

**ANA ELYSA TRAVASSOS OLIVEIRA**

**GENOTIPAGEM DA IMUNOGLOBULINA G, EM ÉGUAS DAS RAÇAS  
CAMPOLINA E MANGALARGA MARCHADOR, NA ZONA DA MATA  
DE PERNAMBUCO**

**RECIFE**

**AGOSTO / 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ANA ELYSA TRAVASSOS OLIVEIRA**

**GENOTIPAGEM DA IMUNOGLOBULINA G, EM ÉGUAS DAS RAÇAS  
CAMPOLINA E MANGALARGA MARCHADOR, NA ZONA DA MATA  
DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurea Wischral

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

**RECIFE**

**AGOSTO / 2010**

## Ficha Catalográfica

O48p Oliveira, Ana Elysa Travassos  
Genotipagem da imunoglobulina G, em éguas das raças  
campolina e mangalarga marchador, na Zona da Mata de  
Pernambuco / Ana Elysa Travassos Oliveira. – 2010.  
43f.:il.

orientadora: Aurea Wischral.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)  
– Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
Medicina Veterinária, Recife, 2010.

Referências.

1. Eqüinos 2. Reprodução Animal 3. Biologia molecular  
4. PCR-RFLP I.Wischral, Aurea, Orientadora II. Título

CDD 636.08926

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**GENOTIPAGEM DA IMUNOGLOBULINA G, EM ÉGUAS DAS RAÇAS  
CAMPOLINA E MANGALARGA MARCHADOR, NA ZONA DA MATA  
DE PERNAMBUCO**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**ANA ELYSA TRAVASSOS OLIVEIRA**

Aprovada em 31 / 08 / 2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. AUREA WISCHRAL

Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária (UFRPE)

---

Prof. Dr. MANOEL ADRIÃO G. FILHO

Co-orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. DANIELA M. B. DE SOUZA

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE)

---

Dr<sup>ª</sup>. ZORAIDE FERNANDES COLETO

Pesquisadora

À minha mãe, Jussara Travassos, por ser fonte constante de amor e apoio, nos momentos mais difíceis e conflitantes da minha vida.

Dedico.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, energia maior, Pai de todas as coisas, por me proteger, abençoar e permitir que eu ultrapassasse todos os obstáculos para chegar até aqui.

À minha mãe, Jussara, por todos os momentos de apoio, dedicação, estímulo, confiança e abdicação dedicados a mim.

A minha família, pela presença, apoio e admiração ao meu esforço na busca constante ao conhecimento com o objetivo de me tornar uma pessoa melhor.

À Professora Doutora Aurea Wischral por ser essa pessoa maravilhosa. Por toda tranquilidade, compreensão, pela oportunidade e por acreditar, mais uma vez, na minha capacidade de conclusão deste projeto. O meu eterno e sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Manoel Adrião pela disponibilidade, compreensão e oportunidade.

Ao Sr. Bartolomeu Medeiros, Haras Monte Real; Sr. Adilson Cordeiro, Haras em Glória do Goitá; Sr. Geraldo Uchoa, Haras Gever; Dr. Fernando Brasileiro, Fazenda Uberaba; pela gentileza em permitir que o material para o meu trabalho fosse coletado em suas propriedades. Muito obrigada!!

À José Arthur Filho por toda ajuda e estímulo durante todo o período deste trabalho.

À colega Doutora Laura Rocha, que apesar de toda ocupação, disponibilizou parte do seu tempo para auxiliar na estatística deste trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada, principalmente Dr<sup>a</sup>. Daniela Bastos pela paciência, apoio e conselhos; Diogo Farias pela gentileza sempre e ajuda nos momentos mais complicados; Igor Santos, do Laboratório Genoma, pela ajuda e disponibilidade, apesar das coisas não terem saído como planejado.

Aos meus amigos MC's, Kercya Brayner, Suzana Nunes, Gustavo Silva, Luiz Augusto Valença, pelo estímulo, pela torcida e ajuda nos momentos de correria, principalmente no LA.

Ao meu amigo Solano pelo apoio e pelas conversas sempre construtivas. A minha amiga Claudia pela força de sempre, inclusive no Coffee Break com aquela torta Alemã

MARAVILHOSA! A minha amiga Charissa, pela enorme força, principalmente no trabalho, tentando compensar as minhas várias ausências mesmo de corpo presente e pelos momentos de descontração. Serei eternamente grata a vocês!

As minhas amigas Kalina e Cândida, pelo apoio nos momentos difíceis e ajuda com a tradução de artigos.

A minhas tias queridas Sá e Léri, por torcerem, vibrarem e sempre contribuírem com algo bom para minha evolução, espiritual e como pessoa.

À Tia Dayse e Jorge, por sempre estarem presentes torcendo pela minha vitória plena.

Aos colegas da SUPRANOR, pela compreensão nos momentos em que precisei de parte do tempo, para escrever esta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco que me acolheu na graduação e agora na pós, pela oportunidade.

*Os mestres abrem a porta, mas deves entrar por tí próprio.*

*(Provérbio Chinês)*



## RESUMO

---

Os objetivos fundamentais da imunologia são descrever a organização do sistema imune, as relações entre seus componentes e delinear os limites (interfaces e interseções) entre o sistema imune e o organismo. A placenta eqüina não permite a passagem das imunoglobulinas, portanto, o potro neonato possui uma baixa resistência a enfermidades, e depende da mamada do colostro, nas primeiras horas de vida, para que a proteção seja conferida. Diante disto, este estudo foi realizado com o objetivo de identificar diferenças genéticas na imunoglobulina G (IgG) de éguas das raças Campolina e Mangalarga Marchador, que possam, futuramente, ser relacionadas com produção de IgG e usadas em programas de seleção de animais. Foram coletadas 40 amostras de sangue de animais, sendo 20 de cada raça, provenientes de propriedades localizadas na Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco. Amplificou-se um fragmento conhecido do gene IGHG4, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e o produto da amplificação foi submetido à digestão enzimática (PCR – RFLP), utilizando-se endonucleases *AvaII*; *PmlI*; *TaqI* e *PvuII* e, posteriormente, o resultado foi avaliado em gel de agarose a 1,5%. Com a utilização da endonuclease *AvaII* foi possível identificar três alelos diferentes: A (232pb), B (140 + 92 pb) e C (200 + 32 pb). Observou-se uma maior frequência do alelo A em relação aos alelos B e C em todos os animais estudados. O alelo B foi encontrado em maior proporção quando comparado ao alelo C na raça Campolina e em menor proporção na raça Mangalarga. Foi observada uma predominância do genótipo AA nas duas raças analisadas, no entanto, houve uma alta frequência de indivíduos heterozigotos. A análise das frequências demonstrou que as populações se encontram em equilíbrio de Hardy Weinberg. Conclui-se que o polimorfismo do gene IGHG4 está presente em éguas de uma mesma raça e também entre as raças Mangalarga e Campolina, devendo-se investigar se este fato está relacionado com diferentes capacidades de responder ao estímulo imunológico.

**Palavras chave:** Equinos; Reprodução Animal; Biologia Molecular; PCR-RFLP

# IMMUNOGLOBULIN G GENOTYPING IN MANGALARGA MARCHADOR AND CAMPOLINA MARES IN THE NORTHERN COASTAL ZONE OF THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.

## ABSTRACT

---

The fundamental objectives of immunology are to describe the organization of the immune system and the relationships between its components as well as outline the boundaries (interfaces and intersections) between the immune system and body. As the equine placenta does not allow the passage of immunoglobulin, the newborn foal has low resistance to disease and depends on the ingestion of colostrum in the first hours of life in order to gain this protection. The aim of the present study was to identify genetic differences in immunoglobulin G (IgG) in mares of the Campolina and Mangalarga Marchador breeds for the future determination of differences in IgG production and use this information in animal selection programs. Blood samples were collected from 40 animals (20 of each breed) from properties in the coastal zone of the state of Pernambuco, Brazil. The known fragment of the IGHG4 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The product was digested by the endonuclease enzymes *AvaI*, *PmlI*, *PvuII* and *TaqI* (PCR-RFLP) and the result was evaluated in 1.5% agarose gel. The endonuclease *AvaI* digested the fragment, leading to the identification of three different alleles: A (232 pb), B (140 + 92 bp) and C (200 + 32 bp). There was a higher frequency of allele A than alleles B and C in all animals studied. Allele B was found at a higher proportion than allele C in the Campolina breed, but at a lesser proportion in the Mangalarga breed. There was a prevalence of the AA genotype in both breeds studied. However, there was a high frequency of heterozygous individuals. The analysis of frequencies revealed that the populations are in Hardy-Weinberg equilibrium. In conclusion, polymorphism in the IGHG4 gene was found in mares of the same breed as well as between the breeds studied (Mangalarga and Campolina). Studies are needed to investigate whether this is related to different capacities of responding to immune stimulation.

