

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Polimorfismo do Gene *MSTN* e do SNP BIEC2-808543 e
sua Relação com Crescimento de Potros da Raça
Brasileiro de Hipismo**

Érica Cristina Xisto da Costa

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POLIMORFISMO DO GENE *MSTN* E DO SNP BIEC2-808543 E SUA
RELAÇÃO COM CRESCIMENTO DE POTROS DA RAÇA
BRASILEIRO DE HIPISMO**

ÉRICA CRISTINA XISTO DA COSTA

Sob a orientação da professora

Maria Amélia Menck Soares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

636.1

C837p

T

Costa, Érica Cristina Xisto da, 1988-
Polimorfismo do gene *MSTN* e do SNP
BIEC2-808543 e sua relação com crescimento
de potros da raça brasileiro de hipismo /
Érica Cristina Xisto da Costa - 2015.
61 f.: il.

Orientador: Maria Amélia Menck Soares.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 41-48.

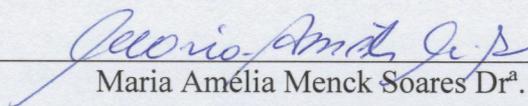
1. Equino - Teses. 2. Equino -
Crescimento - Teses. 3. Genes - Teses. 4.
Polimorfismo (Genética) - Teses. 5.
Zootecnia - Teses. I. Soares, Maria Amélia
Menck, 1963-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Zootecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

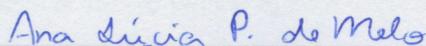
ÉRICA CRISTINA XISTO DA COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/07/2015



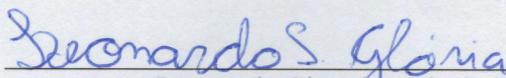
Maria Amélia Menck Soares Dr^a. UFRRJ
(Orientadora)



Ana Lúcia Puerro de Melo Dr^a. UFRRJ



Ricardo Augusto Mendonça Vieira Dr. UENF



Leonardo Siqueira Glória Dr. UFV

À Deus.

À minha mãe por todo apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos por sempre estarem do meu lado em todos os momentos.

Ao meu namorado pela paciência e apoio durante toda essa jornada.

À minha orientadora pelos ensinamentos passados.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela oportunidade de ter um ensino de qualidade que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CNPq), pela bolsa de estudos concedida que possibilitou a realização deste projeto.

À Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro na pessoa Tenente-Coronel Paulo Vargas de Oliveira, pela oportunidade de realização da pesquisa.

À minha orientadora, Professora Dra. Maria Amélia Menck Soares, pelos conhecimentos passados, por me auxiliar na realização deste projeto. Muito obrigada pela paciência, compreensão, por acreditar em mim e por lutar junto comigo pelo sucesso deste projeto.

Ao Professor Dr. Ricardo Augusto Mendonça Vieira da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e ao Dr. Leonardo Siqueira Glória, pela ajuda com inenarrável nas análises estatística e finalização da dissertação.

Agradeço também a Professora Dra. Ana Lúcia Puerro de Melo, por todo conhecimento passado e fundamental apoio. Obrigada pela amizade, paciência e por acreditar em mim.

Ao professor Fernando Queiroz de Almeida, minha gratidão e reconhecimento.

Ao Cap. Rodrigues, Cap. Vaz, Cap. Rigueira, Ten. Lucas, Ten. Kaipper, Ten. Lessana, Ten. Juliana, Ten. Teodoro pelo apoio e auxílio na execução do experimento. Em especial a Ten. Janaina não só pelo apoio na realização do experimento, mas também por me presentear com sua amizade.

À minha base, ao meu exemplo, à minha mãe, Glória Cristina Monteiro Xisto da Costa obrigada pelo apoio, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e me aconselhando a nunca desistir, sempre prosseguir e persistir na busca pela concretização dos meus sonhos e ideais, mesmo quando eu não me achava capaz.

Aos meus irmãos Thiago Xisto da Costa e Lucas Xisto da Costa por serem tão especiais e estarem comigo sempre de forma incondicional. E ao meu namorado Rodrigo da Silva Lopes pela incentivo, pela paciência e compressão da ausência.

Aos amigos que colaboraram para o desenvolvimento deste projeto, Amanda, Adriana, Leonardo, Odair, Victor e Ramon.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha história, que me motivaram a continuar em busca desta conquista, Luana, Talita, Rafaela, Gleice, Elid, Priscilla e André.

As amigas/irmãs do apartamento 301 do alojamento F3 que a UFRRJ me presenteou, que sempre me incentivaram e apoiaram desde a graduação, Suiam, Giovana, Tamyra, Maíra, Vanessa, Marina, Fernanda, Blenda, Violaine. Obrigada por sempre me acolherem quando eu saía tarde do laboratório e por serem tão especiais pra mim.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização deste trabalho, me fazendo continuar e não desistir mesmo diante de todas as dificuldades.

E por fim o agradecimento mais importante, à Deus por tudo o que Ele é, por seu misericordioso cuidado, por ter me sustentado até aqui, até a concretização deste ideal.

“Por que Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas.”

Rm. 11:36

BIOGRAFIA

ÉRICA CRISTINA XISTO DA COSTA, filha de Glória Cristina Monteiro Xisto da Costa e Júlio Sérgio Xisto da Costa, nasceu em Rio de Janeiro – RJ, em 14 de Março de 1988.

No ano de 2007, iniciou no Curso de Graduação em Bacharelado em Zootecnia, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo em março de 2013.

Em março de 2013, iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração em Produção Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, especificamente em Melhoramento Genético Animal e Produção de Equinos.

RESUMO

COSTA, Érica Cristina Xisto da. **Polimorfismo do gene *MSTN* e do SNP *BIEC2-808543* e sua relação com crescimento de potros da raça Brasileiro de Hipismo**. 2015. 48 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O gene que codifica a miostatina (*MSTN*), localizado no cromossomo 18 (ECA 18) e o *SNP BIEC2-808543* localizado na região intergênica que antecede o gene que codifica a proteína semelhante a corressor de receptor nuclear dependente de ligante (*LCORL*), localizado no cromossomo 3 (ECA 3) de cavalos, ambos posicionados em regiões que estão associadas às características conformacionais destes animais. Diante disto, objetivamos identificar se as variações descritas nos loci *MSTN* e *LCORL*, existem na população em estudo; além de verificar os efeitos desses polimorfismos sobre os perfis de crescimento desses animais. Com este intuito foram mensuradas as características massa corporal, altura na cernelha e altura na garupa de potros em diversas faixas etárias, pertencentes à Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro. Foram ajustados modelos não lineares mistos que resultaram da combinação de seis modelos não lineares simples, Brody (1945), Gompertz (Winsor, 1932), Logístico (Ratkowski, 1983), Von Bertalanffy (1957), Michaelis-Menten generalizado (López et al., 2000) e Richards (1959), associados a quatro tipos de funções de variância para cada modelo, homogênea, exponencial, assintótica e escalonada. O polimorfismo descrito na região promotora do gene *MSTN* não foi encontrado na população estudada, na qual observa-se apenas o alelo T, entretanto o polimorfismo *BIEC2-808543*, localizado na região que antecede o gene *LCORL*, está significativamente associado ($P < 0,05$) às características avaliadas, sendo os animais que apresentaram o genótipo TT menores e mais leves quando comparado com os demais genótipos. Não foi observada diferença significativa entre os animais com genótipo TC e CC. O modelo que melhor descreve a curva de crescimento para a variável massa corporal é o modelo de Brody (1945) associado com a variância escalonada, para a variável altura na cernelha o modelo que melhor se ajustou foi o de Von Bertalanffy (1957) (ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b) associado com a variância assintótica e para a característica altura na garupa o modelo que melhor a descreveu foi o de Brody (1945) associado à variância assintótica, elucidando que os modelos não-lineares mistos são de fato promissores para a descrição de curvas de crescimento de equinos, pois os modelos simples não diferiram muito entre si o que definiu de fato a seleção do modelo foi a variância, sendo para massa corporal a variância escalonada e para as alturas, na cernelha e na garupa, a variância assintótica. Este polimorfismo pode ser utilizado como marcador molecular para seleção precoce de potros quanto às características avaliadas.

Palavras-chave: Curva de crescimento, Equinos, Genes candidatos.

ABSTRACT

COSTA, Érica Cristina Xisto da. **Polymorphism of *MSTN* gene and SNP BEC2-808543 and its relation to growth of Brasileiro de Hipismo foals.** 2015. 48 p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The gene encoding myostatin (*MSTN*), located on chromosome 18 (ECA 18) and the SNP BEC2-808543 located in the intergenic region, which precedes the gene encoding the protein similar to the nuclear corepressor receptor dependent binder (*LCORL*), located on chromosome 3 (ACE 3) in horses, both positioned in regions that are associated with conformational traits of these animals. In view of this, we aimed to identify if the variations described in *MSTN* and *LCORL* loci exist in the study population; and to identify the effects of these polymorphisms on the growth profiles of these animals. For this purpose, the characteristics measured were weight, height at withers and hip height of foals at different ages, belonging to the Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro. Nonlinear mixed models were adjusted resulting from the combination of six nonlinear simple models, Brody (1945), Gompertz (Winsor, 1932), Logistics (Ratkowski, 1983), Von Bertalanffy (1957), generalized Michaelis-Menten (Lopez et al., 2000) and Richards (1959) associated with four types of variance functions for each model, homogeneous, exponential, asymptotic and staggered. The polymorphism described in the promoter region of the *MSTN* gene was not found in the studied population, in which there has been only the T allele, however the BEC2-808543 polymorphism, located in the region prior to the *LCORL* gene is significantly associated ($P < 0,05$) to the characteristics evaluated, in which the animals who presented the genotype TT were smaller and lighter when compared to the other genotypes. There was no significant difference between animals with CT and CC genotype. The model that best describes the growth curve for body mass variance is the model of Brody (1945) associated with the scaled variance for the variable height at the withers the model that best fit was the Von Bertalanffy (1957) (adjusted without polymorphism effect in b) parameter associated with the asymptotic variance and the characteristic hip height the model that best described was that of Brody (1945) associated with the asymptotic variance, explaining that the nonlinear mixed models are indeed promising to describe equine growth curves, for the simple models did not differ much among themselves what defined in fact the selection of the model was the variance, being for body mass staggered variance and the height at the withers and on the back, the asymptotic variance. This polymorphism can be used as molecular markers for early selection of foals as to the characteristics evaluated.

Keywords: Growth Curve, Horses, Candidate Genes.

