

## **Caracterização do éxon 4 do gene *DRB3* em equinos localmente adaptados e raças comerciais**

### ***Characterization of exon 4 of the *DRB3* gene in locally adapted and commercial horse breeds***

Carolina Amorim Silva <sup>(1)</sup> Ingrid  
Pereira Pinto Oliveira <sup>(2)</sup> Silel  
Vinicius Simões Andrade Maciel <sup>(3)</sup>  
Beatriz Bastos Senes <sup>(4)</sup> Jackeline  
Santos Alves <sup>(5)</sup> Lucas Conrado  
Carneiro de Farias <sup>(6)</sup> Gregório  
Miguel Ferreira de Camargo <sup>(7)</sup>

#### **Resumo**

Raças equinas nativas submetidas à seleção natural, como o Pantaneiro, Baixadeiro e Lavradeiro, mostram-se mais resistentes a infecções e infestações do que raças comerciais. Como exemplo, animais da raça Pantaneira podem apresentar infecção por Anemia Infecciosa Equina sem manifestação clínica da doença. Essa característica sofre influência de componentes genéticos como a classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Esta é composta por diversos genes abrigando alelos funcionais e não-funcionais, como o *DRB3*, e possui grande associação com a resposta imunológica. Assim, este trabalho objetivou caracterizar polimorfismos no éxon 4 do gene *DRB3* que possam estar relacionados a maior resistência de equinos. Foram coletadas amostras de pelo de animais das raças adaptadas (Lavradeiro, Baixadeiro, Pantaneiro, Marajoara e Puruca) e comerciais (Quarto de Milha e Árabe) para extração, esta foi realizada com o kit de DNA NucleoSpin® Tissue. A quantificação do DNA foi feita no NanoDrop™ e em seguida foram utilizados primers para amplificação da região de interesse. Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e purificados com PEG a 20%, quantificados e sequenciados. A análise das sequências apresentou 26 SNP's sendo 17 mutações missense e 9 silenciosas. Além disso, observou-se que as raças localmente adaptadas apresentaram frequências alélicas distintas das observadas nas raças comerciais. Essas diferenças sugerem que a seleção natural pode ter influenciado a composição genética dessa região. Dessa forma, os polimorfismos identificados constituem potenciais marcadores candidatos para estudos de associação com características de resistência a enfermidades em equinos.

**Palavras-chave:** Ecótipos; *Equus caballus*; Raças nativas; Resistência.

#### ***Abstract***

*Native horse breeds subjected to natural selection, such as Pantaneiro, Baixadeiro, and Lavradeiro, have shown greater resistance to infections and infestations than commercial breeds. As an example, Pantaneiro horses may be infected with Equine Infectious Anemia without exhibiting clinical signs of the disease. This trait is influenced by genetic components, including class II genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC). This class comprises several genes harboring both functional and non-functional alleles, such as *DRB3*, and is strongly associated with immune response. Therefore, this study aimed to characterize polymorphisms in exon 4 of the *DRB3* gene that may be associated with increased disease resistance in horses. Hair samples were collected from locally adapted breeds (Lavradeiro, Baixadeiro, Pantaneiro, Marajoara, and Puruca) and commercial breeds (Quarter Horse and Arabian) for DNA extraction, which was performed using the*

*NucleoSpin® Tissue DNA kit. DNA concentration was measured using a NanoDrop™ spectrophotometer, and primers were subsequently used to amplify the target region. PCR products were subjected to electrophoresis in 2.5% agarose gel, purified using 20% PEG, quantified, and sequenced. Sequence analysis identified 26 SNPs, including 17 missense and 9 synonymous mutations. Furthermore, locally adapted breeds exhibited allelic frequencies distinct from those observed in commercial breeds. These differences suggest that natural selection may have influenced the genetic composition of this region. Therefore, the identified polymorphisms represent potential candidate markers for future association studies involving disease resistance traits in horses.*

**Keywords:** *Ecotypes; Equus caballus; Native breeds; Resistance.*

---

<sup>1</sup>Graduanda em Zootecia pela UFBA; <sup>2</sup>Doutoranda em Zootecnia pela UFBA; <sup>3</sup>Doutorando em Zootecnia pela UFBA; <sup>4</sup>Doutoranda em Zootecnia pela UFBA; <sup>5</sup>Doutora em Zootecnia pela UFBA; <sup>6</sup>Graduando em Zootecnia pela UFBA; <sup>7</sup>Professor Doutor em Zootecia. Departamento Zootecnia, UFBA.