**Keywords:** Equine; Animal Reproduction; Molecular Biology; PCR-RFLP

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Frequências alélica e genotípica, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e o equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) do loco do IGHG4, nas raças Campolina e Mangalarga Marchador da Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco – Brasil. ....	36

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estrutura espacial da Imunoglobulina G.....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema de transferência de imunidade para a cria .....	21
<b>Figura 3.</b> Transferência de imunidade passiva nas diferentes espécies .....	22
<b>Figura 4.</b> Reação em cadeia da polimerase realizada em termociclador .....	32
<b>Figura 5.</b> Gel de agarose a 1,5%, no transluminador.....	33
<b>Figura 6.</b> Fragmento de DNA amplificado (232 pb), contendo a região do gene IGHG4 da imunoglobulina G equina, em éguas das raças Campolina (CL) e Mangalarga Marchador (MG). M: Marcador DNA-Ladder 50 bp.....	34
<b>Figura 7.</b> Padrão eletroforético obtido por digestão com endonuclease <i>AvaII</i> da região do DNA que contém o gene IGHG4 em éguas da raça Campolina (CL). M: Marcador DNA-Ladder 50 pb.....	35

## SUMÁRIO

---

	Pág.
1 Introdução.....	15
2 Revisão de Literatura .....	17
2.1 Raça .....	17
2.1.1 A raça Campolina .....	17
2.1.2 A raça Mangalarga Marchador .....	18
2.2 Imunologia .....	19
2.3 Produção e absorção das imunoglobulinas pelo neonato .....	20
2.3.1 Placenta.....	20
2.3.2 Colostro.....	21
2.4 Transferência de imunidade passiva.....	23
2.5 Concentração de imunoglobulina G: métodos para avaliação.....	23
2.6 Gene IGHG4.....	23
2.7 Biologia Molecular e suas ferramentas .....	26
2.7.1 Extração de DNA .....	27
2.7.2 PCR – Reação em cadeia da polimerase .....	27
2.7.3 PCR – RFLP (Reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição).....	29
3 Material e Métodos .....	31
3.1 Extração de DNA genômico.....	31
3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	31
3.3 Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) .....	33
3.4 Análise de dados.....	33

4	Resultados e Discussão.....	34
5	Conclusão.....	38
	Referências.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

---

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas classificadas em cinco grupos: IgA, IgD, IgE, IgM e aquela de interesse neste experimento, a IgG.

As moléculas de IgG são compostas de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas de polipeptídeo e apresentam dois sítios de ligação para antígenos específicos (LEFRANC, 2003). Existem quatro subclasses (em humanos): IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cada uma correspondendo a 70, 16, 10 e 4% do teor total de IgG, respectivamente, diferenciando-se ainda, pela quantidade de pontes SS (dissulfídricas). Em humanos, tem a capacidade de atravessar a placenta. Pois, de acordo com Hafez (2004), a passagem transplacentária depende do tipo de placenta, que no equino é epiteliocorial, impermeável as IgGs (PRESTES e ALVARENGA, 2006).

Entretanto, o neonato equino é extremamente susceptível a infecções imediatamente após o nascimento, necessitando que lhe seja fornecido imunoglobulinas (Igs) exógenas através do colostro materno para suprir a necessidade na Falha de Transferência de Imunidade Passiva (FTIP), pois as Igs da circulação da fêmea só atingem as glândulas mamárias na última quinzena de gestação. As imunoglobulinas podem também ser fornecidas através da utilização de plasma, que requer grande quantidade, por via oral, administrando-se imunoglobulina purificada (Lyphomune®) ou por via intravenosa, com resultados satisfatórios (LOPES, 1999).

Primariamente, os estudos dos anticorpos baseavam-se na motilidade eletroforética das moléculas. Entretanto, como o perfil da eletroforese apresentava resultados distintos, buscou-se novas formas para o estudo destas moléculas baseadas nos princípios da imunologia molecular (HERBERT, 1972; LEFRANC, 2003).

A biologia molecular, através da utilização de inúmeras técnicas e o desenvolvimento de novas tecnologias permite avaliar moléculas, sua diversidade, tamanho, constituição e interação nos processos biológicos como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) aliada ao estudo do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

O estudo do perfil genético da IgG, particularmente o gene IGHG4, poderá determinar a fêmea que seria mais efetiva na transmissão de imunidade passiva ao recém – nascido.

Desta forma, o objetivo neste estudo foi avaliar a IgG em éguas das raças Campolina e Mangalarga Marchador através da genotipagem do gene IGHG4, utilizando a técnica de PCR-RFLP.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Raça

A distribuição dos equídeos por raça até hoje é um assunto ainda muito discutido. Algumas se formaram a partir de uma imensa seleção natural, já outras foram selecionadas por suas características próprias, como velocidade, andamento típico, pelagem ou tamanho (COSTA et al., 2001).

A raça, geralmente, determina qual a atividade ou atividades que aquele cavalo poderá realizar e as suas habilidades inatas, por isto confundem-se muito o conceito de tipo com os de raça (COSTA et al., 2001). Segundo Torres (1990), raça é o conjunto de indivíduos da mesma espécie que apresentam a mesma especialização funcional.

#### 2.1.1 A raça Campolina

Originada em Entre Rios de Minas, MG, a raça Campolina possui como marco inicial o nascimento, em 1870, de um potro, filho de garanhão da raça Andaluz. Do acasalamento desse animal com éguas naturalizadas, descendentes de animais ibéricos das raças Andaluz, Bérbere e Sorraia, trazidos pelos colonizadores, e ainda, à posterior utilização de garanhões das raças Anglo-Normanda, Clydesdale, Holsteiner, American Saddle Horse e Mangalarga, originou-se a base de formação da raça. A partir de Entre Rios, desenvolveram-se novos núcleos de criação da raça, destacando-se os das cidades mineiras de Passa Tempo, Barbacena, Oliveira e Jequitinhonha, além de núcleos nos estados da Bahia e Pernambuco (FONTES, 1957).

A raça Campolina está representada em 22 estados do Brasil, com maior concentração na região Sudeste. Minas Gerais, com 41.493 animais (62,4%), detém o maior efetivo, seguido pelo Rio de Janeiro, com 12.822 (19,3%), Bahia, com 4.935 (7,4%) e São Paulo, com 2.575 (3,9%) animais. A população somada desses estados corresponde a 93% do efetivo nacional. Outros núcleos de criação estão nos estados de Goiás, que somados aos do Distrito Federal totalizam 1.529 (2,3%) animais, e Pernambuco, com 1.136 animais (1,7%) (PROCÓPIO et al., 2003).

Segundo COSTA et al. (2001) a raça é originária dos cruzamentos de animais trazidos por D. João VI. Os animais importados pelo Rei eram das raças Alter e Andaluz, e fundaram a Coudelaria Real em Minas Gerais. Nesta região, o criador Cassiano Campolina, adquiriu reprodutores da Coudelaria e os cruzou com suas éguas. Ainda houve, posteriormente, a

introdução de animais das raças Puro Sangue Inglês, Percheron, American Saddle Horse, Orloff e Oldenburgês.

São animais de grande sobriedade, resistência e de andamento característico, a marcha, deve ser avante, batida ou picada. Há preferências pelas pelagens baia e castanha e suas variedades. A altura pode variar dos 1,48m até 1,70m. São animais de perfil retilíneo a subconvexo, orelhas tamanho médio, pescoço forte e rodado no bordo superior, peito amplo, dorso e lombo médios, garupa levemente inclinada com saída de cauda não muito alta. São ideais para passeios, enduro, tração ligeira e lida com o gado bovino (COSTA et al., 2001).