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 Tabela 1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos pares de primers equinos.....	14
Tabela 2 Sítios de corte das enzimas de restrição e padrão de corte para genotipagem.....	15
Tabela 3 Modelos não- lineares de crescimento utilizado no estudo.....	16
Tabela 4 Variâncias.....	16
Tabela 5 Frequências referentes ao SNP BIEC2-808543 em equinos da raça BH.....	19
Tabela 6 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável massa corporal em equinos da raça Brasileiro de Hipismo.....	25
Tabela 7 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável massa corporal em equinos da raça Brasileiro de Hipismo.....	26
Tabela 8 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça BH.....	30
Tabela 9 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça BH.....	31
Tabela 10 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável altura na garupa (AG) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo.....	35
Tabela 11 Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, M = Marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb), P = Fragmento de 484 pb amplificado por PCR sem digestão, correspondente a região promotora do gene MSTN (PCR), canaletas de 1 a 9 = fragmentos sem corte após a reação de digestão com a enzima AfaI (PCR-RFLP), genótipo TT.....	19
Figura 2	Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. Canaletas de 1 a 9 = Fragmentos amplificados de 347 pares de base (pb) correspondentes ao SNP BIEC2-808543 upstream ao gene LCORL após digestão com a enzima BsrI (PCR-RFLP), canaletas 1 a 3 = genótipo TT (fragmentos de 235 pb, 57 pb e 55 pb), canaletas 4 a 6 = genótipo TC (fragmentos de 292 pb, 235 pb, 57pb e 55 pb), canaletas 7 a 9 = genótipo CC (fragmentos de 292 pb e 55 pb), P = Fragmento amplificado de 347 pb sem ter sido submetido à digestão, M= Marcador de peso molecular de 50 pb.....	20
Figura 3	Figura 3. Resultado do alinhamento entre as sequências da região gênica do SNP BIEC2-808543 de equino, nº de acesso no GenBank (NC009146). 209 e 861 referem-se as amostras da mesma região para a raça Brasileiro de Hipismo. O SNP BIEC2-808543 T/C está identificado pela letra Y, de pirimidina (do inglês: “pYrimidine”) e a variação referente transição G/A está identificada pela letra R, de “puRina”, ambos destacados em negrito. O novo sítio de corte ocorre toda vez que a adenina (A) está presente no fragmento. Os sítios de corte da endonuclease BsrI estão sublinhados. As letras A, T, C e G correspondem às bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina respectivamente.....	21
Figura 4	Eletoferogramas mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al., 1977 do fragmento amplificado pelo par de primers correspondentes a região antecedente ao gene LCORL. Cada base é representada por uma cor: A = Verde, G = Preto, C = Azul e T = Vermelho. Os dois gráficos correspondem a mesma amostra (amostra 861). O eletroferograma (a) corresponde ao fragmento amplificado pelo primer-F (direto, do inglês forward) e o (b) pelo primer-R reverso (do inglês: reverse). O novo SNP G/A encontrado está sinalizado pela seta.....	22
Figura 5	Eletoferogramas mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al., 1977 do fragmento amplificado pelo par de primers correspondentes a região antecedente ao gene LCORL. Cada base é representada por uma cor: A= Verde, G= Preto, C= Azul e T=Vermelho. O gráfico corresponde a amostra 861 evidenciando o polimorfismo já descrito. O eletroferograma (a) corresponde ao fragmento amplificado pelo primer-F (direto, do inglês forward) e o (b) pelo primer-R reverso (do inglês: reverse). O SNP BIEC2-808543 T/C encontrado está sinalizado pela seta.....	23

Figura 6	Dados observados (Δ), valores preditos (linha sólida) e intervalos de confiança 95% (linhas tracejadas) do massa corporal dos equinos da raça Brasileiro de Hipismo. Gráfico a: genótipo TT, gráfico b: genótipo TC, e gráfico c: genótipo CC.....	28
Figura 7	Massa corporal a maturidade para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo. Genótipo TT = yf1, genótipo TC = yf2 e genótipo CC = yf3.....	29
Figura 8	Taxa de crescimento referente a massa corporal para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k1, genótipo TC = k2 e genótipo CC = k3.....	29
Figura 9	Dados observados (Δ), valores preditos (linha sólida) e intervalos de confiança 95% (linhas tracejadas) da altura de cernelha dos equinos da raça Brasileiro de Hipismo. Gráfico a: genótipo TT, gráfico b: genótipo TC, e gráfico c: genótipo CC.....	33
Figura 10	Altura na Cernelha à maturidade para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = yf1, genótipo TC = yf2 e genótipo CC = yf3.....	34
Figura 11	Taxa de crescimento referente a altura na cernelha (AC) para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k1, genótipo TC = k2 e genótipo CC = k3.....	34
Figura 12	Dados observados (Δ), valores preditos (linha sólida) e intervalos de confiança 95% (linhas tracejadas) da altura na garupa dos equinos da raça Brasileiro de Hipismo.....	37
Figura 13	Altura na Cernelha à maturidade para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = yf1, genótipo TC = yf2 e genótipo CC = yf3.....	38
Figura 14	Taxa de crescimento referente a altura na cernelha para o polimorfismo do gene LCORL (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k1, genótipo TC = k2 e genótipo CC = k3.....	38

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABCCH	Associação Brasileira de Criadores de Cavalo de Hipismo;
AC	Altura na Cernelha;
AG	Altura na Garupa;
AIC	Critério de Informação de Akaike;
BH	Brasileiro de Hipismo;
BMP	Proteína morfogenética óssea (<i>Bone morphogenetic proteins</i>);
CBH	Confederação Brasileira de Hipismo;
CCE	Concurso Completo de Equitação;
ECA	Cromossomo autossomal de <i>Equus caballus</i> (<i>Equus caballus autosomes</i>);
FEI	Federação Equestre Internacional;
<i>GDF-8</i>	Fator de crescimento e diferenciação – 8 (<i>Growth Differentiation Factor 8</i>);
<i>HMGA2</i>	Grupo de alta mobilidade AT-HOOK2 (<i>High Mobility Group AT-hook 2</i>);
<i>IGF-1</i>	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>);
<i>LASPI</i>	<i>LIM and SH3 protein 1</i> ;
<i>LCORL</i>	Proteína semelhante a correpresor de receptor nuclear dependente de ligante (<i>ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein</i>);
<i>MSTN</i>	Miostatina (<i>Myostatin</i>);
NORCE	Normas para o controle dos equídeos no Exército Brasileiro;
NCAPG	<i>Non-SMC condensin I complex, subunit G</i> ;
PCR	Reação em Cadeia da DNA Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>);
PCR- RFLP	Reação em Cadeia da DNA Polimerase – Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>);
QTL	Loci de Característica Quantitativa (<i>Quantitative Trait Loci</i>);
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>);
SRD	Serviço de Registro Genealógico;
TFIID	Fator de Transcrição da RNA polimerase II D (<i>Transcription Factor II D</i>);
TGFβ	Fator Transformador de Crescimento-beta (<i>Transforming Growth Factor-β</i>);
WBFSH	<i>World Breed Federation for Sports Horses</i> ;
ZFAT	Domínios gancho de AT e dedos de zinco (<i>Zinc Finger and AT hook domain containing</i>);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Raça Brasileiro de Hipismo	3
2.2	Crescimento dos Equinos	4
2.2.1	Avaliações morfométricas	5
2.2.2	Modelos de crescimento de equinos	6
2.3	Genes Candidatos	7
2.3.1	Gene da miostatina (<i>MSTN</i>)	8
2.3.2	Gene <i>LCORL</i>	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Composição da Amostra	12
3.2	Estudo de Polimorfismos Gênicos	12
3.2.1	Material biológico	12
3.2.2	Extração de DNA	12
3.2.3	Avaliação de polimorfismos – PCR	13
3.2.4	Análise de PCR-RFLP	14
3.2.5	Sequenciamento	15
3.3	Análise Estatística	15
3.3.1	Procedimento estatístico	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1	Obtenção dos Fragmentos por PCR Convencional e Digestão por Enzimas de Restrição	18
4.1.1	<i>MSTN</i> (GDF-8)	18
4.1.2	<i>LCORL</i>	19
4.2	Influência do SNP BIEC2-808543 Sobre os Perfis das Curvas de Crescimento	24
4.2.1	Variável massa corporal	25
4.2.2	Variável altura na cernelha (AC)	30
4.2.3	Variável altura na garupa (AG)	35
5	CONCLUSÕES	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A raça Brasileiro de Hipismo (BH) foi formada com o intuito de obter animais aptos para adestramento, salto, concurso completo de equitação e enduro. Originou-se do cruzamento de diferentes raças de esporte reconhecidas pela *World Breed Federation for Sports Horses* (WBFSH). São registrados pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos de Hipismo (ABCCH) os produtos dos cruzamentos do cavalo Brasileiro de Hipismo, das raças formadoras entre si ou das raças formadoras com o cavalo Brasileiro de Hipismo (ABCCH, 2011).

A Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro destaca-se entre as Organizações Militares (OM) de todo o país por ser a única OM destinada a produção de equinos, seu plantel é composto em sua maioria por animais da raça BH, entretanto há animais da raça Bretã e sem raça definida (SRD), todos são distribuídos a partir dos 36 meses de idades para as OM de todo o Brasil. O Exército Brasileiro é detentor de um dos maiores rebanhos de equinos do Brasil, possui cerca de 1.876 equinos em seu efetivo, segundo o boletim do Exército nº48/2014, publicado em 28 de novembro de 2014.

Os cavalos militares têm por finalidade atividades de patrulhamento, guarda, participação em cerimônias militares tais como desfiles, guarda de honra e escolta de autoridades, instruções militares nas escolas de formações de oficiais e praças, além de práticas esportivas como adestramento, salto, pólo e Concurso Completo de Equitação (CCE). Entretanto para cada uma destas finalidades a adequação de características através de seleção dos animais se faz necessária. Equinos destinados a cerimônias militares deverão apresentar altura na cernelha superior a 1,60m, para instruções militares e representação desportiva acima de 1,55m e para serviço equinos com altura entre 1,45m e 1,54m. (COLOG, 2013). Neste contexto a seleção precoce dos reprodutores é de suma importância, pois permite identificar aqueles que proporcionarão descendentes mais adequados aos padrões necessários para os cavalos do Exército Brasileiro, possibilitando direcionar os cruzamentos conforme a necessidade.

As avaliações morfométricas podem proporcionar uma estimativa das taxas de crescimento específicas para cada raça. Esse tipo de avaliação é muito utilizada para a seleção de cavalos atletas e em estudos de crescimento. Nos equinos da raça Brasileiro de Hipismo, já foram feitos estudos nos quais utilizaram medidas morfométricas da altura na cernelha, do perímetro torácico e o peso corpóreo para avaliar o crescimento dos potros até um ano de idade (Santos et al., 1992) e até a idade adulta (Mcmanus et al., 2010), mas em nenhum destes trabalhos foi levado em consideração polimorfismos genéticos para serem utilizados como marcadores moleculares na seleção de equinos para esporte.

A genética molecular é uma importante ferramenta nas pesquisas e em práticas rotineiras em diversas áreas, como medicina, criminalística e melhoramento genético de espécies domésticas, e na pecuária não tem sido diferente, entretanto em cavalos há poucos estudos nesta área com enfoque em crescimento quando comparado a outras espécies como a bovina. Atualmente a pesquisa em genética molecular de cavalos tem focado em genes envolvidos com patologias e performance esportiva. Contudo, em alguns estudos estão descritos polimorfismos em genes como o *LCORL* (Signer-Hasler et al., 2012) e *MSTN* (Dall'Olio et al., 2010) que podem exercer influência sobre o desenvolvimento dos equinos. Assim, assumimos que animais com diferentes genótipos para esses dois genes, podem apresentar diferentes perfis de crescimento.

O gene miostatina (*MSTN*) localizado no cromossomo 18 (ECA 18), a proteína semelhante a corressor de receptor nuclear dependente de ligante (*LCORL*) e o *SNP BIEC2-*

808543 localizado na região intergênica que antecede o gene *LCORL* no cromossomo 3 (ECA 3) de cavalos encontram-se em regiões que tem sido associadas às características conformacionais destes animais.

Dessa forma, objetivou-se avaliar se os polimorfismos genéticos descritos para os genes *MSTN* e *LCORL* existem na raça BH e se as variações genéticas estão relacionadas ao perfil da curva de crescimento desses animais para as variáveis massa corporal, altura na cernelha e altura na garupa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raça Brasileiro de Hipismo

A raça Brasileiro de Hipismo (BH) tem obtido reconhecimento internacional principalmente após se destacar nas Olimpíadas de Atlanta (1996) e Sydney (2000), nos Jogos Pan Americanos (2007) e nos Jogos Mundiais Militares (2011), além de ser uma promessa para o Pan Americano de Toronto, Canadá (2015) e para as Olimpíadas de agosto de 2016 que acontecerá no Rio de Janeiro. A Associação Brasileira de Criadores do Cavalo de Hipismo (ABCCH) foi fundada em julho de 1977 com o objetivo de promover e incentivar a criação de cavalos destinados aos esportes hípicas.

Desde sua fundação a ABCCH é reconhecida pelo Ministério da Agricultura como entidade responsável pelo Serviço de Registro Genealógico (SRG, também conhecidos como *Stud-Books* ou livros genealógicos) das raças de cavalos atletas no Brasil, além de participar da única associação internacional de livros genealógicos de equinos para o esporte (World Breeding for Sport Horses) e atuar junto a Federação Equestre Internacional (FEI) e a Confederação Brasileira de Hipismo (CBH) que são responsáveis por regulamentar, coordenar e promover os esportes equestres de Saltos, Adestramento e Concurso Completo de Equitação (CCE). A raça BH foi formada a partir do acasalamento de um grupo de éguas denominadas Éguas-Base com ou sem genealogia conhecida, de características morfométricas funcionais capazes de produzir potros dentro do padrão racial do Cavalo Brasileiro de Hipismo com garanhões nacionais ou importados de qualquer idade ou procedência, devidamente inscritos e aprovados para reprodução no SRG das raças formadoras (ABCCH, 2011).

