sistema imune em equinos da raça Mangalarga. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 58p, 2010.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F.; GENEPOP (version 2.0): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered*, v.86, p.248-249, 1995.

SAS. Statistical Analysis Systemy software release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2009.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SLATKIN, A.K. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, p.457-462, 1995.

TETENS, J.; WIDMANN, P.; KÜHN, C.; THALLER, G. A genome wide association study indicates LCORL/NCAPG as a candidate locus for withers height in German Warmblood horses. *Animal Genetics*, v.44, n.4, p.467-471, 2013.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.