### **2.1.2 A raça Mangalarga Marchador**

As raças de eqüinos nacionais tiveram origem a partir das necessidades próprias das regiões do país, ou pela preferência de grupos de criadores amantes do cavalo. Assim, ocorreu a formação da raça Mangalarga Marchador que teve origem no Sul de Minas Gerais, como resultado do acasalamento de éguas crioulas com garanhões vindos da Coudelaria de Álder do Chão, no Alentejo, Portugal (ROCHA, 1999).

No final dos anos 60 houve aumento progressivo do número de nascimentos, ultrapassando 1.000 por ano, em 1974, e atingindo o máximo em 1990 (16.803 ou 6,7% do total). A partir de 1991, houve sensível redução no número de registros. A raça Mangalarga Marchador distribuiu-se em todo território nacional, exceto Roraima e Amapá. Por ser o berço da raça, Minas Gerais concentrou 39,1% do contingente nacional, representando 12,2% do rebanho eqüino do Estado. Os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia detêm 80,0% de todos os animais registrados. Apesar do grande número de criadores e proprietários, a maioria deles é detentora de pequenos plantéis (COSTA et al., 2004).

Segundo Costa et al. (2001) a raça é formada a partir do descontentamento dos mineiros com os padrões estabelecidos pelos paulistas, principalmente no andamento. A raça também recebeu influência de animais das raças Árabe e Inglês.

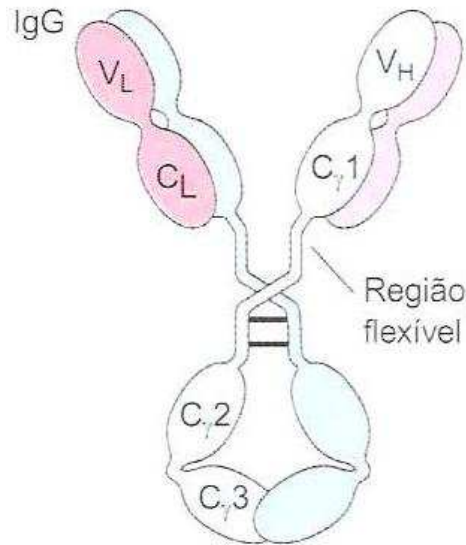
Apresentam-se rústicos, resistentes, dóceis e próprios para longas cavalgadas. A altura varia de 1,42m até 1,55m, e pesam de 370 até 450 Kg quando adultos. Todas as pelagens são aceitas, mas predomina a preferência pelos tordilhos. A cabeça tem perfil retilíneo ou subcôncavo, orelhas médias, pescoço piramidal forte e ligeiramente arredondado na linha superior, cernelha bem definida, peito amplo, dorso e lombo curtos, garupa horizontal, membros fortes. Os andamentos são a marcha picada ou batida. São ideais para passeios, cavalgadas, enduro, esportes e lida com o gado (COSTA et al., 2001).

## 2.2 Imunologia

A atividade imunológica surge quando linfócitos detectam a invasão do corpo por materiais (imunogênicos) que não lhe pertencem. Em consequência desse caráter “cognitivo” atribuído ao sistema imune, são frequentes as analogias traçadas entre o sistema imune e o sistema nervoso, o sistema cognitivo por excelência. Os objetivos fundamentais da imunologia são descrever a organização do sistema imune, ou seja, o conjunto de relações entre componentes do sistema imune, ou seja, do conjunto de relações entre componentes que o sistema mantém invariante e descrever os limites (interfaces e interseções) entre o sistema imune e o organismo (LANG et al., 2007)

Os equinos são animais cuja resistência (defesa contra enfermidades) no início da vida está na dependência da ingestão do colostro após o nascimento (UNANIAN et al., 1994).

Segundo Lang (2006), o alto risco de infecções em mamíferos neonatos é descrito e reconhecido em todas as espécies. Em equinos, o tipo de placenta funciona como uma barreira à passagem de anticorpos para os fetos durante a gestação, e a transferência de imunidade passiva é dependente da ingestão e absorção do colostro. O fato de neonatos eqüinos, com falha na transferência de imunidade passiva (FTP) ou falha parcial na transferência de imunidade passiva (FPTP), apresentarem maior morbidade e mortalidade por doenças infecciosas como diarreia, pneumonia, artrite e septicemia, torna a adoção de métodos para determinação do estado imunológico importante para maior retorno dos investimentos realizados na criação da espécie. O parâmetro mais utilizado para a verificação deste estado imunológico é a concentração da imunoglobulina G (IgG) (Figura 1) no soro do neonato. Entretanto, é preciso que os testes utilizados apresentem resultados em pouco tempo, sejam de fácil realização, confiáveis, e de baixo custo para sua aplicação em situações práticas.



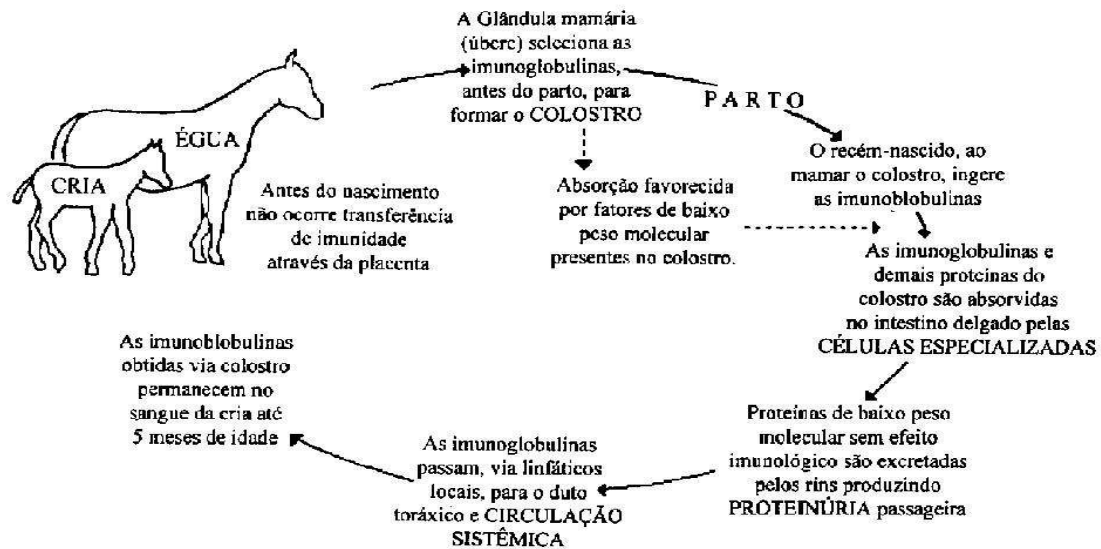
**Figura 1.** Estrutura espacial da Imunoglobulina G.

O período neonatal compreende fases importantes do desenvolvimento do sistema orgânico animal, no qual ocorrem profundas alterações fisiológicas, como a adaptação ao ambiente externo e o crescimento muito rápido; por outro lado, a adaptação bioquímica e metabólica nesses animais é lenta. Constituintes hematológicos e bioquímicos variam significativamente nos fluidos orgânicos dos animais desde o nascimento até atingirem idade madura, principalmente ao longo do período neonatal. Ao nascimento, a concentração das proteínas plasmáticas é pequena, na maioria das espécies animais, aumentando após a ingestão do colostro, devido à absorção de imunoglobulinas. A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado, como a albumina, a alfa e a beta globulinas. A fração gamaglobulina, que inclui as imunoglobulinas, é secretada pelo sistema imune (HOWARD et al., 2008).

