AVALIAÇÃO DO GRAU DE POLIMORFISMO DE STRs CLONADOS DE EQUINOS PARA USO EM TESTES DE FILIAÇÃO

SILVA, Hugo Delleon¹; **ANUNCIÇÃO**, Carlos Eduardo²

Palavras-chave: paternidade, microssatélites, eqüinos, PCR,

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as associações de criadores de cavalos têm registrado os pedigrees e resolvidos questões de vínculo genético, utilizando reação de proteínas sangüíneas, através de técnicas de detecção imunologica, variantes enzimáticas e padrão de subunidades de isoenzimas em gel. A utilização desses marcadores protéicos fornece um resultado limitado, devido, dentre outros fatores, ao baixo polimorfismo encontrado. Assim, através dessas técnicas, uma progênie de uma dada linhagem só pode ser identificada negativamente (não positivamente) como progênie de um acasalamento.

Dezenas de trabalhos envolvendo testes de parentesco por DNA em eqüinos já foram publicados, sendo esses baseados principalmente na clonagem de Microssatélites de DNA. Os marcadores SSRs são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação polimórfica, além de seguirem um padrão de segregação mendeliana, características altamente desejáveis em um marcador molecular, permitindo alcançar uma acurácia de 99,9998% de exclusão na paternidade. Assim, o presente trabalho analisou clones de STRs para padronizar um teste de filiação em eqüinos.

2. METODOLOGIA

2.1 – Amostragem.

Foi coletado amostras de 10ml de sangue num total de 20 cavalos. O sangue coletado com EDTA foi armazenado a 4°C até o processamento. Foi coletadas também, amostras de sangue dos trios (Garanhão, potro e égua). O DNA foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio segundo Sambrook et al (1986).

2.2 – Amplificação pelo PCR

Cerca de 50 a 100ng do DNA extraído foi submetido a amplificação pela técnica do PCR, utilizando-se de seis seqüências de STRs enriquecidas de VNTRs de cavalos Mangalarga-Machador (S01, S07 e S09). A reação consiste de 40 ciclos e nas condições estabelecidas por Anunção-Filho(2000) e (Luis et al., 2002).

2.3 - Análise eletroforetica

A análise dos alelos foi feita em gel PAGE/Ureia corado pelo metodo da prata de acordo com Sambrook et al (1986).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Amplificação de STRs de eqüinos.

Foi testado condições diferenciadas de tampão, TM e concentração de magnésio na PCR. Obtendo bandas difusas na maioria das amplificações, de impossível distinção dos alelos, provavelmente pela pequena diferença entre o peso molecular dos mesmos e a proximidade dos iniciadores da porção variável do loci, assim como a falta de padronização do TM.

3.2 - Análise dos clones

Os clones S01, S07 e S09 apesar de bem caracterizados em Gel PAGE/Uréia, não mostraram passíveis de serem utilizados em eletroforese do tipo multiplex. Contudo, foi feita corridas do tipo multiplex (ASB2, HTG4 e VL20) e duplex (HTG6 e HMS3) com outros primers.

	Alelos PM	Alelos Observ	Alelos esperd os	Heterog esperada	Heteroz obser
ASB2	222-254	4	8	0,785	0,45
HTG4	128-138	3	6	0,68	0,51
VLV20	88-106	4	10	0,753	0,42
HMS3	152-170	3	10	0,749	0,49
HTG6	84-106	2	5	0,703	0,34
HMS6	159-169	3	6	0,71	0,38
S01	256-270	3	desc	0,52	0,58
S07	121-131	2			0,35
S09	130-142	3			0,4

Figura 01 – Análise dos primers segundo a frequência alélica e heterozigidade.

4. CONCLUSÃO

A metodologia de determinação de parentesco pela PCR é uma técnica robusta, mas que requer um sistema de eletroforese automatizado. As bandas se mostraram difusas sem possibilidade de determinar seu correto peso molecular. Isto levou a um baixo poder de exclusão da paternidade, mesmo com a somatória de todos os loci.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUNCIAÇÃO, C.E. & ASTOLFI FILHO, S. 2000. Paternity test in Mangalarga-Marchador equines by DNA fingerprinting. PAB, 2007-15.

LUIS, C., E.G., OOM, M.M., 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. Genet. Mol. Bio. 25,131-134.

SAMBOOK, J.; FRITSCH, E.P. and MANIATS, T. (1986). Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Diagnóstico Genético e molecular, hugo_bioufg@yahoo.com.br

² Orientador/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, carloset@quimica.ufg.br