A Associação Brasileira de Criadores de Cavalo de Hipismo (ABCCH) define como “raças formadoras”: Arabe, Anglo Arabe, Andaluz, Anglo European, American Saddlebred, American Warmblood, Bavarian, Bayern, Hannoveriana, Hessen, Holsteiner, Mecklenburg, Anglo Normando, Oldenburguer, Puro Sangue Inglês, Rheiland, Sachsen-anhalt, Sela Argentina, Sela Belga, Sela Dinamarquesa, Sela Francesa, Sela Holandesa, Sela Irlandesa, Sela Italiana, Sela Luxemburguase, Sela Mexicana, Sela Norueguesa, Sela Polonesa, Sela Suíça, Sela Sueca, Sela Uruguaia, Trackener, Westfalen, Wurttemberg, Zangersheide, Zwebrucken e Friesian (ABCCH, 2011).

Dias et al. (2000) relataram a existência de 20 raças nos bancos de dados da ABCCH durante o período de julho de 1977 até setembro de 1998. As raças que mais influenciaram na formação da raça BH foram Puro Sangue Inglês (15%), Hannoverana (8,1%), Westfalen (5,2%), Holsteiner (4,8%) e Trakehner (4,1%). Sendo os garanhões formadores da raça pertencentes principalmente às raças Puro Sangue Inglês (20,9%), Hannoverana (16,1%), Westfalen (10,5%), Holsteiner (9,6%), Trakehner (8,2%) e os machos da própria raça (8,7%); e em relação às “éguas-base” a maioria de matrizes nacionais com ou sem genealogia conhecida (42,8%), Puro Sangue Inglês (10,8%) e éguas da raça BH (36,2%). Segundo os autores a raça ainda encontra-se em formação e; o grande número de raças utilizadas na formação do cavalo BH explica o fato do coeficiente de endogamia observado e esperado serem próximo de zero e a alta variabilidade genética possibilita a implementação de futuros programas de melhoramento genético. Atualmente são aceitas como matrizes todas as éguas BH e das raças formadoras registradas no SRG e os machos reprodutores devem ser escolhidos em eventos de julgamento intitulado “Aprovação de Garanhões” realizados anualmente, promovido e regulamentado pela ABCCH (ABCCH, 2011).

Segundo os registros do Exército Brasileiro os equinos produzidos por seu criatório, na Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro possuem sangue das raças:

Brasileiro de Hipismo (BH), Puro Sangue Inglês (PSI), Hanoverano (HAN), Holsteiner (HOL), Sela Francesa (SF), Sela Belga (SB) e Sela Holandês (SH). De acordo com o regulamento do *Stud Book* brasileiro do cavalo de hipismo, o cavalo BH deve ter aos cinco anos de idade altura na cernelha de 1,65m para fêmeas e 1,68m para machos, perímetro torácico 1,90m para machos e 1,85m para fêmeas; e perímetro da canela 21,5cm para machos e 20cm para fêmeas.

2.2 Crescimento dos Equinos

O crescimento dos equinos inicia-se na fecundação, atinge seu ápice em torno dos 12-18 meses, posteriormente reduzindo de maneira gradual até a fase adulta, sendo influenciado por fatores genéticos, ambientais e as interações genótipo e ambiente. Segundo Jordão & Camargo (1950) os potros nascem com aproximadamente 60% da altura de cernelha do animal adulto e o crescimento pode ser dividido em duas fases, um período de crescimento rápido, até um ano de idade, sendo o primeiro mês de vida o período de maior intensidade; e outro de crescimento lento. O primeiro de crescimento rápido é caracterizado pelo aumento da taxa de crescimento em relação ao tempo, até alcançar o ponto de inflexão da curva, ou seja, o nível máximo da taxa de crescimento. Para alguns parâmetros de crescimento, como o peso e altura na cernelha, as taxas máximas de crescimento ocorrem até a puberdade, aproximadamente aos 18 meses, o qual representa o marco do segundo período de crescimento do potro. Durante esta segunda fase a taxa de crescimento diminui em relação ao tempo, podendo ser afetada por diversos fatores como disponibilidade de alimentos, condições climáticas, tipo de treinamento, aptidão do animal, dentre outros. Fatores como raça, porte, sexo, ano e mês de nascimento, idade e ordem de parto das éguas podem influenciar no crescimento de equinos, devendo ser considerados no manejo destes animais (Martin-Rosset, 2005).

A influência do sexo sobre o crescimento dos animais é diferenciado variando de acordo com a região do corpo, como observado por Cabral et al (2004^a) cujos resultados demonstraram diferença entre o crescimento de machos e fêmeas, os quais até os 12 meses de idade, machos apresentam maior taxa de crescimento na altura na cernelha enquanto que as fêmeas apresentam maior crescimento da altura na garupa no mesmo período. Hintz et al. (1979) observaram que o peso, a altura e a densidade óssea dos machos são maiores que das fêmeas nos primeiros meses de idade e essa diferença tende a aumentar com o tempo. Estes autores também observaram que éguas com idade até sete anos produzem potros mais leves, menores e com menor densidade óssea em relação às fêmeas entre 7 e 11 anos de idade. O mês e o ano de nascimento também influenciam no crescimento e desenvolvimento dos potros, por causa da disponibilidade de nutrientes, devido a melhor ou pior, quantidade e qualidade das forrageiras; e das condições climáticas impostas a égua lactante e ao animal em crescimento; podendo este efeito do mês de nascimento, estar também relacionado ao estado nutricional e sanitário da égua ao entrar em reprodução, propiciando assim condições pré e pós-natal mais adequadas à cria.

Mota et al. (2010) observaram efeitos significativos do sexo, ano e mês de nascimento sobre as características morfométricas avaliadas de altura na cernelha, perímetro torácico, altura na anca, largura do tórax, perímetro de canela e altura do tórax, sendo que os machos e os animais nascidos no final do inverno apresentaram valores mais altos nas variáveis supracitadas. Faria et al. (2004) ao avaliar a conformação de equinos em crescimento das raças Quarto de Milha, Mangalarga e Árabe, observaram que a estação e ano de nascimento, a genética, o sexo e o padrão de pelagem dos potros apresentaram influência significativa na altura na cernelha, perímetro torácico, perímetro na canela, comprimento do corpo e peso corporal dos animais.

A definição de uma única curva de crescimento aplicada a todos os tipos e raças de equinos ainda é uma possibilidade apenas teórica, pois equinos de raças de diferentes portes

apresentam padrões de crescimento diferenciados, as raças de maior porte tendem alcançar o peso adulto mais lentamente quando comparadas as que apresentam menor porte (Hintz et al., 1979). Entretanto, na literatura, a maioria das informações disponíveis é oriunda de pesquisas realizadas com poucas raças ou em animais de um único porte acarretando a sub ou superestimação dos parâmetros nos potros de diferentes raças (NRC, 2007).

Luszczynski et al. (2011) comparando o crescimento de equinos de quatro raças entre o nascimento e 20 meses de idade, observaram aumento na altura da cernelha de 42,7% nos equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI), 39,5% Árabes, 37,9% Anglo-Árabes e 39,4% equinos Hucul, raça de origem na região das montanhas Carpathians. No Brasil, Santos et al. (1992) observaram que animais da raça Brasileiro de Hipismo apresentaram, em média, altura na cernelha de 0,98m ao nascer, o que corresponde a 67% da altura do animal aos 12 meses, que é de aproximadamente 1,46m.

2.2.1 Avaliações morfométricas

As avaliações dos equinos podem ser objetivas ou subjetivas. As subjetivas classificam os animais utilizando escores para tipo, conformação de cabeça, de pescoço e de corpo, aprumos, andamento ao passo e ao trote, entre outros (Holmtröm, 2000). No entanto, este tipo de avaliação é pouco precisa, pois há grande influência do avaliador. As avaliações objetivas são mais precisas, pois são baseadas em medidas lineares, angulares e perimétricas da conformação dos equinos. As avaliações objetivas podem ser realizadas com uso de instrumentos específicos como o hipômetro, artrogoniômetro e fita métrica, ou através de filmagem ou fotografia (2D ou 3D) dos equinos, cujos pontos anatômicos são previamente enfatizados com marcadores reflexivos, e as imagens digitalizadas em programa específico para obtenção das medidas (Godoi et al., 2013).

A morfometria, que representa uma avaliação objetiva, é o estudo das mensurações das regiões do corpo dos animais, também conhecida como biometria, é fundamental no entendimento da execução dos movimentos inter-relacionando-se com a aptidão dos equinos (Godoi, 2012). Os parâmetros de avaliação mais utilizados podem ser divididos em medidas lineares, distâncias, perímetros (Camargo & Chieffi, 1971; Barbosa, 1993; Thompson, 1995); medidas angulares e proporções corporais (Oom & Ferreira, 1987). Cabral et al. (2004^a) verificaram que as medidas de altura, comprimento do corpo e perímetro torácico são parâmetros eficientes para análise do crescimento de equinos. Estas avaliações permitem selecionar aqueles animais que mais se adequam morfologicamente a uma determinada função ou padrão racial. Algumas características morfológicas estão associadas ao desempenho, como por exemplo, o perímetro torácico e a largura do peito que indicam indiretamente a capacidade pulmonar do animal que é uma das características fundamentais para cavalos atletas (Bakhtiari & Heshmat, 2009). Os animais longilíneos estão mais aptos à velocidade. Os animais caracterizados como brevelíneos são mais aptos para força, e os mediolíneos, possuem aptidão intermediária (Torres & Jardim, 1987).

Cabral et al. (2004^b) observaram que em equinos da raça Mangalarga Marchador, as medidas angulares não apresentaram variação crescente durante o período de crescimento, podendo ser utilizada como ferramenta de seleção fenotípica dos animais jovens e melhoramento genético da raça. Pinto et al. (2005) realizaram a avaliação morfométrica de potros da mesma raça ao nascimento, aos 6 e aos 12 meses, através da análise de componentes principais e observaram que foi possível reduzir o número de medidas lineares necessárias para a avaliação do potro.

Os índices conformacionais e as proporções corporais são utilizados como referências morfométricas que correlacionam as medidas do animal com sua aptidão. Os principais índices

de conformação dos equinos são o Índice Corporal (IC), Índice meloscópico (IM), Índice dáctilo-torácico (IDT), Índice de carga na canela (ICC) e Proporções corporais. O IC é determinado pela relação entre o comprimento do corpo (CC) e o perímetro torácico (PT) ($IC = CC/PT$) e através de seu valor é possível classificar os animais em longilíneos ($IC > 0,9$), mediolíneos ($0,86 < IC < 0,88$) e brevelíneos ($IC < 0,85$) (Torres & Jardim, 1987).

2.2.2 Modelos de crescimento de equinos

A literatura disponibiliza-nos inúmeros modelos para avaliação de crescimento, onde os mais utilizados na avaliação de crescimento de animais de produção são os modelos não lineares Logístico (Ratkowski, 1983), Gompertz (Winsor, 1932), Brody (1945), Von Bertalanffy (1957) e Richards (1959). A vantagem de aplicarmos estes modelos não-lineares para a descrição de curvas de crescimento é que os mesmos dispõem de alguns parâmetros que possuem explicação biológica. Estes modelos apresentam formato variável de acordo com a espécie animal, condições ambientais e outras características, sendo necessária a comparação e a escolha do modelo que mais se adeque ao perfil de crescimento de cada animal.

A comparação dos modelos que melhor descrevem o crescimento de animais tem sido feita em diversos estudos (Paz, 2002; Freitas et al., 2005). Ao comparar oito modelos lineares e não lineares para descrever a curva de crescimento de equinos de corrida, Valette et al. (2008) observaram que o modelo linear foi o que pior se ajustou, sendo os modelos não-lineares os mais adequados para descrever o crescimento do animal ao longo do tempo.