## 2.3 Produção e absorção de imunoglobulinas pelo neonato

### 2.3.1 Placenta

A placenta do tipo epiteliocorial difusa da égua apresenta seis camadas teciduais entre a circulação sanguínea materna e fetal, compreendendo o endotélio capilar materno, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico, tecido conjuntivo fetal e endotélio capilar fetal, que promovem uma barreira para transferência transplacentária de anticorpos. Por esta razão os potros nascem hipo ou agamaglobulinêmicos (LANG, 2006)



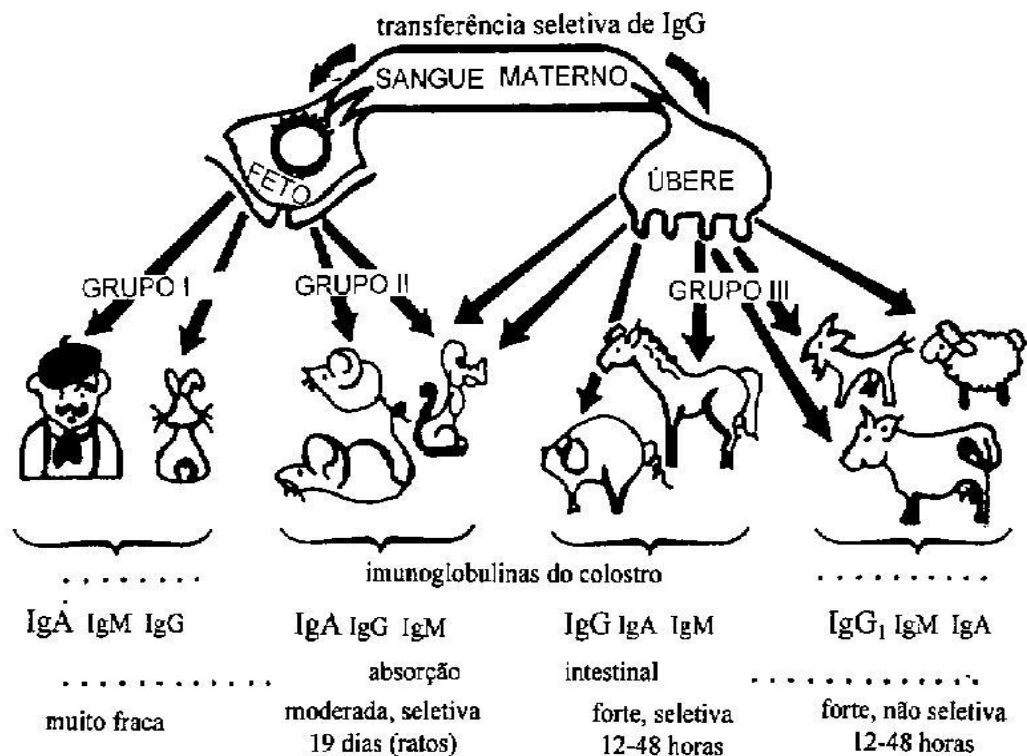
**Figura 2.** Esquema de transferência da imunidade para a cria (adaptada de Jeffcott, 1974).

### 2.3.2 Colostro

Scotoni e Neto (1991) relataram que a secreção de colostro é de curta duração e cai a níveis insignificantes em 24 horas após o parto. O potro geralmente mama o colostro durante as 2 ou 3 primeiras horas de vida e, em 6 horas, a IgG já pode ser encontrada no soro. O pico de IgG é atingido em 18 horas após o nascimento, quando a concentração sérica é semelhante à do soro materno. Os anticorpos passivos declinam gradualmente até estarem completamente ausentes aos cinco meses. Bem antes disso o potro já mostra sinais de estar apto a se proteger; Ig (G + M + A + E) endógena é encontrada pela primeira vez com duas semanas de idade, embora o nível que os animais adultos apresentam não seja atingido, no filhote, antes que o mesmo complete cinco meses.

Segundo Unanian et al.(1994), o colostro é o “primeiro leite” (primeira secreção), que se forma na glândula mamária (úbere). Após o parto, à medida que progride a lactação, o colostro é substituído pelo leite propriamente dito. O colostro pode aparecer tanto alguns dias quanto algumas horas antes do parto; ocorre só uma vez e a sua “saída” do úbere antes do parto pode reduzir a quantidade de imunoglobulinas necessárias ao recém nascido. Seus mais importantes componentes são as imunoglobulinas ou anticorpos, cujo principal papel está na proteção contra doenças que podem ser provocadas por bactérias ou vírus, que penetram na circulação logo após o nascimento, proliferando rapidamente, uma vez que na fase de feto (fase intrauterina) o equino não recebe proteção (imunoglobulinas) através da placenta.

Lang (2006) cita que as imunoglobulinas ativam a cascata de complemento pela via clássica, e se aderem à superfície de antígenos para fagocitose por macrófagos, granulócitos, linfócitos ou células “Natural Killers”. Os anticorpos presentes no colostro são absorvidos, pelo processo de pinocitose, por células epiteliais do intestino delgado, principalmente no jejuno e íleo, que são substituídas em até 36 horas. Estas macromoléculas são carregadas para o tecido linfóide local, sendo posteriormente drenadas para a circulação sistêmica via ducto torácico, garantindo imunidade inata. Dois fatores importantes que determinam a quantidade de IgG absorvida são o tempo entre o parto e a primeira ingestão do colostro e a concentração dessa Ig no mesmo.



**Figura 3.** Transferência de imunidade passiva nas diferentes espécies (adaptada de LEVIEUX, 1980).

## **2.4 Transferência de imunidade passiva**

A concentração mínima de IgG, necessária para proteção do potro contra infecções, depende de fatores inerentes aos patógenos presentes no meio ambiente, fatores relacionados ao manejo e ao estresse. A incidência de falha na transferência de imunidade passiva tem sido estimada em 2,9 a 25%, sendo dependente do desafio ao qual o neonato está exposto (McGUIRE et al., 1977).

Segundo Tizard (2002), os níveis séricos de imunoglobulinas em equinos adultos hípidos variam de 500 a 2.000 mg/dL de IgG.

Quando ocorre falha total na transferência de imunidade passiva, a concentração sérica de IgG é inferior a 200 mg/dL, já quando a falha é parcial, os valores podem variar entre 200 a 400 mg/dL, sendo considerado aceitável, acima de 800 mg/dL. As causas mais comuns de falha na transferência de imunidade passiva são deficiência na produção de colostro, lactação prematura, atraso na ingestão de colostro, estresse e má absorção intestinal, prematuridade e indução do parto (LANG, 2006).

## **2.5 Concentração de imunoglobulina G: Métodos para avaliação**

Um colostro de boa qualidade, ou seja, com altas concentrações de imunoglobulinas tem alta viscosidade e coloração mais amarelada e escura que o leite. Porém estes critérios subjetivos podem induzir a erros durante a avaliação da qualidade do colostro, sendo indicado o exame de gravidade específica ou o uso de técnicas diretas como imunodifusão radial ou métodos imunoenzimáticos como o ELISA. Além da concentração de IgG no colostro é importante determinar a concentração de IgG no soro sanguíneo. Os métodos disponíveis para avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas podem ser indiretos (refratometria, turbidez pelo sulfato de zinco, coagulação por glutaraldeído, aglutinação no látex) ou diretos (eletroforese, imunodifusão radial simples, ELISA, PCR-RFLP) (LANG, 2006).

## **2.6 Gene IGHG4**

As imunoglobulinas apresentam em sua estrutura quatro cadeias peptídicas, sendo duas com 60 kDa, chamadas de cadeias pesadas e duas com 25 kDa, chamadas de cadeias

leves. As cadeias leves são unidas às pesadas, na região N terminal da cadeia, por ligações dissulfídicas, ficando a molécula com uma forma semelhante à letra Y. A cadeia pesada das imunoglobulinas tem uma porção altamente variável ( $V_H$ ), que está no domínio terminal N e o restante da cadeia é constante ( $C_H$ ). Cada tipo de cadeia pesada caracteriza a imunoglobulina, a IgG possui cadeia pesada do tipo  $\gamma$  (TIZARD, 2002).

A cadeia pesada da IgG apresenta três domínios constantes, denominados  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ , presentes em cada lado da cadeia de forma pareada. Os domínios variáveis das cadeias leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) servem para fazer a ligação com os antígenos, já os domínios constantes da cadeia leve ( $C_L$ ) e o  $C_{H1}$  estabilizam a ligação antigênica. Os domínios  $C_{H2}$  pareados ativam a cascata do Complemento e contém um sítio de ligação ao Fc nas células fagocíticas. A cadeia pesada também é responsável por regular o transporte placentário de IgG (TIZARD, 2002).

As imunoglobulinas da classe G (IgG) exercem inúmeras funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a ligação dos domínios Fc (Fragmento Cristalizável) da IgG com receptores específicos ( $Fc\gamma R$ : *Fc gamma receptors*) presentes nas membranas de células do sistema imune. Assim, os  $Fc\gamma R$  são importantes mediadores da ligação entre as respostas imune humoral e celular (MARZOCCHI-MACHADO et al, 2005).