## 1. Introdução

O processo de seleção natural de raças e ecótipos equinos no Brasil, como o Pantaneiro, Baixadeiro e Lavradeiro, resultaram em uma maior adaptação ao ambiente e maior resistência às doenças infecciosas e parasitárias (Mariante *et al.*, 2006). Um exemplo é a Anemia Infecciosa Equina (AIE), enfermidade endêmica na região do Pantanal, onde a criação de cavalos Pantaneiros é expressiva e na qual são observados animais infectados assintomáticos (Souza *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2011).

A resistência a doenças nos animais possui importante influência genética. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), possui 3 classes e é composto por diversos genes que são responsáveis pela resposta imune do organismo (Viluma *et al.*, 2017). Dentre os genes que compõem esse complexo, o DRB3, que está na classe II, destaca-se por seu elevado polimorfismo e potencial associação com características de resiliência. Estudos com cavalos **Marwari** foi-se identificado diferentes genótipos para o DRB3, reforçando seu potencial como marcador molecular em estudos relacionados à resistência a enfermidades (Sharma *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que determinados alelos dos genes que compõem o MHC estão relacionados à predisposição para algumas enfermidades, entre elas a hipersensibilidade a picadas de insetos (Schurink *et al.*, 2012), os tumores induzidos por papilomavírus (Staiger *et al.*, 2016) e a uveíte recorrente (Fritz *et al.*, 2014).

Assim, partindo da hipótese de que raças submetidas à seleção natural apresentam maior diversidade de variantes associadas à resposta imune quando comparadas a raças comerciais, este trabalho objetiva caracterizar polimorfismos no éxon 4 do gene DRB3,

visando identificar variantes potencialmente relacionadas ao desempenho imunológico e à resistência/resiliência a doenças em raças nacionais de equinos.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Local do estudo e Amostras utilizadas**

O estudo foi realizado no Laboratório Multifuncional da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Foram utilizadas amostras de material biológico (fóliculo piloso) de raças de equinos adaptadas (Lavradeiro, Baixadeiro, Pantaneiro, Marajoara e Puruca) e comerciais (Quarto de Milha e Árabe), sendo 10 animais de cada raça.

### **2.2 Extração, quantificação e PCR**

As extrações de DNA genômico total foram realizadas a partir de amostras de fóliculo piloso utilizando o kit de extração comercial NucleoSpin® Tissue. A qualidade e quantidade das extrações foram avaliadas utilizando NanoDrop™. Para a PCR do éxon 4 do gene *DBR3* utilizou-se o par de primers derivados de Viluma *et al.*, 2017.

### **2.4 Sequenciamento de DNA**

Os amplicons foram verificados em gel de agarose 2,5% em eletroforese (130 minutos em corrente elétrica 120 V) e visualizadas no fotodocumentador. Os produtos de PCR foram purificados com solução de PEG 20% e sequenciados bidirecionalmente utilizando um *Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer*. A edição das sequências foi realizada no BioEdit v7.0.9.0 (Hall, 1999), e os alinhamentos foram gerados utilizando o algoritmo ClustalW (Hall, 1999; Thompson *et al.*, 2002). Com a identificação de polimorfismos, foram calculadas frequências alélicas e genotípicas e comparadas entre grupos adaptados e comerciais.

## **3 Resultados e Discussão**

Com o sequenciamento do éxon 4 do gene *DRB3* e a comparação entre as raças comerciais e adaptadas, foram encontrados 26 SNP's. Destes, 17 deles classificam-se como mutação missense e as 9 restantes eram mutações silenciosas.

A partir das anotações dos SNP's foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas

dessas posições. Além disso, também foi realizada a verificação da troca de aminoácidos.

Com os dados obtidos pode-se inferir uma diferença entre as raças localmente adaptadas e as comerciais. As raças localmente adaptadas apresentam em sua grande maioria uma maior frequência alélica para o par de base oposto ao da sequência base a das raças comerciais. Essa diferença fica mais evidente ao realizar a comparação entre as frequências genotípicas, onde as homozigotas nas raças localmente adaptadas eram opostas as comerciais.

Obtém-se também que as raças localmente adaptadas não apresentavam a ocorrência de alguns genótipos ou tinham a ocorrência muito baixa enquanto que as raças comerciais apresentavam exatamente o contrário.

Dessa forma, percebe-se que animais localmente adaptados tem em sua grande maioria sequências gerando aminoácidos diferentes dos aminoácidos gerados pelas raças comerciais.