McManus et al. (2010) ao estudar modelos de curvas de crescimento dos equinos das raças PSI, Brasileiro de Hipismo, Hanoverano e mestiços, com mais de três anos de idade observaram que a curva de Richards para peso ou altura na cernelha não ajustou em nenhuma das categorias de sexo ou grupo genético. A curva Logística não ajustou para as características de peso enquanto que a de Gompertz não convergiu para as características de altura na cernelha dos equinos das raças estudadas. Valette et al. (2008) observaram que os modelos de Gompertz, Logística e de Brody foram eficientes na estimativa da altura da cernelha dos potros até 3 anos de idade, no entanto nos animais entre 2 e 6 anos de idade os modelos que mais se ajustaram para altura da cernelha foram as equações logarítmicas e modelo exponencial.

Ao avaliar o crescimento de potros da raça Brasileiro de Hipismo e mestiços da Coudelaria de Rincão utilizando a medida de altura na cernelha pelo modelo Logístico para ambos os sexos, Almeida et al. (2011) observaram que não houve diferença significativa no padrão de crescimento tornando assim possível a construção de uma equação geral capaz de gerar uma única curva de crescimento atendendo aos grupos genéticos estudados.

Objetivando identificar entre as diversas funções matemáticas citadas na literatura, as que melhor descreveriam a curva de crescimento de equinos da raça BH e dos animais sem raça definida (SRD) do Exército brasileiro da Coudelaria Rincão, Dornelles (2011), indicou a utilização das funções Brody (1924) e Bianchini Sobrinho (1984) em estudos que visem ajustar equações de regressão para dados de crescimento das raças em foco no estudo, pois estes foram os modelos não lineares que apresentaram pequenas diferenças entre si, permitindo afirmar que ambos se ajustam de forma satisfatórias aos dados de crescimento desses animais, além de obterem melhor ajuste para a característica altura na cernelha.

A definição de curvas de crescimento que levam em consideração fatores que influenciem diretamente o crescimento, tais como o sexo, a raça, a idade da égua na parição, o ano do nascimento do animal é importante para aumentar a acurácia dos dados. Os trabalhos sobre curvas de crescimento de equinos levam em consideração o crescimento do animal até 12, 18 ou 24 meses de idade (Thompson, 1995; Cabral et al., 2004^a; Ringler & Lawrence, 2008).

O estudo realizado por Ringler & Lawrence (2008) compara os valores de crescimento e as equações descritas pelo NRC (1989) e pelo NRC (2007) e demonstra que ambos são pouco precisos em prever o crescimento de potros. A equação proposta pelo NRC (2007) quando comparada ao NRC (1989) subestima os dados de proporção de peso corporal de animais de raças com peso adulto até 500 kg, enquanto que nas raças com peso adulto acima de 600kg, os resultados na curva de crescimento são superestimados. Os resultados utilizados pela equação proposta no NRC (2007) foram insuficientes para determinar se há interferência do porte da raça na taxa de crescimento dos equinos. Os valores preditos pelo NRC (2007) podem subestimar o crescimento dos equinos durante os primeiros cinco meses de vida. Entre 9 e 12 meses de idade a média de peso corporal predita por este sistema apresenta valores maiores que os resultados originais, desta forma os resultados observados por Ringler & Lawrence (2008) permitem supor que o tempo de coleta de dados de crescimento de 12 a 18 meses utilizados pelo NRC (1989) e (2007) foi insuficiente para construção de curvas de crescimento. No entanto, estas referências podem ser utilizadas como ferramenta de aproximação, sendo necessários novos ajustes nas equações de forma a obter resultados mais coerentes aos observados a campo.

Todos os modelos não lineares propostos na literatura admitem a mesma variação ao longo da curva entretanto, na prática não é o que se pode observar. No período de crescimento o que se constata é que a variância é crescente ao longo da curva. À priori há uma variação pequena que acompanha de forma crescente o comportamento da curva, chegando ao final do crescimento com uma variação maior do que a observada no início do crescimento. Diante do exposto, Vieira et al. (2012) e Rocha et al. (2015) testaram para diferentes fins perfis de crescimento associado à diferentes funções de variância (covariância) para cada modelo.

2.3 Genes Candidatos

Genes candidatos são genes já sequenciados com ação biológica conhecida e que estão envolvidos com características do desenvolvimento ou da fisiologia, a qual pode afetar a característica biológica de interesse (Bryne & McMullen, 1996). Neste contexto, o gene *LCORL* (do inglês: *ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein*), o qual codifica um fator de transcrição e o gene *MSTN* (do inglês: *myostatin*), o qual codifica a miostatina, um fator de crescimento, podem ser considerados genes candidatos a exercer influência sobre características de crescimento, tendo isto já sido comprovado em outras espécies, como em humano (Schroeder, 2010; Dall'Ollio et al., 2014) e bovinos (Lindholm-Perry et al., 2011; Xu et al., 2014; Paz, 2002).

Em janeiro de 2007 foi publicado o sequenciamento completo do genoma equino (EquCab2.0) que hoje encontra-se disponível “online” em [HTTP://genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/), segundo Regatieri e Mota (2012). A disponibilidade da sequência facilitou a pesquisa genômica em cavalos, identificando e estimando os efeitos genéticos de QTL's (*Quantitative Trait Loci*) que são regiões do genoma responsáveis pela expressão de características fenotípicas quantitativas, como peso e altura e, a identificação de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP; do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*), o que resultou no desenvolvimento e aplicação dos *chips* de SNP's. Esses *chips* foram projetados para detectar regiões genômicas modificadas ao longo da seleção e permitir a identificação de SNP's e genes que estão associados a características de interesse nas várias raças de equinos, o *EquineSNP50 BeadChip* da empresa Illumina (Illumina Inc., USA), por exemplo está em sua segunda geração, esse novo chip possui 74,5 mil SNPs, dos quais 21 mil são novos marcadores.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores analisaram uma gama de genes candidatos com o objetivo de identificar potenciais marcadores genéticos associados à características de

interesse em equinos tais como: cor da pelagem (Rosengren et al., 2007; Reissmann et al., 2007); doenças (Brooks et al., 2010); reprodução, fertilidade (Giesecke et al., 2010^{a,b}); e desempenho (Gu et al., 2009, 2010; Hill et al., 2010^{a,b}; McGivney et al., 2012).

Atualmente características complexas relacionadas ao desempenho em provas esportivas e aptidões específicas, além de características conformacionais são alvo de pesquisas por meio de *chips* de SNPs para equinos (Hill et al., 2010^b; Schröder et al., 2011; Petersen et al., 2013). Meira et al. (2014) indicam os genes candidatos *WWOX* (do inglês: *WW domain containing oxidoreductase*) para peso e comprimento da garupa e o gene *AVPRIA* (do inglês: *arginine vasopressin receptor 1A*) para comprimento da garupa em cavalos Quarto de Milha.

Para altura na cernelha estudos indicam vários QTL's e diferentes genes candidatos como os genes *HMG2* (*High Mobility Group AT-hook 2*) localizado no cromossomo autossomal de número 6 de equino (ECA 6), *ZFAT* (*Zinc Finger and AT hook domain containing*) no ECA 9, *LASPI* (*LIM and SH3 protein 1*) no ECA 11 e *NCAPG* (*non-SMC condensin I complex, subunit G*) no ECA 3 para diversas raças, entretanto todos os estudos apontam um QTL no ECA 3 adjacente ao gene *LCORL*. Evidenciando o gene *LCORL* como gene candidato para altura na cernelha (Schroeder, 2010; Signer-Hasler et al., 2012; Makvandinejad et al., 2012; Metzger et al., 2013; Tetens et al., 2013).

2.3.1 Gene da miostatina (*MSTN*)

A miostatina é um modulador negativo da massa muscular que limita o crescimento dos músculos esqueléticos através do controle do número e do tamanho das fibras musculares. Codificada pelo gene *MSTN* (anteriormente conhecido como fator de crescimento e diferenciação - *GDF-8*) foi identificada em várias espécies de mamíferos como em roedores (McPherron et al., 1997), seres humanos (Gonzalez-Cadavid et al., 1998), suínos (Stinckens et al., 2008) e equinos (Petersen et al., 2013; Dall'Olio et al., 2014).

O gene *MSTN* é um membro da superfamília de genes *TGFβ* (do inglês: *Transforming Growth Factor-beta*) e da família de proteínas morfogenéticas do osso (BMP's), localiza-se no cromossomo 18 da espécie *Equus caballus*, é constituído de 3 éxons e 2 introns e possui cerca de 2028 pb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100033832> - NM_001081817) (Velie et al., 2015). Foram descritas mutações que diminuem a quantidade de miostatina e/ou inibem sua função em seres humanos (Schuelke et al., 2004), bovinos (Grobet et al., 1998; Marchitelli et al., 2003), ovelhas (Boman et al., 2009) e cães (Mosher et al., 2007).

Ao sequenciar amostras de DNA obtidas a partir de 332 cavalos de 20 raças distintas e promover a comparação com a sequência do gene *MSTN* depositada no *GenBank*, Baron et al. (2012) observaram a presença de 11 haplótipos representados por 10 mutações, sendo oito destas responsáveis por variações na sequência de aminoácidos. Este gene apresenta alta variabilidade, quando comparado com outros genes, podendo sugerir que algumas raças têm a mesma ascendência, mas diferentes pressões de seleção.

Dall'Olio et al. (2010) ao analisarem a sequência deste gene em 396 cavalos de 16 raças diferentes identificaram sete SNP's em raças de diferentes tipos morfológicos, sendo dois no promotor (GQ183900: g.26T> C e GQ183900: g.156T> C), quatro no íntron 1 e um no íntron 2; observaram que os alelos g.26C e g.156C apresentaram maior frequência nas raças mais pesadas do que nas raças mais leves o que sugere que estes polimorfismos podem estar associados com a variabilidade das características morfométricas nas várias raças de cavalos.

Estudos com cavalos Puro-Sangue destacam a utilização do gene *MSTN* (g.66493737C>T) como marcador molecular para performance esportiva, Hill et al. (2010^a) observaram que cavalos que apresentavam o genótipo C/C são explosivos, mais adequados para corridas de curta distância; os com genótipo C/T destacam-se em corridas de meia-distância,

enquanto que os animais com genótipo T/T são mais resistentes, adequados para longas distâncias. Com sequenciamento e análise histológica Petersen et al. (2013) revelaram que o SNP em questão (g.66493737C>T) e uma variação na região promotora, foram significativamente associados ao volume da fibra muscular do tipo IIX, que é uma característica ideal para esportes de explosão como corrida.

Binns et al. (2010) estudando cavalos da raça Puro Sangue Inglês por meio chips de SNPs (Illumina Equine SNP50 BeadChip) encontraram dois polimorfismos (BIEC2-417274 e BIEC2-417495), ambos localizados no cromossomo nº 18 (ECA18), vizinhos ao loco do gene *MSTN* e foram associados com distância ótima em corrida. Em outro estudo Hill et al. (2010^b), também fazendo uso do *Equine SNP50 BeadChip* em cavalos de elite da raça Puro Sangue Inglês de corrida, identificaram o SNP BIEC2-417495 como o mais significativamente relacionado à distância ótima em corrida.

Os SNP'S g.65809482T> C, g.65868604G>T, g.66493737C>T e g.66539967A>G localizados no gene *MSTN* e seus haplótipos podem ser marcadores moleculares indicadores de desempenho em corrida, pois segundo Tozaki et al. (2011^a), a regulação do gene *MSTN* afeta diretamente o desempenho neste esporte. Em outro estudo os mesmos autores determinaram o genótipo de 91 cavalos da raça Puro Sangue em treinamento para os mesmos 4 SNP's do trabalho anterior. Neste novo estudo os autores avaliaram a associação entre os genótipos e características morfométricas de massa corporal, altura na cernelha, perímetro torácico, perímetro da canela e a razão massa corporal - altura na cernelha, das quais somente massa corporal e a razão massa - altura na cernelha foram associados significativamente com os genótipos especificamente em machos. Os estudos consolidam o gene *MSTN* como um marcador genético para performance esportiva, especificamente para distância ótima em corrida e para características conformacionais nas diversas raças de equinos, pois os resultados dos estudos supracitados sugerem que a regulação do gene influencia a massa muscular e o desempenho, particularmente na raça cavalos Puro Sangue.