As interações da IgG com os  $Fc\gamma R$  podem ocorrer sob duas condições principais: o  $Fc\gamma R$  de alta afinidade pode ligar-se à IgG monomérica antes que esta tenha se ligado ao antígeno, enquanto que os  $Fc\gamma R$  de baixa afinidade ligam-se à IgG previamente complexada ao antígeno multivalente, ou seja, na forma de imunocomplexos (IC). A ligação da IgG aos  $Fc\gamma R$  estimula uma variedade de respostas biológicas, dependendo do tipo celular, do tipo de receptor  $Fc\gamma$  e da natureza do complexo de IgG. Estas respostas incluem processos diretamente relacionados com a eliminação de antígenos tais como: fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC: *antibody – dependent cell – mediated cytotoxicity*), geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais, *clearance* de IC e regulação da produção de anticorpos. Esta diversidade funcional dos  $Fc\gamma R$  também é atribuída ao polimorfismo genético, que introduz variações entre os indivíduos, bem como à geração de formas solúveis de  $Fc\gamma R$  e ao sinergismo com outros receptores (MARZOCCHI-MACHADO et al, 2005).



Os Fc $\gamma$ R também participam da imunorregulação na patogênese de reações alérgicas, auto-imunes e inflamatórias. Desta forma, há um grande interesse científico e clínico no estudo da diversidade das respostas geradas pela interação IgG – receptores, na expectativa de descobertas importantes sobre a suscetibilidade às doenças, a fisiopatologia das mesmas e a intervenção terapêutica. Exemplo disto é a importância terapêutica do conhecimento sobre os Fc $\gamma$ R para a identificação de variantes polimórficas favoráveis ao desenvolvimento de doenças auto-imunes; o uso de formas solúveis destes receptores para bloquear a ativação dos Fc $\gamma$ R na membrana de células efectoras; o uso de gamaglobulina intravenosa para o tratamento de várias doenças imunes, bem como a inibição seletiva da ativação celular (MARZOCCHI-MACHADO et al, 2005).

A possibilidade de inibir os efeitos fisiopatológicos da ativação celular mediada pelos Fc $\gamma$ R está sendo considerada como uma nova estratégia para o tratamento de doenças relacionadas com a imunoglobulina da classe G (MARZOCCHI-MACHADO et al, 2005).

Estas interações da proteína mediando a resposta imune, dependem de uma região constante da cadeia pesada da IgG, chamada de IgHC, que apresenta vários subtipos (WAGNER et al., 2002).

Os genes que determinam estes subtipos já foram estudados em diferentes espécies (OVERESCH et al., 1998). O cavalo tem o maior número de genes de IgG do que qualquer outra espécie de mamífero já analisada e todas as sete subclasses codificadas de IgG parecem ser expressas *in vivo* (NICHOLAS, 1999). Os primeiros estudos descreveram cinco subclasses de IgG equina nomeadas como IgGa, IgGb, IgGc, IgG (T) e IgG (B). Após a identificação da IgG7 as subclasses de IgG foram renomeadas para IgG1 a IgG7. Destas subclasses IgGa corresponde a IgG1, IgGb a IgG4 e IgG7, IgGc a IgG6 e IgG(T) a IgG3 e IgG5. A IgG é a classe de anticorpo predominante no colostro e soro equino e está presente na superfície das mucosas como trato urinário e trato respiratório, onde é o isótipo mais abundante (DAVIS et al., 2005)

Dentre as subclasses de IgG, as IgG 1 a 4 são as que possuem as sequências de aminoácidos mais conservadas, mas diferem nas suas habilidades na ativação do sistema complemento, durante a resposta imune (KABAT et al. 1991). Também as alterações no resíduo N-terminal da proteína, são críticas para a atividade imunológica. Na IgG2, Sensel et

al. (1997) demonstraram que mudanças nos aminoácidos desta região provocaram diferentes atividades da proteína.

No soro equino, a IgGb (IgG4 e IgG7) é encontrada em maior proporção que as demais subclasses. As respostas sistêmicas dos anticorpos IgG nas mucosas são conhecidas por desempenhar um papel importante na proteção contra vários patógenos, incluindo o vírus da gripe equina, *Streptococcus equi*, e pode limitar a severidade e a propagação do herpesvírus equino. O IgG4 e o IgG7 tem sido apontados como os mais importantes anticorpos equinos com resposta imune de proteção mediada contra patógenos intracelulares (LEWIS et al., 2008).

## **2.7 Biologia Molecular e suas ferramentas**

A biologia molecular tem criado ferramentas para pesquisa, tanto na medicina humana como na medicina veterinária. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilita testes altamente sensíveis, cujas aplicações vão desde o diagnóstico clínico até a programas de melhoramento animal. Contudo, tais procedimentos dependem da habilidade de se obter DNA em quantidade suficiente e de um extrato de boa qualidade. Há vários métodos de purificação do DNA genômico, no entanto, ainda persistem problemas como contaminação por DNA estranho, inibidores de PCR e sensibilidade da molécula de DNA, que facilitam sua quebra (COELHO et al., 2004). Segundo Barea et al. (2004) a PCR é uma técnica rápida que permite amplificação de regiões do genoma, a partir de mínimas quantidades de DNA, mesmo que degradado.

Bueno (2004) relata que as técnicas de otimização da extração de DNA para a utilização na PCR têm permitido a investigação de diferentes amostras biológicas inclusive quando o DNA está presente em pequenas quantidades. Vários segmentos da ciência são beneficiados com esse aperfeiçoamento, como a medicina forense, investigações criminais, exclusão de paternidade, a busca de marcadores tumorais ou agentes infecciosos, e o transplante de medula identificando a fixação do enxerto. Pontas de cigarro, saliva, esfregaço bucal, soro, bulbos capilares, entre outros, podem fornecer informações importantes desde que analisados de forma adequada.

### **2.7.1 Extração de DNA**

Até pouco tempo, o ganho genético em animais domésticos através da seleção para características quantitativas de interesse econômico, era feito utilizando-se apenas o fenótipo, pois, pouco se conhecia do genótipo dos indivíduos. O avanço da genética molecular tem contribuído para a área de melhoramento ao permitir o acesso direto ao genótipo dos organismos em estudo, permitindo averiguação mais precisa da estrutura genética populacional e da variabilidade genética. O grande ganho fornecido por estas metodologias foi a seleção assistida por marcadores (MARQUES, 2005).

Uma etapa importante do processo de identificação do genótipo dos indivíduos é a extração do DNA. Existem na literatura vários métodos de extração de DNA de mamíferos, dentre eles, os métodos não invasivos - como a extração através de folículo piloso – tem se mostrado atrativos por apresentarem custo e dispêndio de tempo reduzidos, fácil coleta e estocagem das amostras. Entretanto a quantidade de DNA obtida por tais métodos pode ser baixa, sendo a genotipagem possível apenas por meio de amplificação por PCR. E também os métodos invasivos – extração através de amostras sanguíneas, técnica que apresenta uma maior quantidade de DNA obtido após extração. Os métodos de extração de DNA, geralmente, são baseados em kits comerciais, de gastos relativamente elevados (LACORTE et al., 2004). Neste trabalho foram utilizadas amostras de sangue provenientes de animais das duas raças, considerados hígdidos, para realização da reação em cadeia da polimerase.

### **2.7.2 PCR – Reação em cadeia da polimerase**

A reação em cadeia da polimerase foi desenvolvida por Kary Mullis e grupo de cientistas da Cetus Corporation e tem sido considerada uma das mais importantes técnicas utilizada pela biologia molecular. A primeira publicação foi realizada em 1985, na Science, intitulada “Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analyses of sickle cell anemia” (ZANELLA, 2006).

Segundo Oliveira et al. (2007), a PCR apresenta ampla gama de aplicações em vários ramos da pesquisa. Essa reação possibilita que determinada região do genoma, de qualquer organismo, seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnósticos mais sensíveis e específicas. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e a análise de grande número de

amostras simultaneamente fazem dessa técnica uma opção atrativa para estudos epidemiológicos e para caracterização de microrganismos causadores de doenças.

Para que se possa amplificar determinado segmento de DNA, é necessário que as extremidades da sequência sejam conhecidas. Os elementos envolvidos nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas. A solução em que ocorre a reação – composta por amostra de DNA, nucleotídeos, enzima DNA-polimerase, cloreto de magnésio, *primers* ou iniciadores – é preparada em banho de gelo e colocada em microtubos de plástico esterilizados (OLIVEIRA et al., 2007).

