

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

SNP 22684390C>T do gene *COX4I2* (citocromo c oxidase, subunit 4, isoform 2) nas linhagens de corrida e trabalho da raça Quarto de Milha¹

Guilherme Luis Pereira², Rogério Abdallah Curi³, Luciana Correia de Almeida Regitano⁴, Flavia Aline Bressani⁴, Joseneudson Augusto II Vasconcelos Silva³, Marcílio Dias Silveira da Mota³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp, Jaboticabal. Bolsista do CNPq. email:

guipicoia@hotmail.com

³Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal – FMVZ/Unesp, Botucatu.

⁴Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos.

Resumo: Por possuírem diferentes aptidões, a seleção de forma divergente na raça Quarto de Milha culminou com a formação de diferentes linhagens, entre as quais a de corrida e a de trabalho. A isoforma 2 da proteína COX4 codificada pelo gene *COX4I2* (*citocromo c oxidase, subunit 4, isoform 2*) tem sido associada com maior volume de mitocôndrias nas células. Neste sentido foi proposto que este gene estaria ligado ao aumento da eficiência da respiração celular. O polimorfismo 22684390C>T do *COX4I2* foi associado ao melhor desempenho em corridas de equinos da raça Puro-Sangue Inglês, sendo que animais de genótipo TT tiveram desempenho superior aos de genótipos CT e CC. Foram genotipados, por meio de PCR-RFLP, 229 equinos Quarto de milha, sendo 161 da linhagem de corrida e 68 da de trabalho. Para a linhagem de corrida foi identificado desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). Não foram identificadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre as linhagens de corrida e trabalho. Porém, ao considerar o alelo T recessivo (TT x C₋), houve diferença significativa ($P < 0,05$) das frequências entre as linhagens, com menor frequência do genótipo TT na linhagem de corrida (0,10) em relação à de trabalho (0,22). Diferentemente do observado na raça Puro-Sangue Inglês, os resultados aqui apresentados sugerem que, provavelmente, o genótipo TT não esteja ligado ao melhor desempenho em corridas na raça Quarto de Milha.

Palavras-chave: cavalo, desempenho, genótipos, PCR-RFLP

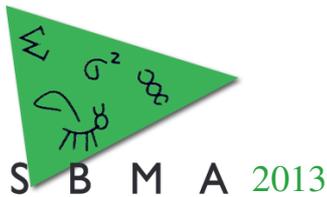
SNP (22684390C>T) in the *COX4I2* gene strains of running and working Quarter Horses

Abstract: Because they have different abilities, divergent selection in Quarter Horses culminated in the formation of different lines, including the race and work lines. The second isoform of the protein COX4 encoded by the gene *COX4I2* (Cytochrome c oxidase, subunit 4 isoform 2) has been associated with increased volume of mitochondria in the cells. Thus it has been proposed that this gene is linked to the increased efficiency of cellular respiration. *COX4I2* polymorphism 22684390C> T was associated with better performance in Thoroughbred racing horses, and animals of TT genotype had higher performance than CC and CT genotypes. IN the present work, 229 Quarter horses, being 161 from the race and 68 from the work lines, were genotyped by means of PCR-RFLP. For the racing lineage it was identified deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). There were no significant differences in allele and genotype frequencies between strains of race and work. However, when considering allele T as recessive (TT x C₋), significant frequencies differences ($P < 0.05$) between strains, with lower frequency of TT genotype in race (0.10) in relation to work (0.22) line. Unlike what was observed in Thoroughbred race, the results presented here suggest that, probably, the TT genotype is not linked to better performance in the racing Quarter Horses.

Keywords: genotype, horse, PCR-RFLP, performance

Introdução

A raça Quarto de Milha teve sua formação na América do norte a partir do século XVII com a introdução de raças árabes e turcas trazidas por colonizadores europeus. Devido principalmente a sua robustez e versatilidade, esta raça foi importante na ocupação do oeste Norte Americano, momento em que ocorreu a sua expansão (ABQM, 2012). Na década de 1940 foi criada a *American Quarter Horse Association* (AQHA), que tem hoje cinco milhões de equinos registrados em todo o mundo. Com rebanho avaliado em US\$ 785,5 milhões, o Brasil conta com mais de 358 mil animais registrados junto a



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

associação brasileira de criadores de Quarto de Milha (ABQM, 2012). Além da agilidade e *cow sense*, equinos desta raça são exímios velocistas e foram utilizados, desde a sua formação, em corridas de curtas distâncias (AQHA, 2013). Devido a diferentes objetivos de criação e seleção ao longo da sua história, a raça acabou dividida em três linhagens: a de corrida, a de trabalho e a de conformação.

Em geral a raça Quarto de milha apresenta grande proporção de fibras de contração rápida do tipo 2 (glicolítica), sendo extremamente adaptada ao ambiente celular anaeróbico (Valberg & MacLeay, 1998). A subunidade 4 da citocromo c oxidase (COX4) é responsável pela regulação e montagem das subunidades mitocondriais e tem sido associada com o volume da organela (Fukuda et al., 2007). Em ambientes de oxigênio limitado o regulador principal de resposta à hipoxia, HIF-1 (fator induzível de hipoxia 1), ativa a transcrição dos genes *COX4I2* e *LON* mitocondrial. Neste sentido, tem sido proposto que a regulação ambiental do *COX4I2* pode aumentar a eficiência da respiração celular (Fukuda et al., 2007). Gu et al. (2010) identificaram uma fraça, mas significativa, associação entre o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) intrônico 22684390C>T do gene *COX4I2* de equinos e o desempenho em corridas na raça Puro-Sangue Inglês (PSI). Animais homocigotos (TT) foram fenotipicamente superiores aos de genótipo CC e CT.