2.3.2 Gene *LCORL*

O gene *LCORL* que codifica a proteína semelhante ao correpressor de receptor nuclear dependente de ligante (do inglês: *ligand-dependent nuclear receptor compressor-like protein*) localizado no cromossomo autossomal 3 de *Equus caballus* (ECA 3) codifica um fator de transcrição que possivelmente está envolvido na espermatogênese (Palijan et al.; 2009) entretanto, a função deste gene ainda é incerta. Contudo, há polimorfismo neste gene associado a altura em seres humanos (Sovio et al., 2009) e ao crescimento em bovinos (Lindholm-Perry et al., 2013). Em equinos o *LCORL* encontra-se em uma região cromossomal na qual localizam-se genes associados à características de conformação (Schroeder, 2010).

Diversos estudos de genômica ampla foram realizados em equinos com o intuito de localizar QTL's significativos para altura, sendo esta uma das principais variáveis conformacionais utilizadas para escolha de equinos, principalmente para atividades esportivas e para definição do padrão racial definido pelas Associações de Criadores. O controle genético da altura em cavalos é semelhante aos resultados encontrados em cães domésticos que assim como todos os mamíferos domésticos, possuem um pequeno número de *loci* com alelos que apresentam grandes efeitos sobre a altura, isso devido a intensa pressão de seleção que ocorre dentro de cada raça, que varia de acordo com o objetivo da mesma; entretanto contrasta em complexidade da genética da altura em humano, que possui muitas variáveis genéticas com pequenos efeitos sobre a altura (Sovio et al., 2009).

Signer-Hasler et al. (2012) ao realizar estudos de associação genômica ampla avaliando 40 mil SNP's em 1077 cavalos Franches-Montagnes revelou dois QTL's para a altura na

cernelha localizados em regiões intergênicas no ECA 3, próximo aos genes *NCAPG* e *LCORL* (SNP BIEC2-808543 T/C, sendo o alelo C associado ao aumento da altura na cernelha); e no ECA 9 próximo ao gene *ZFAT* (SNP BIEC2-1105377, sendo o alelo A associado ao aumento da altura), juntos são responsáveis por explicar 18,2% da variação na altura em cavalos desta raça, sendo o menor efeito atribuído ao SNP BIEC2-1105377. Os mesmos autores ainda descrevem a região de QTL no ECA 3 (SNP BIEC2-808543) como tendo uma associação significativa também com a conformação dos patas, borda ventral da mandíbula, andamento e conformação da cabeça. E o QTL no ECA 9 (BIEC2-1105377) além de associado a altura na cernelha também foi descrito associação com comprimento na garupa e comprimento do dorso-lombo.

Makvandi-Nejad et al. (2012) relataram 4 *loci* localizados nos cromossomos 3, 6, 9 e 11 que são capazes de explicar 83% da variação na altura de cavalos, entretanto o SNP mais significativo foi o localizado no cromossomo 3, adjacente aos genes *LCORL* e *NCAPG* (SNP BIEC2-808543). Outro gene que também está relacionado à altura dos equinos é o *HMG2* (do inglês: *High Mobility Group AT-hook 2*), o qual codifica um fator de transcrição e apresenta dois SNP's, um dentro e outro ao lado do gene.

Ao realizar um estudo genômico para associação com altura em cavalos da raça Warmblood, Tetens et al. (2013) revelaram um único grande QTL capaz de explicar 18% da variação fenotípica, localizado no ECA 3 adjacente aos genes *LCORL* e *NCAPG* indicando-os como genes candidatos para altura na cernelha.

Segundo Metzger et al. (2013) o SNP BIEC2-808543 localizado em um sítio de ligação do fator de transcrição TFIID e o gene *LCORL* são componentes centrais do aparato de transcrição de genes envolvidos com o desenvolvimento ósseo, possui associação significativa com altura da cernelha dentro e entre raças de cavalos de diferentes tamanhos, sendo o alelo T mais frequente em raças com altura na cernelha inferior a 1,48 m e o alelo C em raças que apresentavam altura superior a 1,60 e maior massa corporal. Esta variação genética é apontada como reguladora da expressão do gene *LCORL*, seus estudos revelaram que nos cavalos maiores, os que apresentaram o genótipo CC, o gene *LCORL* foi cerca de 56% menos expresso e nos heterozigotos TC foram 40% menos expressos quando comparados com os menores cavalos, os que possuíam genótipo TT.

Em outro estudo de associação genômica para características morfométricas em cavalos Quarto de Milha, 13 regiões cromossômicas importantes foram identificadas ($P < 0,001$), das quais três SNP's encontrados nos cromossomos 2 e 3 foram associados ao peso, outros dois SNP's localizados nos ECA 3 e 8 foram associados ao comprimento do corpo e oito SNP's encontrados nos cromossomos 2, 3, 6, 7, 9, 21 e 26 foram associados ao comprimento da garupa (Meira et al., 2014).

Ao avaliar a variabilidade genética do SNP BIEC2-808543 em raças contrastantes, Tozaki et al. (2015), dispendo de 20 cavalos de raças pesadas (Percheron e Bretão) e 48 cavalos de raças pequenas nativas do Japão (Kiso e Yonaguni) observaram que todos os animais de raças pesadas apresentaram o genótipo CC, enquanto que, os das raças pequenas apresentaram genótipo TT. No mesmo trabalho os autores analisaram a influência desta variação genética sobre as contínuas mudanças no tamanho do corpo de cavalos da raça Puro Sangue na última fase de pré-treino, fazendo uso de 175 animais e relataram que os que apresentaram o genótipo CT eram significativamente ($P < 0,05$) mais altos, mais pesados e possuíam maior proporção peso / altura na cernelha que os de genótipo TT. As frequências genotípicas observadas foram de 0,17 para o genótipo CT, 0,83 para o TT e zero para o CC, sendo assim os autores concluíram afirmando que o gene *LCORL* é um dos responsáveis pelas alterações corporais nos equinos da raça Puro Sangue na fase de pré-treino e destaca os genes *LCORL* e *MSTN* como genes candidatos para desempenho atlético em cavalos de corrida.

Conforme exposto acima, trabalhos diferentes apontam que o polimorfismo localizado na região anterior ao gene *LCORL*, ou mais especificamente, no SNP BIEC2-808543 no ECA3, como o responsável por variações dentro e entre diferentes raças de cavalos sobre a característica altura na cernelha. No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados trabalhos que investigassem a existência deste polimorfismo em equinos da raça BH e sua relação com outras características de interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Composição da Amostra

Os animais avaliados pertencem a Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão do Exército Brasileiro, localizada na cidade de São Borja, Rio Grande do Sul. Foram utilizados cerca de 161 potros de ambos os sexos da raça Brasileiro de Hipismo em diferentes faixas etárias entre 0 e 864 dias de idade, mensurados durante o período de janeiro de 2013 a março de 2015. Os potros foram criados em sistema extensivo, mantidos à pasto com suas mães até os 6 meses de idade quando foram desmamados, marcados e separados em lotes de acordo com o sexo. Os animais permaneceram em sistema extensivo segundo o manejo padrão do criatório até os três anos de idade, quando foram selecionados e distribuídos para as Unidades Militares do Exército de todo o Brasil.

Foram mensurados em estação forçada, ou seja, com os quatro membros apoiados uniformemente ao chão de forma que os membros anterior e posterior estivessem na perpendicular sobre um piso plano, formando um paralelogramo retangular, que visto de perfil, seus membros, para cada bípede, se encobrem e vistos de frente ou detrás estão, na vertical e igualmente apoiados no piso (Pinto et al., 2005). Foram avaliadas duas medidas lineares e massa corporal, em potros de diferentes faixas etárias, utilizando os aparelhos hipômetro e balança. As mensurações lineares foram realizadas na face lateral esquerda do corpo do potro conforme descrição abaixo, adaptada de Pinto et al. (2005), Pinto et al. (2008) e Godoi (2012):

Mensurações Lineares

- Altura na cernelha - distância vertical do ponto mais alto da região interescapular, localizado no espaço definido pelo processo espinhoso da 5ª e 6ª vértebra torácica, até o solo;
- Altura na garupa - distância vertical do ponto mais alto da garupa, mais especificamente sobre a tuberosidade sacral, até o solo.

3.2 Estudo de Polimorfismos Gênicos

3.2.1 Material biológico

Foram coletados cerca de 8 mL de sangue da jugular de cada animal, em tubos *vacutainer* estéreis contendo EDTA 8% (Ethylenediaminetetraacetic acid 8%) para genotipagem. Esta etapa foi executada na Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão. Estas amostras foram congeladas e transportadas para o Laboratório de Genética Molecular, no Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras foram descongeladas homogeneizadas e lavadas com tampão fosfato salino 1X (PBS do inglês: *phosphate buffered saline*) 3 vezes para a remoção do excesso de hemoglobina e formação do *pellet* de restos celulares, a separação foi efetuada por centrifugação a 735g por 10 minutos com a transferência destes para tubos estéreis, acompanhados da identificação de cada animal, onde foi estocado a -20°C e pequenas alíquotas foram retiradas para a extração de DNA.

3.2.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi feita utilizando o reagente brometo hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 2%, onde a cada amostra contendo cerca de 100 µL do lisado celular lavados foram adicionados 500 µL do tampão a base de CTAB (brometo

hexadeciltrimetilamônio 2%) em tubos de 1,5 mL. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por duas horas com agitação depois da primeira meia hora.

Após o resfriamento dos tubos em temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL da solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) com posterior agitação vigorosa para que a solução entrasse em contato com todo o material. As amostras foram levadas a centrifugação por 15 minutos a 8.161g. Em eppendorfs estéreis de 1,5mL e devidamente identificados, o sobrenadante foi transferido e a ele foram adicionados 350 µL de isopropanol gelado (mantido a 4°C) com o objetivo de promover a precipitação do DNA ao se homogeneizar a mistura. Essa etapa foi seguida por resfriamento a 4°C em geladeira durante 1 hora e posterior centrifugação a 11.752g durante 20 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes em 1 mL de etanol 75%, com centrifugação a 11.752g por dois minutos nas duas lavagens. Após a evaporação do álcool, as amostras de DNA foram hidratadas com aproximadamente 50 µL de água ultrapura dependendo do tamanho do pellet. O DNA genômico extraído foi armazenado a cerca 4°C em geladeira para uso durante o processo de genotipagem.

3.2.3 Avaliação de polimorfismos – PCR

As análises foram realizadas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), onde foram adicionados aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 4 pmol de cada primer (Tabela 1) que são responsáveis pela delimitação do fragmento de interesse e 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), tendo a amostra um volume final de 20 µL cada. O programa utilizado no termociclador Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 4 min., 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (s), 62°C por 30s e 72°C por 40s e um etapa final de desnaturação de 72°C por 10 min. para amplificação de um fragmento de 347 pb, correspondente à região intergênica adjacente ao gene *LCORL*, o SNP BIEC2-808543.

Para a amplificação do gene *MSTN* foram utilizados cerca de 100 ng de DNA genômico, 1,5 unidade de *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 4 pmol de cada primer (Tabela 1) e 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), tendo a amostra um volume final de 20 µL cada. O programa utilizado no mesmo termociclador consistiu inicialmente de uma etapa de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C de 30 segundos (s), 56°C de 30 s, e 72°C de 45 s; e uma finalização a 72°C por 10 min para extensão final da fita.

Posteriormente as amostras amplificadas foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) 5%, corado com nitrato de prata para confirmação da amplificação.

Tabela 1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos pares de *primers* equinos

Par de <i>primers</i> F: Forward (5' – 3') R: Reverse (5' – 3')	Região de anelamento do <i>primer</i>	Condições para PCR	Produto da PCR
F: CAGGGAACAAGTTTCTCAAAT R: TGCTCCACAATGAATCTCG	Promotor da <i>MSTN</i> (Dall'Olio et al., 2010) 484 pb***	58/1.5/45*	PCR-RFLP Integrated DNA Technologies (IDT)**
F: GCCATCTATTTGCATGTTCTTG R: GGCAAGTTCATAGGCTGGTTC	SNP BIEC2-808543 (Metzger et al., 2013) 347 pb***	62/2/40*	PCR-RFLP Invitrogen by Life Technologies TM **

*Temperatura de anelamento (°C) / concentração de MgCl₂/ tempo de extensão da fita (segundos)

**Empresa especializada responsável pela síntese dos *primers*

***Tamanho do fragmento amplificado (pares de bases – pb)

3.2.4 Análise de PCR-RFLP

Os fragmentos amplificados foram clivados com a endonuclease específica através de uma técnica denominada PCR-RFLP (do inglês: *PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism*), as reações foram realizadas conforme as recomendações do fabricante de cada enzima em um volume final de 10 µL cada.