A PCR é considerada um processo de 3 passos, chamados de ciclos, os quais são repetidos várias vezes, quantas forem necessárias. A primeira fase é conhecida como desnaturação – esta é a fase na qual o DNA perde sua estrutura de dupla hélice, por meio da elevação da temperatura, para cerca de 94 a 95°C. A desnaturação permite que os *primers* se liguem à região complementar na sequência da amostra de DNA. Desnaturação mais longa (*hot start*) no primeiro ciclo pode ser utilizada com a finalidade de otimizar essa fase, permitindo o melhor anelamento dos *primers*. O DNA genômico permanece desnaturado por todos os ciclos subsequentes, porque as fitas complementares estão em concentrações muito baixas, o que impede a sua reunião. Os *primers*, por sua vez, estão em concentrações muito altas, fato que facilita o encontro das regiões complementares (OLIVEIRA et al., 2007). A segunda fase, chamada de anelamento, consiste em diminuir a temperatura em torno de 40 à 65°C, dependendo do tipo de *primer* que está sendo utilizado, para favorecer a ligação destes com a sequência de DNA que está sendo estudada. Uma vez que os *primers* se anelem com a sequência complementar de DNA, eleva-se a temperatura a 72°C (ZANELLA, 2006). Nesta temperatura inicia a terceira fase, conhecida como extensão, quando a enzima DNA – polimerase (*Taq* – DNA – Polimerase) se posiciona junto aos *primers* que se anelaram anteriormente e, com auxílio do magnésio, inicia a síntese da nova fita. Esta síntese se inicia a partir dos *primers* por meio da utilização dos nucleotídeos (dNTPs) que foram adicionados ao tampão e que são sempre complementares à fita molde. Dessa maneira, são formadas novas fitas de DNA de dupla hélice, correspondente a região alvo de amplificação (delimitada pelos *primers*) (OLIVEIRA et al., 2007).

Este processo de desnaturação, anelamento e extensão, correspondem a um ciclo. Ao final do primeiro ciclo, existem duas novas fitas de DNA, ambas idênticas a original. Cada ciclo demora cerca de dois a três minutos e podem ser repetidos várias vezes. O crescimento a

cada ciclo é exponencial e ao final dos ciclos existem milhões de sequências idênticas a inicial. Para obter melhor amplificação de uma determinada região do DNA são necessários 30 a 40 ciclos (ZANELLA, 2006).

### **2.7.3 PCR – RFLP (Reação em cadeia da polimerase - polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)**

Segundo Watson et al. (2006) os cromossomos são moléculas únicas de DNA extremamente longas, que podem conter milhares de genes. Para estudar genes e sítios individuais no DNA, as longas moléculas de DNA celular devem ser clivadas em fragmentos menores que possam ser manipulados. Essa clivagem é realizada pelas endonucleases de restrição, enzimas que clivam o DNA em sítios determinados pelo reconhecimento de sequências específicas.

As enzimas de restrição utilizadas na biologia molecular reconhecem, tipicamente, pequenas sequências alvo (4 – 8 pb), normalmente palindrômicas, e clivam em uma posição definida dentro dessas sequências. As enzimas de restrição diferem não apenas em sua especificidade e extensão das sequências de reconhecimento, mas, também, na natureza das extremidades do DNA que elas originam (WATSON et. al., 2006). Segundo Scapin (2004), as enzimas de restrição têm sequências específicas de reconhecimento no DNA, onde as mesmas conseguem cortar (clivar) o DNA. Estas sequências são chamadas de sítios de restrição (ou seja, existência ou não de determinado sítio em função da sequência de DNA) que geram os chamados polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs). As mudanças no DNA genômico levam à criação ou à eliminação de determinados sítios de clivagem, alterando, assim, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA. Os diferentes comprimentos de fragmentos de restrição constituem alelos co-dominantes em um *locus* de DNA. Os RFLPs podem surgir de deleções ou inserções de DNA ao invés de acontecer através de mudanças de nucleotídeos únicos, modificando o tamanho do fragmento de restrição. Um polimorfismo nesse nível pode ser detectado independentemente da alteração na sequência afetar ou não o fenótipo. Provavelmente, poucos polimorfismos de sítios de restrição realmente afetam o fenótipo (WATSON et al., 2006).

A coexistência de alelos múltiplos em um *locus* é chamada de polimorfismo genético. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é,

por definição, polimórfico. Para isso, o alelo deve estar presente em uma frequência maior do que 1% na população. A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência de DNA. As alterações em um *locus* incluem aquelas que mudam a sequência de DNA, mas não mudam a sequência da proteína, aquelas que mudam a sequência da proteína sem mudar a sua função, aquelas que criam proteínas com diferentes atividades e aquelas que criam proteínas mutantes que não são funcionais. Uma população pode ter polimorfismo extensivo em nível de genótipo. Muitas variantes de sequências diferentes podem existir em um determinado *locus*; algumas delas são evidentes, porque afetam o fenótipo, mas outras estão ocultas, porque não têm efeito visível (SCAPIN, 2004).

A clivagem de DNA com enzimas de restrição muitas vezes é utilizada como uma técnica complementar no diagnóstico molecular de doenças infecciosas, bem como de doenças genéticas. Os resultados de uma clivagem geralmente são analisados através da técnica conhecida como Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição ou RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), a qual se baseia na análise do perfil de restrição (tamanho dos fragmentos gerados após a clivagem) de determinado fragmento de DNA (WATSON et al., 2006).

Atualmente, a técnica de RFLP tem sido utilizada associada à técnica de PCR (PCR – RFLP). Nesta técnica, primeiramente é realizada uma PCR e, posteriormente, o amplicon é clivado com uma ou mais enzimas de restrição, onde o perfil de restrição é analisado em um gel de agarose ou poliacrilamida (ROSSETTI et al., 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

Foram utilizadas 40 éguas, sendo 20 da raça Campolina e 20 da raça Mangalarga Marchador, das quais por punção da veia jugular, foram colhidos cerca de 5 mL de sangue em microtubos contendo citrato de sódio. Os microtubos foram transportados em caixa isotérmica contendo baterias de gelo até o Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, onde foram realizadas as análises.

#### 3.1. Extração de DNA genômico

De cada amostra de 10 mL de sangue, foram obtidos os leucócitos por centrifugação (3000 rpm por 5 min) e lavagem com solução salina (0,9% em NaCl), repetida por três vezes ou até as células (eritrócitos e leucócitos) estarem bem lavadas. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, a camada das células brancas foi aspirada, para ser acondicionada em tubo plástico de 200µL e armazenada a - 20°C.

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos, através da técnica fenol-clorofórmio – álcool isoamílico (modificado de SAMBROOK et al., 1989). Analisou-se o DNA extraído em gel de agarose a 0,8%, corado com Blue Green Loading Dye (0,2 µL por amostra), visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

#### 3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação da seqüência referente ao IGHG4, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a partir da seqüência conhecida de cDNA (AY445518), através dos programas Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e Operon (<http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx?>). O par de *primers* escolhidos amplifica um fragmento de 232 pb.

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Bioneer®):

IGHG4 – Forward: 5'CCCAACTGACATTGACATCG

IGHG4 – Reverse: 5'TCATTTACCGGGAGACTTGG

Após a extração do DNA, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 $\mu$ l. Através da adição de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de KCl, 2 a 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM ou 100ng de cada um dos desoxirribonucleotídeos, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas®) e 30 ng de DNA.



**Figura 4.** Reação em Cadeia da Polimerase realizada em termociclador.

As reações foram efetuadas em um termociclador (Biocycler) (Figura 4). Os ciclos de temperatura foram adequados para cada reação, com base nas análises prévias de temperatura de anelamento para o par de oligonucleotídeos (WAGNER et al., 2004): desnaturação inicial a 95°C por 6 minutos; 8 ciclos consecutivos – desnaturação a 94°C por 20”, anelamento a 60°C por 30” e extensão a 72°C por 2 minutos; 35 ciclos consecutivos – 94°C por 20”, 54°C por 30” e 72°C por 2 minutos; e por fim, a extensão 72°C por 5 minutos, 8°C –  $\infty$ . O produto obtido pela amplificação foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado utilizando-se marcador de DNA para 50 pb (DNA Ladder – Invitrogen) e em seguida fotodocumentado (Figura 5).



### 3.3. Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

A partir da sequência conhecida foram determinadas enzimas de restrição (endonucleases) para utilização na análise por PCR-RFLP: *AvaII* (Eco47I); *PmlI* (Eco72I); *TaqI* e *PvuII* (Fermentas®).