Com base nestas informações o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de diferenças nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo 22684390C>T do gene *COX4I2* entre as linhagens de corrida e de trabalho de equinos da raça Quarto de Milha.

Material e Métodos

Foram utilizados 229 animais da raça Quarto de Milha, dos quais 68 eram de trabalho, destinados a aptidão e rédeas, e 161 eram de corrida. Os animais escolhidos fazem parte da população efetiva, visando obter amostras representativas das linhagens.

Foram coletadas amostras de 5mL de sangue total de cada animal, por meio de tubos a vácuo contendo 7,5mg de EDTA. O processo de extração de DNA foi realizado no Laboratório de Genética e Melhoramento Animal (LGMA) da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP, utilizando o *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação dos genótipos do SNP 22684390C>T do gene *COX4I2* foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP com a utilização da endonuclease *XceI* (*NspI*) e os *primers*: *Forward* 5' CCC CCA AAT ACT GAA TGC AC 3' e *Reverse* 5' GCC AGG AGC TAG TGA CAA GG 3'. Os fragmentos de DNA obtidos foram separados em gel de agarose a 3%, em um sistema de eletroforese horizontal. Para obtenção dos genótipos, os fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta.

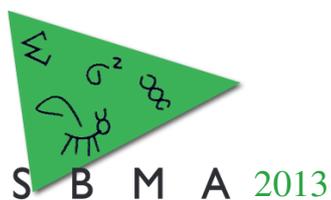
Foram avaliados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) por meio do teste exato por permutação e teste qui-quadrado. As diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre as linhagens foram avaliadas pelo teste qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade, respectivamente, e 5% de significância. Para estas análises foi utilizado o pacote genetics do software R.

Resultados e Discussão

Para o polimorfismo testado (22684390C>T) foi encontrado desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,0203$) dentro da linhagem de corrida. Não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) das frequências genotípicas ($P = 0,0716$) e alélicas ($P = 0,1653$) entre as linhagens de corrida e trabalho. Porém ao considerar o alelo T como recessivo, a diferença entre linhagens foi significativa ($C_1 \times TT$, $P = 0,0370$), o que não ocorreu quando o alelo T foi considerado dominante ($T_1 \times CC$, $P = 0,7149$) (Tabela 1).

No PSI o genótipo recessivo TT foi associado ao melhor desempenho (maior velocidade) em corridas com distâncias menores que 1609 metros, consideradas curtas para a raça (Gu et al., 2010), entretanto muito superior à distância média de corridas para a qual a raça Quarto de Milha foi selecionada. Para o total de animais amostrados (ambas as linhagens) o genótipo TT apresentou menor frequência. Entretanto, ao contrário do que poderia ser esperado, foi encontrado em maior proporção na linhagem de trabalho (Tabela 1), a qual se supõe não sofreu seleção recente para velocidade.

Embora neste estudo não tenham sido encontradas diferenças alélicas significativas entre as linhagens, o não equilíbrio de Hardy-Weinberg e a frequência significativamente maior dos genótipos



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

CC e CT (C₋) na linhagem de corrida, podem indicar uma possível seleção destes genótipos dentro desta linhagem, levando a crer que em distâncias muito curtas o genótipo TT não contribua para o melhor desempenho. É possível ainda que variantes do gene *COX4I2* não desempenhem papel importante na diferenciação dos equinos para maior velocidade e que o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg na linhagem de corrida esteja associado a outro fator que não a seleção. Em virtude de esta abordagem ser inconclusiva, há a necessidade da realização estudos de associação para elucidar o real papel deste polimorfismo no desempenho de equinos da raça Quarto de Milha.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 22684390C>T do gene *COX4I2* em equinos da raça Quarto de Milha

		Corrida (n=161)		Trabalho (n=68)		G.L.	χ^2	P-value
		n	frquências	n	frequências			
Genótipos	CC	53	0,33	20	0,29	2	5,2729	0,0716
	CT	91	0,57	33	0,49			
	TT	17	0,11	15	0,22			
Alelos	C	197	0,61	73	0,54	1	1,9255	0,1653
	T	125	0,39	63	0,46			
Dominante	T ₋	108	0,61	48	0,54	1	0,1334	0,7149
	CC	53	0,38	20	0,46			
Recessivo	TT	17	0,10	15	0,22	1	4,3463	0,0370
	C ₋	144	0,90	53	0,78			

G.L. = graus de liberdade, n= numero de indivíduos, genótipos e alelos

Conclusões

Embora os resultados tenham indicado o alelo T como recessivo, as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 22684390C>T do gene *COX4I2* não permitiram a distinção das linhagens de corrida e trabalho da raça Quarto de Milha. Portanto, há necessidade de, além de testar as diferenças de frequências genotípicas e alélicas entre grupos de animais com histórico de desempenho divergente, realizar de estudos de associação.

Literatura citada

- ABQM. Associação brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha [2012]. Disponível em <<http://www.abqm.com.br/item1.htm>> acesso em: 22/05/2013
- AQHA. American Quarter Horse Association [2013]. Breed History. Disponível em: <<http://www.aqha.com/About/Content-Pages/The-American-Quarter-Horse/Breed-History.aspx>> acesso em: 23/05/2013
- FUKUDA, R.; ZHANG, H.; KIM, J.W.; SHIMODA, L.; DANG, C.V. and Semenza, G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, v.129, p.111-122, 2007.
- GU, J.; MACHUGH, D.E.; MCGIVENY, B.A.; PARK, S.D.E.; KATZ, L.M.; HILL, E.M. Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.569-75, 2010.
- VALBERG, S.J.; MACLEAY, J.M. Skeletal Muscle Function and Metabolism [1998]. Disponível em: <<http://www.ker.com/library/advances/121.pdf>> acesso em: 12/04/2013