O produto da PCR do gene *LCORL* foi encubado em banho-maria a 65°C por 8 horas utilizando a enzima de restrição *BsrI* (BioLabs Inc., New England), que posteriormente foi inativada a 80°C por 20 min. O amplificado do gene *MSTN* foi deixado *overnight* em banho-maria a 37°C para que ocorresse a digestão pela endonuclease *AfaI* (InvitrogenTM Life Technologies), que posteriormente foi inativada a 65°C por 20 min (Tabela 2). Após a digestão, os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 5% e corado com nitrato de prata para genotipagem dos animais.

Tabela 2. Sítios de corte das enzimas de restrição e padrão de corte para genotipagem

Gene	Endonuclease	Sítio de corte	Tamanho do fragmento (pb)		
			Amplificado (PCR)	Alelo T	Alelo C
<i>LCORL</i> (NC_009146)* SNP BIEC2-808543 (105.547.002)**	<i>BsrI</i>	5'ACTGGN↓3' 3'TGAC↓CN5'	347 pb	235 / 57 / 55	292 / 55
<i>MSTN</i> (AY840554.2)* SNP g.26T>C	<i>AfaI</i>	5'GT↓AC3' 3'CA↓TG5'	484 pb	484	437 / 47

*Acesso da sequência gênica no *GeneBank* (Banco de dados internacional)

**Posição do polimorfismo no cromossomo ECA3

3.2.5 Sequenciamento

Os produtos de PCR do gene *LCORL* obtidos de amostras de DNA de dois animais com padrão de corte contrastantes evidenciados pela técnica de PCR-RFLP para o SNP BIEC2-808543, foram enviados para sequenciamento de acordo com a técnica de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977) na empresa (*Macrogen INC, Seul Korea*: <http://www.macrogen.com/eng/>). Os eletroferogramas gerados foram editados e após a edição as sequências foram comparadas entre si por intermédio do programa *ChromasPro version 2.4*. As sequências editadas foram alinhadas com a sequência NC_009146 depositada no *GenBank*, utilizando o programa *Clustal W2* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

As variações observadas entre as sequências geradas foram diferenciadas quanto a possibilidade de utilização da mesma endonuclease de restrição utilizada para identificação de outros sítios de corte, com o auxílio dos programas *Restriction Mapper version 3* e *Webcutter 2.0* (disponível em www.restrictionmapper.org e <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

3.3 Análise Estatística

A estrutura geral dos modelos de crescimento foi $Y_t = \mu_{Y_t} + e_t$, para $Y_t \sim Normal(\mu_{Y_t}, \sigma_{Y_t}^2)$, ou seja, foi assumida distribuição normal para variável Y_t com funções de média e variância μ_{Y_t} e $\sigma_{Y_t}^2$, respectivamente, como explicito na tabela 3.

Tabela 3. Modelos não-lineares de crescimento utilizado no estudo

Modelos	Equação
Brody (1945)	$\mu_{Y_t} = Y_f - b \exp(-kt)$
Gompertz (Winsor, 1932)	$\mu_{Y_t} = Y_f \exp\{-b[\exp(-kt)]\}$
Logístico (Pear & Reed, 1923)	$\mu_{Y_t} = Y_f / \{1 + b[\exp(-kt)]\}$
Von Bertalanffy (1957)	$\mu_{Y_t} = Y_f \{1 - b[\exp(-kt)]\}^3$
Michaelis-Menten (López et al., 2000)	$\mu_{Y_t} = (bK^n + Y_f t^n) / (K^n + t^n)$
Richards (1959)	$\mu_{Y_t} = bY_f / [b^m + (Y_f^m - b^m) \exp(-kt)]^{1/m}$

Não foram introduzidos efeitos aleatórios nos modelos, exceto o termo do erro que foi assumido como independentemente distribuído, $e_t \sim Normal(0, \sigma_{Y_t}^2)$. As equações apresentadas representam os modelos de Brody (1945), Gompertz (Winsor, 1932), Logístico (Ratkowski, 1983), Von Bertalanffy (1957), Michaelis-Menten generalizado (López et al., 2000) e Richards (1959) respectivamente. Para todos os modelos apresentados, o parâmetro Y_f representa o peso do animal, altura na cernelha ou altura na garupa a maturidade, e o parâmetro k a taxa de maturidade, ou velocidade de crescimento e o b é um parâmetro de escala. Para equação de Generalized Michaelis-Menten, o parâmetro K representa o tempo (dias) no qual é atingida metade do tamanho adulto; e o n é um parâmetro de escala, adimensional. Para equação de Richards, o m é um parâmetro adimensional que escala o crescimento aos processos metabólicos.

A suposição convencional de homocedasticidade foi desafiada com uso do procedimento NLMIXED do software SAS (v.9, SAS Systems, Inc., Cary, NC, USA). Foram feitas tentativas para corrigir a heterogeneidade de variância ao longo do tempo na estimativa do parâmetro não-linear (Matis & Hartley 1971; Bard 1974; Rocha, et al. 2015). Assim, a variância foi modelada como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Variâncias

Modelo de Variância	Equação
Homogênea	$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma^2$
Exponencial	$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma_0^2 \exp(ct)$
Assintótica	$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma_0^2 + \sigma_b^2 [1 - \exp(-st)]$
Escalonada	$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma^2 (\mu_{Y_t})^{2\psi}$

No qual σ^2 é a variância homogênea residual, como mostrado pela equação (7) ($\sigma_{Y_t}^2 = \sigma^2$). A variância exponencial ou equação (8) contém a variância residual inicial ($\sigma_{Y_t}^2 = \sigma_0^2$), associada com a variável (peso vivo, altura de cernelha ou altura de garupa) ao nascimento ($t = 0$), no qual aumenta de forma exponencial durante o crescimento a uma taxa ($1/d$). A equação 9 descreve uma variância assintoticamente crescente, em que $\sigma_{Y_t}^2 = \sigma_0^2$ como a variância relacionada ao nascimento, σ_b^2 é o aumento na variância assintótica ao longo do tempo, e s ($1/d$)

representa a taxa de aumento de primeira ordem em $\sigma_{Y_t}^2$. A equação 10 representa a variância residual escalonada por uma função exponencial (ψ) em função da média esperada, μ_{Y_t} .

3.3.1 Procedimento estatístico

Os modelos foram ajustados para os dados de crescimento utilizando o procedimento NLMIXED do software SAS (v.9, SAS Systems, Inc., Cary, NC, USA). A informação do critério de Akaike (Akaike, 1974) é uma saída do procedimento NLMIXED. Portanto, os critérios de verossimilhança derivados foram calculados para estabelecer um quadro de seleção do melhor modelo (Burnham & Anderson 2004; Vieira et al. 2012). Os genótipos (TT, TC e CC) foram utilizados como efeitos fixos nos modelos. Matricialmente, este modelo pode ser especificado como segue:

$$\mu_{Y_t} = \begin{bmatrix} \theta_{1_1} \\ \theta_{2_1} \\ \theta_{3_1} \\ \theta_{4_1} \\ \vdots \\ \theta_{4_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} w_1\alpha_{11} + w_2\alpha_{12} + w_3\alpha_{13} \\ w_1\alpha_{21} + w_2\alpha_{22} + w_3\alpha_{23} \\ w_1\alpha_{31} + w_2\alpha_{32} + w_3\alpha_{33} \\ w_1\alpha_{41} + w_2\alpha_{42} + w_3\alpha_{43} \\ \vdots \\ w_1\alpha_{41} + w_2\alpha_{42} + w_3\alpha_{43} \end{bmatrix}$$

Se os modelos possuírem 4 parâmetros, caso contrário será utilizado apenas até θ_3 . Os parâmetros foram atribuídos ao efeito fixo de polimorfismo (α_p). Para a variável indicadora w são atribuídos os valores zero ou um para produzir o nível desejado para cada um dos fatores que afetam os parâmetros dependendo de cada i . Por exemplo, o peso assintótico (Y_f) para a população de indivíduos com polimorfismo TT (na equação (1)), será igual a seguinte combinação linear: $\theta_{1_1} = 1\alpha_{11} + 0\alpha_{12} + 0\alpha_{13}$. A taxa de crescimento (k) para a população com polimorfismo CC (na equação (1)) será igual a seguinte combinação linear: $\theta_{2_3} = 0\alpha_{21} + 0\alpha_{22} + 1\alpha_{23}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos Fragmentos por PCR Convencional e Digestão por Enzimas de Restrição

4.1.1 *MSTN* (GDF-8)

Por intermédio dos primers descritos por Dall'Olio et al. (2010) foi amplificado um fragmento de 484 pares de base (pb), referente a região promotora do gene *MSTN*, de 170 amostras de DNA genômico de cavalos da raça BH. Quando submetidas a digestão por endonucleases nenhuma das amostras apresentou sítio de corte para a enzima *AfaI* (sítio de reconhecimento GT↓AC) logo, todos os animais possuem o genótipo TT (Figura 1), ou seja, na população em estudo o alelo T está fixado.

Esse resultado não era esperado visto que Dall'Olio et al. (2010) relata a existência de maior frequência do alelo T nas raças mais leves do que nas raças mais pesadas, sendo as raças Sela Italiana e Puro Sangue, formadoras da raça BH. Assim, havia uma grande expectativa de que ambos os alelos (T/C) estivessem presentes na população. Embora outros polimorfismos no gene *MSTN* tenham sido apresentados em diversos trabalhos, o polimorfismo GQ193900:g.26T>C utilizado no presente estudo foi selecionado por esta associado com a variabilidade de características morfométricas importantes como o perímetro da canela e comprimento da perna e possivelmente com a variação da composição muscular corporal desses animais, segundo Dall'Olio et al. (2014).

Como o polimorfismo foi descrito em raças formadoras da raça Brasileiro de Hipismo e segundo Dias et al. (2000) trata-se de uma raça em formação, acreditamos que o fato do alelo T está fixado na população em estudo se deve provavelmente ao efeito fundador, que é um fenômeno evolucionista que foi descrito por Mayr (1963) como sendo o estabelecimento de uma nova população a partir de poucos fundadores originais, que contém somente uma pequena fração da variação gênica total da população parental, ou seja uma amostra limitada de alelos estarão presentes na população fundada e nas próximas gerações os quais são uma pequena amostra da variação genética total encontrada nas raças formadoras, afetando a constituição genética dessa raça diminuindo assim sua variabilidade.