A reação de corte do DNA amplificado com as enzimas de restrição foi realizada de acordo com a especificação do fabricante para cada enzima utilizada. Após a digestão enzimática, analisou-se o DNA digerido em gel de agarose a 1,5%, com marcador de peso molecular definido (DNA Ladder – 50 pb), corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia®), visualizado em transluminador e fotodocumentado (Figura 5), para verificação e determinação dos alelos.



**Figura 5.** Visualização do gel de agarose a 1,5%, no transluminador.

### 3.4. Análise dos dados

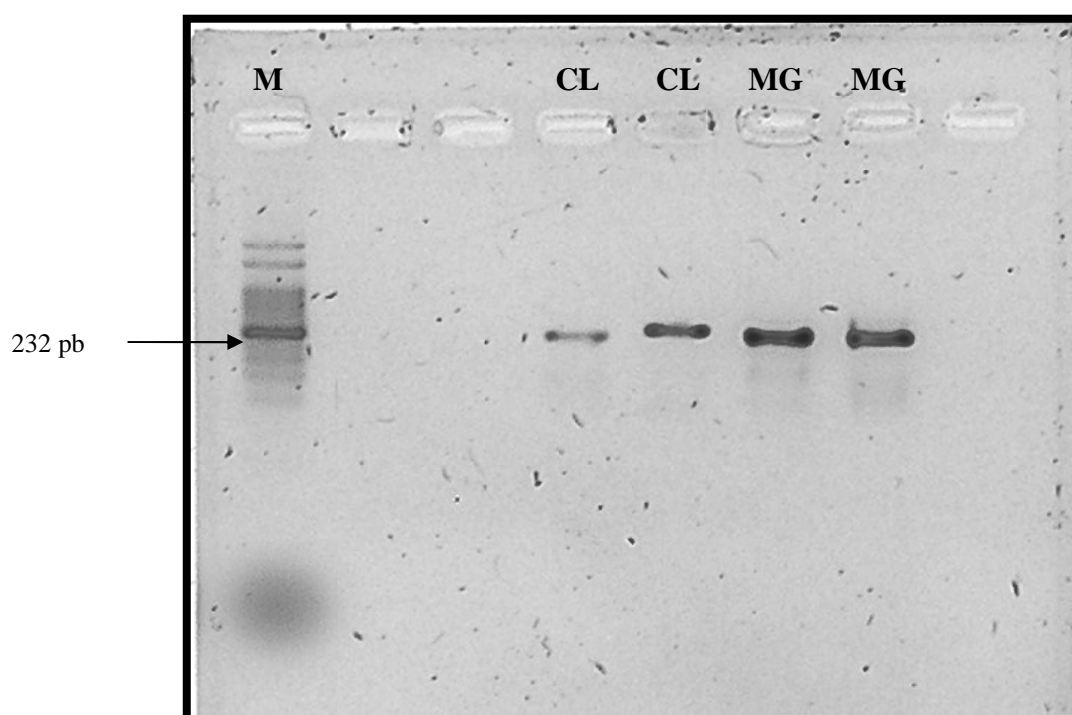
Os dados foram tratados de forma descritiva, calculando a frequência das bandas alélicas encontradas, na forma de percentual (%), para se estabelecer a ocorrência dos alelos encontrados em cada raça envolvida no estudo. Assumindo que existe um estado ideal de equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW), o mesmo foi verificado utilizando o teste exato de Fischer, através do programa GENEPOP (versão 1.2), sendo o nível de significância padronizado para 0,05% (RAYMOND et al., 1995)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

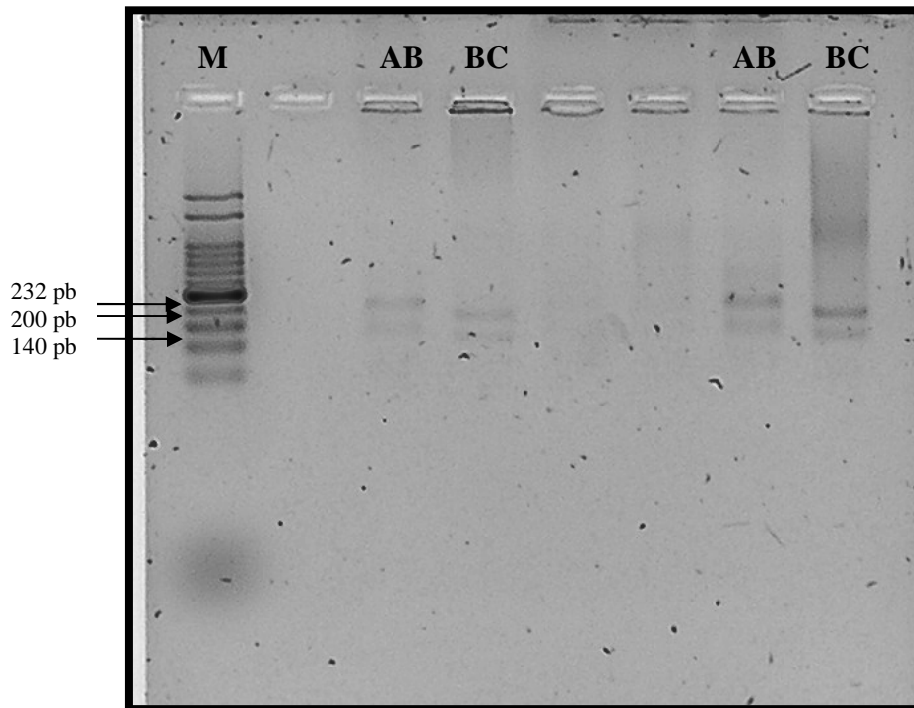
O DNA genômico foi extraído através da técnica de fenol-clorofórmio, de todas as amostras, porém somente foi possível amplificar a sequência do gene IGHG4 em 5 amostras da raça Mangalarga e 10 amostras da raça Campolina, apresentando o mesmo padrão de amplificação com 232pb.

Utilizou-se o produto da PCR para o teste de RFLP, com as endonucleases escolhidas, no entanto apenas a endonuclease *AvaII* foi eficiente na detecção de polimorfismos. Observou-se que 9 das 15 amostras da raça Mangalarga e 4 das 10 amostras da raça Campolina apresentaram corte do DNA amplificado com utilização da endonuclease *AvaII*.



**Figura 6.** Fragmento de DNA amplificado (232 pb), contendo a região do gene IGHG4 da imunoglobulina G equina, em éguas das raças Campolina (CL) e Mangalarga Marchador (MG). M: Marcador DNA-Ladder 50 bp.

O resultado da digestão enzimática (endonuclease *AvaII*) demonstrou a presença, na população estudada, de três padrões de fragmentos, representados pelos alelos A (232 pb), B (140 + 92 pb) e C (200 + 32 pb) (Figura 6).



**Figura 7.** Padrão eletroforético obtido por digestão com endonuclease *AvaII* da região do DNA que contém o gene *IGHG4* em éguas da raça Campolina (CL). M: Marcador DNA-Ladder 50 pb.

Na tabela 1, encontram-se as frequências alélicas e genóticas do loco estudado, onde observou-se uma maior frequência do alelo A em relação aos alelos B e C em todas as populações estudadas. O alelo B foi encontrado em maior proporção quando comparado ao alelo C na raça Campolina e em menor proporção na raça Mangalarga. Foi observada uma predominância do genótipo AA (homozigose) em todas as populações analisadas.

Em relação à heteroziguidade observou-se uma alta frequência de indivíduos heterozigotos em todas as populações. A análise das frequências demonstrou que as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy Weinberg (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frequências alélica e genotípica, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e o equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) do loco do IGHG4, nas raças Campolina e Mangalarga Marchador da Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco – Brasil

Raças	Alelos			Genótipos				Heterozigosidade		EHW*
	A	B	C	AA	AB	AC	BC	Ho	He	
CL	0,700	0,2	0,1	0,15	0,05	0	0,05	0,99	0,720	0,377
MG	0,533	0,166	0,300	0,15	0	0,1	0,125	0,99	0,731	0,618

CL = Campolina; MG = Mangalarga Marchador; Ho= Heterozigose observada; He= heterozigose esperada

\*populações em equilíbrio de Hardy Weinberg

No presente estudo, apesar de serem encontrados em menor frequência, os alelos B (0,2 e 0,166) e C (0,1 e 0,3) apresentaram frequências significativas nas populações estudadas de Campolina e Mangalarga, respectivamente.