Essas diferenças entre as raças equinas localmente adaptadas e as comerciais indicam que essas populações apresentam perfis genéticos distintos para o éxon 4 do gene DRB3. Essas diferenças podem refletir a atuação da seleção natural sobre populações expostas, ao longo do tempo, a diferentes condições ambientais e desafios sanitários.

Ademais, a elevada proporção de mutações missense identificadas (17 dos 26 SNPs) sugere um potencial impacto funcional dessas variantes sobre a proteína DRB3, uma vez que alterações na sequência de aminoácidos podem modificar a capacidade de apresentação de antígenos e, conseqüentemente, influenciar a resposta imunológica. Resultados semelhantes têm sido descritos em outras raças equinas, como a Marwari, na qual também foram identificados polimorfismos no gene DRB3, embora os autores ressaltem a necessidade de estudos de associação para confirmar sua relação com características de resistência (Sharma et al., 2009).

Assim, os polimorfismos identificados neste estudo representam variantes candidatas para futuras investigações envolvendo resistência a enfermidades, podendo futuramente subsidiar programas de seleção assistida e conservação de raças equinas localmente adaptadas.

#### **4 Conclusão**

A análise do éxon 4 do gene DRB3 revelou elevadas variações nas frequências alélicas e genotípicas entre raças adaptadas e comerciais, com a identificação de 26 SNPs, dos quais 17 resultaram em substituições de aminoácidos. Essas diferenças sugerem que a seleção natural pode ter influenciado a composição genética dessa região. Dessa forma, os polimorfismos identificados constituem potenciais marcadores candidatos para estudos futuros de associação

com características de resistência a enfermidades e desempenho imunológico em equinos.

## **5 Referências**

FRITZ, K. L., KAESE, H. J., VALBERG, S. J., HENDRICKSON, J. A., RENDAHL, A. K., BELLONE, R. R., DYNES, K. M., WAGNER, M. L., LUCIO, M. A., CUOMO, F. M., BRINKMEYER-LANGFORD, C.L., SKOW, L. C., MICKELSON, J. R., RUTHERFORD, M. S., MCCUE, M. E. Genetic risk factors for insidious equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. *Anim Genet.* 2014 Jun;45(3):392-9. doi: 10.1111/age.12129. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24467435.

MARIANTE, A.S., CAVALCANTE, N. *Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil.* Brasília: Embrapa Sede / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274p.

SOUZA, G.S., GOMES, E. G., SANTOS, S. A., REZENDE, A. S. C., ANDRADE, D. R. F., NOGUEIRA, M. F., TRIGO, P., ABREU, U. P. P. Factors affecting the performance of Pantaneiro horses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2018.

SCHURINK, A., WOLC, A., DUCRO, B. J., FRANKENA, K., GARRICK, D. J., DEKKERS, J. C., VAN ARENDONK, J. A. Genome-wide association study of insect bite hypersensitivity in two horse populations in the Netherlands. *Genet Sel Evol.* 2012 Oct 30;44(1):31. doi: 10.1186/1297-9686-44-31. PMID: 23110538; PMCID: PMC3524047.

OLIVEIRA, A. L. C., MONTEZUMA, E. S., RAVAGLIA, E., JULIANO, R. S., NOGUEIRA, M. F. Avaliação da prevenção e controle da anemia infecciosa equina no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 5p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 98).

STAIGER, E. A., TSENG, C. T., MILLER, D., CASSANO, J. M., NASIR, L., GARRICK, D., BROOKS, S. A., ANTCZAK, D. F. Host genetic influence on papillomavirus-induced tumors in the horse. *Int J Cancer.* 2016 Aug 15;139(4):784-92. doi: 10.1002/ijc.30120. Epub 2016 May 6. PMID: 27037728.

Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999. 41, pp. 95–98.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2002. 2.3.1–2.3.22. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00.

VIJUMA, A., MIKKO, S., HAHN, D., SKOW, L., ANDERSSON, G., BERGSTRÖM, T. F. Genomic structure of the horse major histocompatibility complex class II region resolved using PacBio long-read sequencing technology. *Sci Rep.* 2017 Mar 31;7:45518. doi: 10.1038/srep45518. PMID: 28361880; PMCID: PMC5374520.

SHARMA, R. C., et al. PCR-RFLP profile of MHC-DRB 3 class II genes in Marwari horses. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 79, p. 1036-1037, 2009.