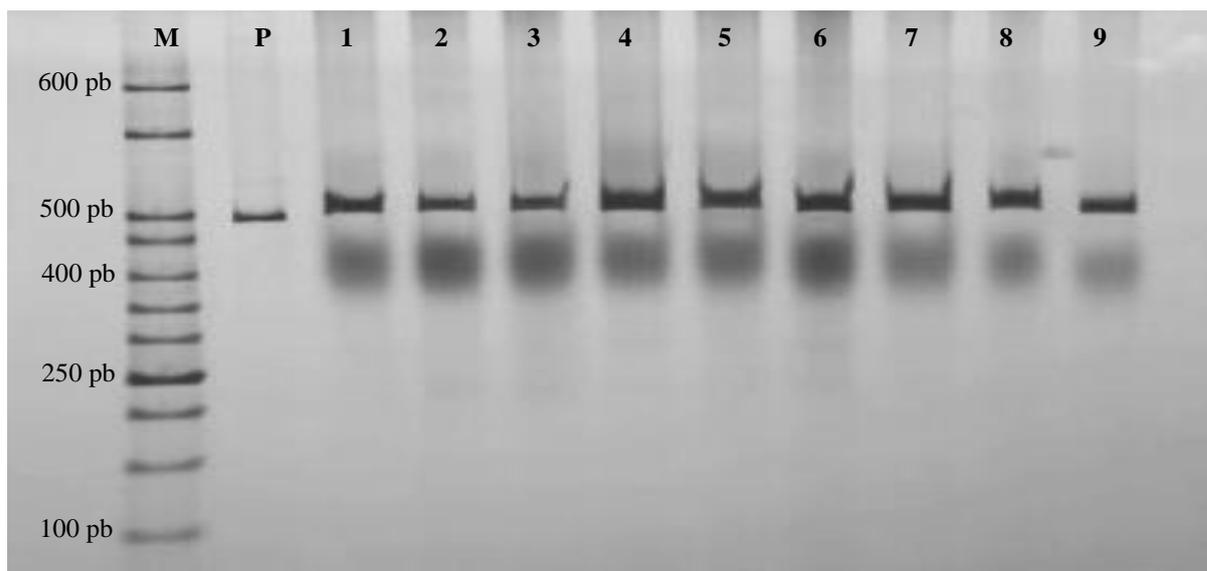


Figura 1. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, M = Marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb), P = Fragmento de 484 pb amplificado por PCR sem digestão, correspondente a região promotora do gene *MSTN* (PCR), canaletas de 1 a 9 = fragmentos sem corte após a reação de digestão com a enzima *AfaI* (PCR-RFLP), genótipo TT

4.1.2 *LCORL*

Dispondo dos primers descrito por Metzger et al. (2013) efetuou-se à amplificação de um fragmento de 347 pares de base (pb), de 161 amostras de DNA genômico de equinos, concernente ao SNP BIEC2-808543, localizado na região que antecede o gene *LCORL*. Ao submeter os fragmentos à digestão com a enzima *BsrI* (sítio de reconhecimento ACTGGN↓), constatou-se distintos padrões de corte. Foram identificados os genótipos homozigotos TT, o qual apresentou três fragmentos de 235, 57 e 55 pb e CC com dois fragmentos de 292 e 55 pb. O genótipo heterozigoto TC apresentou ambos padrões de corte, identificado pelo aparecimento de quatro fragmentos: 292, 235, 57 e 55 pares de bases, como pode ser observado na figura 2. Na população em estudo encontrasse em equilíbrio e a frequência alélica encontrada foi de 0,21 e 0,79, para os alelos T e C, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Frequências referentes ao SNP BIEC2-808543 em equinos da raça BH

N total	N°	Genótipo	Frequência genotípica	Frequência Alélica		HWE
				Alelo T	Alelo C	Teste χ^2 *
	14	TT	0,09			
161	40	TC	0,25	0,21	0,79	p > 0,05
	107	CC	0,66			

*Teste χ^2 : *Hardy-Weinberg equilibrium* (HWE) – valor χ^2 (p > 0,05 indica equilíbrio e p < 0,05 indica desequilíbrio)

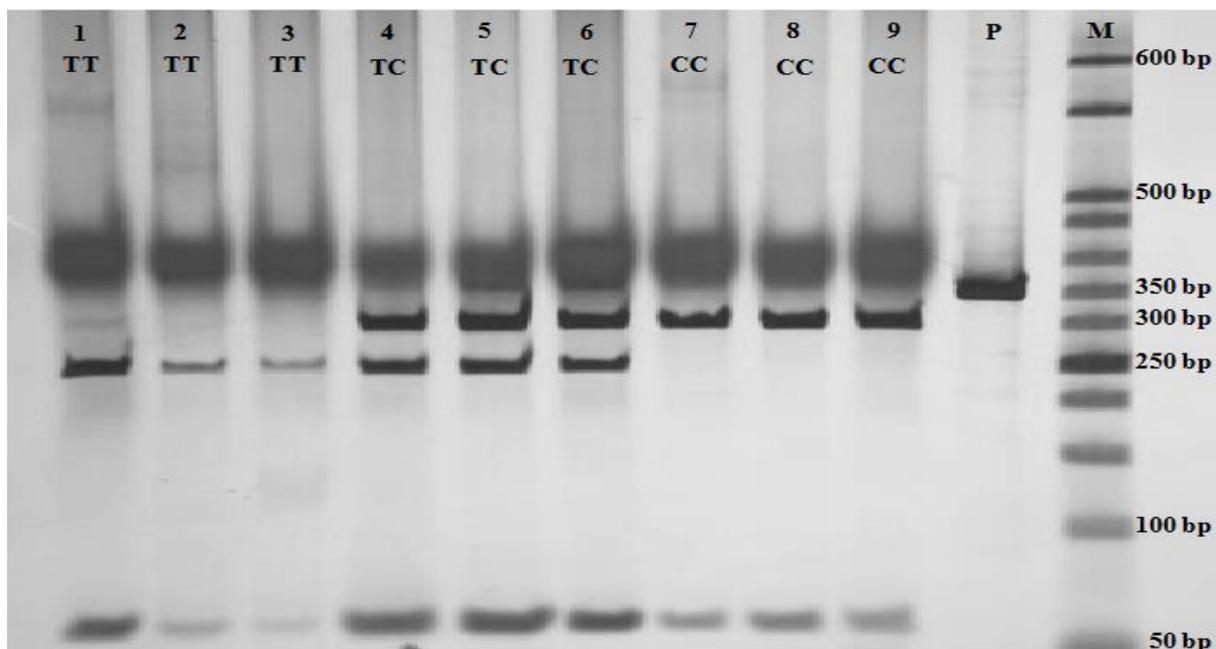


Figura 2. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. Canaletas de 1 a 9 = Fragmentos amplificados de 347 pares de base (pb) correspondentes ao SNP BIEC2-808543 *upstream* ao gene *LCORL* após digestão com a enzima *BsrI* (PCR-RFLP), canaletas 1 a 3 = genótipo TT (fragmentos de 235 pb, 57 pb e 55 pb), canaletas 4 a 6 = genótipo TC (fragmentos de 292 pb, 235 pb, 57pb e 55 pb), canaletas 7 a 9 = genótipo CC (fragmentos de 292 pb e 55 pb), P = Fragmento amplificado de 347 pb sem ter sido submetido à digestão, M= Marcador de peso molecular de 50 pb

A metodologia usada para avaliar o genótipo dos animais no presente estudo foi obtida de Metzger et al. (2013). A maioria das amostras seguiu o padrão esperado descrito pelos autores, entretanto, algumas amostras não seguiram o padrão de corte esperado e duas delas foram enviadas para sequenciamento. Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento automático evidenciaram outro polimorfismo identificado nas nossas amostras (raça BH). Uma das amostras sequenciada apresentava o padrão de corte esperado e a outra não, correspondendo às amostras de número 209 e 861 respectivamente (Figura 3). Na figura 4 este novo polimorfismo pode ser observado, o mesmo foi destacado em negrito e a região de corte pela enzima de restrição encontra-se sublinhada. A variação é referente a uma transição G/A, identificada simplesmente como R, de “puRina”, a qual insere um sítio de corte para a enzima de restrição *BsrI*. O polimorfismo descrito por Metzger et al., (2013) foi observado (Figura 5).

```

          CLUSTAL 2,1 alinhamento de sequências múltiplas

209      -----TGCATGTTCTTGAGAGAAACCAAATTTGCCTGGCTAGAGAAGCATTC|CAG 50
861      GCCATCTATTTGCATGTTCTTGAGAGAAACCAAATTTGCCTGGCTAGAGAAGCATTC|CAG 60
NC009146 GCCATCTATTTGCATGTTCTTGAGAGAAACCAAATTTGCCTGGCTAGAGAAGCATTC|CAG 60
          *****
209      YTTATTTCTGTACCCCAAAGGCAGAATCACAGGGAACACAATAGTGCAAACCTTAAATGAC 110
861      YTTATTTCTGTACCCCAAAGGCAGAATCACAGGGAACACAATAGTGCAAACCTTAAATGAC 120
NC009146 TTTATTTCTGTACCCCAAAGGCAGAATCACAGGGAACACAATAGTGCAAACCTTAAATGAC 120
          *****
209      AACCTCTACAAAGAATATTCCTCTCTCAACTCTCCTCTCTCTATGCTATCCGGTCAAAGC 170
861      AACCTCTACAAAGAATATTCCTCTCTCAACTCTCCTCTCTCTATGCTATCCRGTCAAAGC 180
NC009146 AACCTCTACAAAGAATATTCCTCTCTCAACTCTCCTCTCTCTATGCTATCCGGTCAAAGC 180
          *****
209      CAGAGGTGGAGAGTACCTATATGTTAATGCGTTGAATATATTAATAACAAACATTTGTTT 230
861      CAGAGGTGGAGAGTACCTATATGTTAATGCGTTGAATATATTAATAACAAACATTTGTTT 240
NC009146 CAGAGGTGGAGAGTACCTATATGTTAATGCGTTGAATATATTAATAACAAACATTTGTTT 240
          *****
209      TGAACTCCATTTTAAATTAGCAATGAGACTTTTCAGATGGAGAGCTCACTGGA|AGCCTGTG 290
861      TGAACTCCATTTTAAATTAGCAATGAGACTTTTCAGATGGAGAGCTCACTGGA|AGCCTGTG 300
NC009146 TGAACTCCATTTTAAATTAGCAATGAGACTTTTCAGATGGAGAGCTCACTGGA|AGCCTGTG 300
          *****
209      TTTGTGAACAATGTTGGTTAATCATTGAACCAGCCT----- 326
861      TTTGTGAACAATGTTGGTTAATCATTGAACCAGCCT----- 336
NC009146 TTTGTGAACAATGTTGGTTAATCATTGAACCAGCCTATGAACCTTGCC 347
          *****

```

Figura 3. Resultado do alinhamento entre as sequências da região gênica do SNP BIEC2-808543 de equino, nº de acesso no *GenBank* (NC009146). 209 e 861 referem-se as amostras da mesma região para a raça Brasileiro de Hipismo. O SNP BIEC2-808543 T/C está identificado pela letra Y, de pirimidina (do inglês: “*pYrimidine*”) e a variação referente transição G/A está identificada pela letra R, de “*puRina*”, ambos destacados em negrito. O novo sítio de corte ocorre toda vez que a adenina (A) está presente no fragmento. Os sítios de corte da endonuclease *BsrI* estão sublinhados. As letras A, T, C e G correspondem às bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina respectivamente

Este “novo” polimorfismo pôde ser constatado nos eletroferogramas enviados pela empresa *Macrogen* (Figura 4), cujos picos menores e sobrepostos de dois nucleotídeos ao mesmo tempo indicam um indivíduo heterozigoto. Análises de associação estatísticas precisam ser realizadas para confirmar se esta variação apresenta algum efeito sobre perfis de crescimento.