A presença de polimorfismo nos animais estudados pode ter significados biológicos, seja na determinação de distâncias genéticas entre populações, seja para conferir diferentes capacidades fisiológicas do ponto de vista imunológico. Lewis et al. (2008) demonstraram que diferenças na constituição peptídica da cadeia pesada da IgG, especialmente nos domínios constantes ( $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ ), das diferentes isoformas desta imunoglobulina, resulta em diferentes capacidades de se ligar à proteína A ou G, pois a modificação de um único aminoácido altera o sítio de ligação às proteínas.

A homologia entre as isoformas de IGHG4 é bastante variável, Wagner et al. (2002) observaram que entre IGHG4 e IGHG6 existe uma homologia de 96% dos nucleotídeos da região  $C_{H1}$ , e na região  $C_{H2}$ , a homologia é de 88% entre IGHG4 e IGHG5. A reação de PCR-RFLP realizada neste estudo, utilizando como endonuclease a *AvaII*, demonstrou que existem diferenças na sequência de nucleotídeos que modificaram os sítios de restrição da enzima. No alelo A o sítio está ausente, considerando que não houve corte pela enzima e nos alelos B e C o corte foi realizado em sítios diferentes, resultando em fragmentos de diferentes tamanhos. Wagner et al. (2004) caracterizaram as sete isoformas de IgG utilizando a enzima *BamHI* e os fragmentos gerados pela técnica PCR-RFLP.

Pode-se questionar se os polimorfismos observados estariam alterando a constituição de aminoácidos desta isoforma de imunoglobulina a ponto de alterar sua capacidade

imunológica. Sendo a IgG4, umas das principais isoformas de Ig equina, estudos relacionados a estes achados com a composição imunológica do colostro das éguas devem ser realizados.

Encontros internacionais têm destacado a necessidade de novas investigações sobre o papel funcional das subclasses de IgG equina e o desenvolvimento de ferramentas para avaliação das imunoglobulinas equinas (LUNN et al., 1998).

## 5 CONCLUSÃO

---

Apesar de ser considerado a isoforma mais conservada da IgG, o gene IGHG4 apresentou polimorfismos entre os animais estudados, seja da mesma raça ou de raças diferentes, o que demonstra a existência de diferenças genéticas que podem influenciar na função desta imunoglobulina.

Estudos mais aprofundados podem vir a estabelecer a relação entre estas diferenças genéticas e a produção de imunoglobulina, ou sua função na imunidade passiva dos potros recém-nascidos, através do colostro.

## REFERÊNCIAS

---

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fonts escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n. 4, p. 233-234, 2004.

COELHO, E. G. A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n.1, p. 111-115, 2004.

COSTA, H. E. C.; MANSO FILHO, H. C.; FERREIRA, L. M. C. **Exterior e Treinamento do Cavalo**. Recife: Imprensa Universitária. 2001. p. 35-44.

COSTA, M. D. et al. Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 5, p. 687-690, 2004.

DAVIS D. G. et al. Measurement of Serum IgG in Foals by Radial Immunodiffusion and Automated Turbidimetric Immunoassay. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 19, n. 1, p. 93-96, 2005.

FONTES, L.R. **Origem e características do cavalo Campolina**. 1957. 60f. Tese (Concurso para Professor Titular) - Escola Superior de Veterinária, Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 348.

HERBERT, W. J. **Imunologia Veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1972. p. 40 e 41.

HOWARD, D. L. et al. Proteína total, albumina e globulinas no plasma de potras sadias da raça Brasileiro de Hipismo em crescimento. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 77-82, 2008.

JEFFCOTT, L. B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 6, n. 3, p. 109-15, 1974.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 222 e 223.

KABAT, E.; WU, T.; PERRY, H. et al. Sequences of proteins of immunological interest. 5<sup>th</sup> ed. **US Department of Health and Human Services**, Washington, DC., 1991.

LACORTE, G. A.; DIAS, I. M. G.; CARVALHO, M. R. S. **Extração não invasiva de DNA de “*Equus caballus*”**: uma avaliação de métodos. Im: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5. ed, 2004, Pirassununga.

LANG, A. **Imunidade passiva em equinos neonatos**: comparação entre diferentes métodos. 2006. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LANG, A. et al. Imunidade passiva em eqüinos: comparação entre a concentração de IgG do soro materno, colostro e soro do neonato. **Revista Ceres**, Viçosa, v.54, n. 315, p. 405-411, 2007.

LEFRANC, M. P. **Genética Molecular das Imunoglobulinas**. 2003. Disponível em: <http://www.imgt.org/>

LEVIEUX, D. Transmission de l'immunité par le colostrum chez le veau. **Bulletin Technique**, Theix, v.41, p.39-47, 1980.

LEWIS, M. J.; WAGNER, B.; WOOF, J. M. The different function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. **Molecular Immunology**. Arlington, v. 45, n. 3, p. 818 – 827, 2008.

LOPES, L. A. Uso oral e intravenoso de imunoglobulina. **Revista Saúde Equina**. 1999. Disponível em: <http://bichoonline.com.br/>

LUNN, D.P. et al. Report of the second equine leucocyte antigen workshop, Squaw Valley, California, July 1995. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, n. 2, p. 101-143, 1998.



MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.** 2005. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M; LUCISANO-VALIM, Y. M. **Receptores para imunoglobulina G (FcγR).** Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 82-95, 2005. Disponível em: [http://www.fmrp.usp.br/revista/2005/vol38n1/receptores\\_imunoglobulina.pdf](http://www.fmrp.usp.br/revista/2005/vol38n1/receptores_imunoglobulina.pdf)

McGUIRE, T. C. et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 11, p. 1302-1304, 1977.

MORAES, E. F. et al. **Estudo do polimorfismo dos genes da  $\alpha S1$  – Caseína e da  $\kappa$  – Caseína em cabras do semi-árido do Nordeste Brasileiro.** 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NICHOLAS, F. W. **Introdução à genética veterinária.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul LTDA . 1999. p. 67 – 73

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.** EMBRAPA, São Carlos: 2007.

OVERESCH, G. et al. Organization of the equine immunoglobulin constant heavy genes II, Equine c-gama genes. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 66, n. 3-4, p. 273 – 287,1998.

PRESTES, N. C., ALVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 33 e 34.

PROCÓPIO, A. M.; BERGMANN, J. A. G.; COSTA, M. D. Formação e demografia da raça Campolina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 55, n. 3, p. 361-365, 2003.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact tests and ecumeinism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 46 e 47.

ROCHA, J. F. **Os cavalos da Vila Quixote: A história de um sonho sem fronteiras.** São Paulo, 1999.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças infecciosas: Diagnóstico Molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1/17/38.

ROZEN, S.; SKALETSKY H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386. Disponível em <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 2 ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCAPIN, F. **Polimorfismos Genéticos.** Projeto Genoma Humano – Genética Humana. Medicina – FFFCMPA, 2004.

SCOTONI, C. M.M.; NETO, M. R. Transferência de imunidade passiva em eqüinos: comportamento imunológico do recém nascido. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.** Piracicaba. v.48, p. 109 – 126, 1991.

SENSEL, M.G.; LISA, M.K.; MORRISON, S.L. Amino acid differences in the N-terminus of CH2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. **Molecular Immunology,** Califórnia, v. 34, n. 14, p. 1019-1029, 1997.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária, uma introdução.** 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 154.

TORRES, G. C. V. **Bases para o estudo da Zootecnia.** Salvador: Centro Editorial e Didático da UFBA, 1990. p. 380.

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; PEREIRA, A. C. **Colostro de égua no aleitamento artificial.** São Carlos: EMBRAPA – CPPSE, 1994. p.21.

WAGNER, B. et al. Evolution of the six horse IGHG genes and corresponding immunoglobulin gamma heavy chains. **Immunogenetics,** v. 54, n. 5, p. 353-364, 2002.

WAGNER, B. et al. The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and IgD in the Horse. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3230-3242, 2004.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P. **Biologia Molecular do Gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 649 – 658.

ZANELLA, R. **Washington State University**: Endocrinologia da Reprodução Animal. 2006. 73f. Relatório de Estágio Curricular em Medicina Veterinária - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.