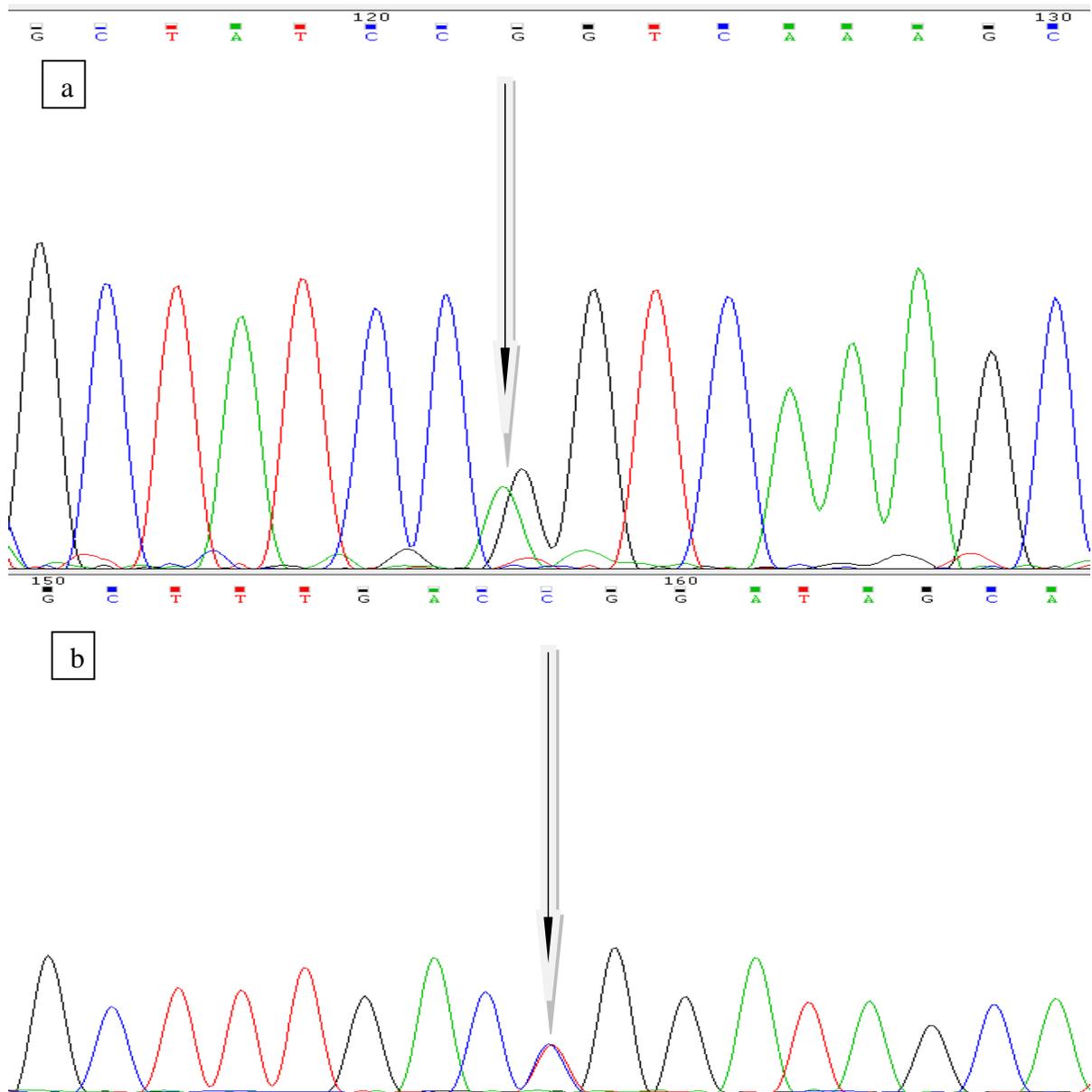


Figura 4. Eletroferogramas mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al., 1977 do fragmento amplificado pelo par de primers correspondentes a região antecedente ao gene *LCORL*. Cada base é representada por uma cor: A= Verde, G= Preto, C= Azul e T=Vermelho. Os dois gráficos correspondem a mesma amostra (amostra 861). O eletroferograma (a) corresponde ao fragmento amplificado pelo *primer-F* (direto, do inglês *forward*) e o (b) pelo *primer-R* reverso (do inglês: *reverse*). O novo SNP G/A encontrado está sinalizado pela seta

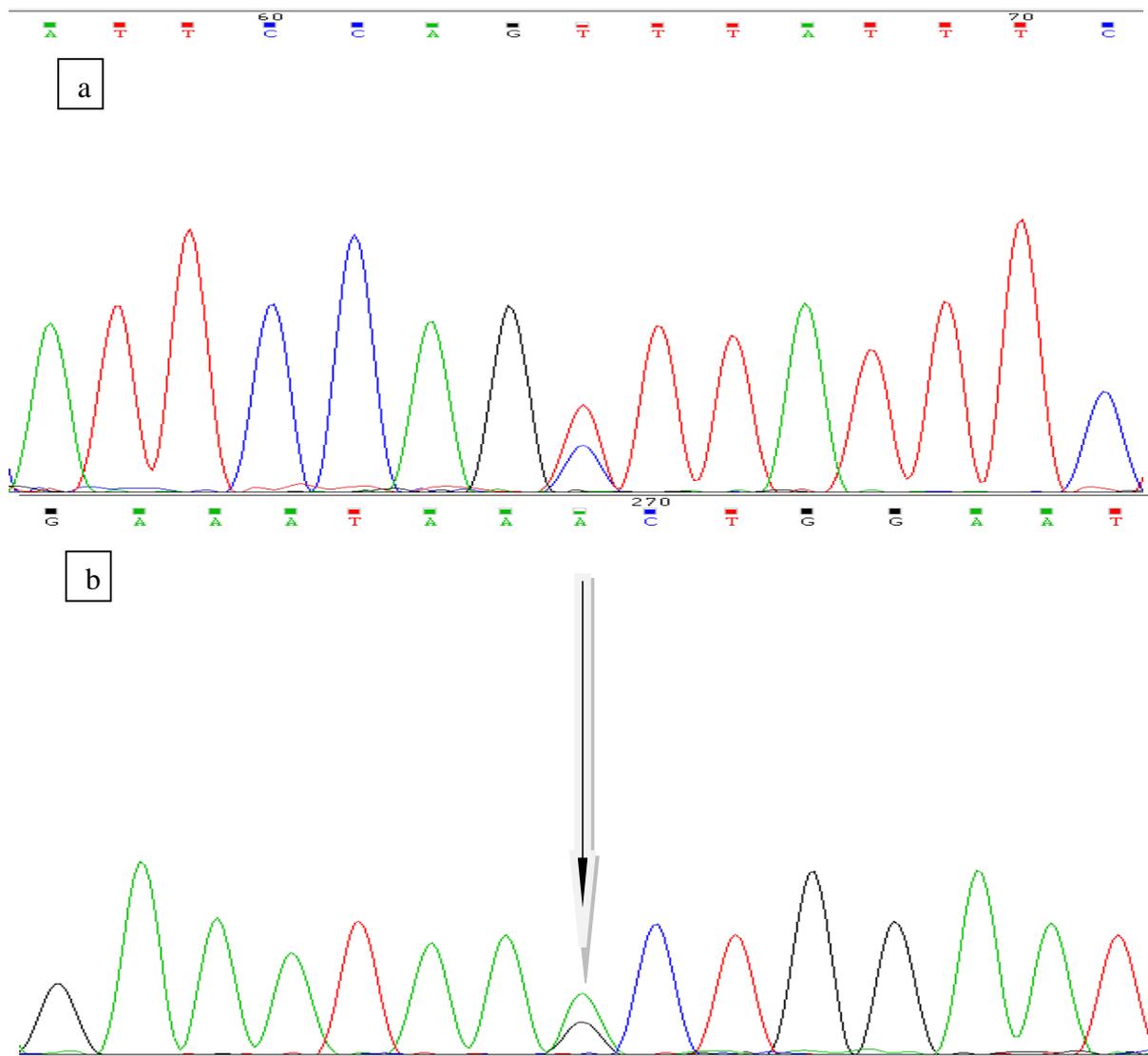


Figura 5. Eletroferogramas mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al., 1977 do fragmento amplificado pelo par de primers correspondentes a região antecedente ao gene *LCORL*. Cada base é representada por uma cor: A= Verde, G= Preto, C= Azul e T=Vermelho. O gráfico corresponde a amostra 861 evidenciando o polimorfismo já descrito. O eletroferograma (a) corresponde ao fragmento amplificado pelo *primer-F* (direto, do inglês *forward*) e o (b) pelo *primer-R* reverso (do inglês: *reverse*). O SNP BIEC2-808543 T/C encontrado está sinalizado pela seta

O início da transcrição pela RNA polimerase II requer a participação de vários fatores de transcrição basais que precisam interagir com promotores nas sequências gênicas corretas para iniciar a transcrição, sendo que o fator de transcrição D da RNA polimerase II (TFIID) é um dos primeiros fatores de transcrição basal a interagir com o promotor (Snustad e Simmons 2003). Embora a estrutura do cerne do promotor, onde os fatores basais se ligam, tenha sido inicialmente entendido como invariável entre os genes transcritos pela RNA polimerase II, não é o que se observa em muitos estudos, conforme pode ser constatado na revisão realizada por Smale e Kadonaga (2003) sobre a diversidade estrutural e funcional do cerne do promotor. Segundo Metzger et al. (2013) o SNP BIEC2-808543 modifica um sítio de ligação para o TFIID, resultando em menor expressão do gene *LCORL*. O polimorfismo T/C está situado em

uma região TATA, onde o alelo T possibilitaria a ancoragem do TFIID, ao contrário do alelo C que poderia possivelmente modificar este sítio de ligação dificultando seu reconhecimento pela TFIID.

Palijan et al. (2009) ao estudarem linhagem de células humana provenientes de câncer de mama (MCF-7), verificaram que a proteína codificada pelo gene *LCORL* atua como atenuador da transcrição de genes regulados por progesterona. Entretanto os autores discutem que devido aos seus múltiplos domínios, a proteína LCOR também pode atuar no aumento da transcrição de alguns genes. Song et al. (2012) encontraram que o *LCOR* atua um corepressor de receptor de hormônio da tireóide e reprime a lipogênese hepática em ratos. A sequência do gene *LCORL* é semelhante ao *LCOR* e foi anotado no Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – Acesso: NC_009146), como gene que codifica um fator de transcrição que parecer ter função na espermatogênese, embora polimorfismos neste gene estejam associados com medida do porte esquelético e peso adulto. Além disso, *splicing* alternativo resulta em múltiplos transcritos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> / IEB / Research / Assembly / av . cgi?db = human&c = Gene &l = LCORL), entretanto, a função deste gene ainda é incerta.

4.2 Influência do SNP BIEC2-808543 Sobre os Perfis das Curvas de Crescimento

Ajustados os modelos não-lineares mistos provenientes da associação dos modelos simples de Brody (1945), Gompertz (Winsor, 1932), Logístico (Ratkowski, 1983), Von Bertalanffy (1957), Michaelis-Menten generalizado (López et al., 2000) e Richards (1959); com as variâncias homogênea, exponencial, assintótica e escalonada; selecionou-se o modelo que melhor descreve o perfil de crescimento para cada uma das características conformacionais avaliadas baseando-se pelo critério de akaike, que possibilita o ranqueamento dos modelos do melhor para o pior. As metodologias tradicionais partem do pressuposto que há uma variância homogênea, ou seja, ocorre a mesma variância ao longo de toda a curva de crescimento, entretanto essa pode não ser uma verdade, por isso os modelos mistos podem descrever melhor o perfil sigmoide do crescimento entretanto, de acordo com Rocha et al., 2015 embora cada modelo, tenha sua particularidade, com algumas variações com relação à interpretação e conteúdo, os modelos não-lineares possuem alguns parâmetros em comum, passíveis de associar significado biológico, onde: μ_{yt} corresponde a característica conformacional na idade t (tempo); Y_f é a característica conformacional assintótica, quando t tende a mais infinito, ou seja, esse parâmetro é interpretado como a característica a maturidade; b é uma constante, sem interpretação biológica definida, relacionada às características morfológicas iniciais do animal, que influencia o formato da curva; k é descrito como a taxa de crescimento, isto é, a velocidade com que se aproxima do seu tamanho à maturidade; e , m que é o pontos de inflexão da curva, sendo esse parâmetro responsável por modelar a curva, determinando o formato que a mesma terá.

Selecionado o melhor modelo para cada uma das características avaliadas, observamos no presente estudo que o aumento da complexidade do modelo resultou em piora no ajuste do mesmo às variáveis avaliadas. Em seguida foi analisado o efeito do SNP BIEC2-808543 sobre os parâmetros das curvas de crescimento e conseqüentemente sobre o seu perfil. Visto que na literatura existem diversos trabalhos associando esse polimorfismo a altura em cavalos de diferentes raças (Signer-Hasler et al., 2012; Metzger et al., 2013; Tetens et al., 2015). Constatou-se que há influência do polimorfismo sobre os parâmetros Y_f (variável à maturidade), K (taxa de crescimento) e b (constante, sem interpretação biológica definida, relacionada às características morfológicas iniciais do animal) dos modelos não-lineares, com exceção da

variável altura na cernelha que não apresentou efeito do polimorfismo sobre o parâmetro b do modelo.

4.2.1 Variável massa corporal

O modelo misto que melhor descreve a curva de crescimento para a variável massa corporal é oriundo da associação entre o modelo de Brody (1945) com a variância escalonada, que é ponderada de acordo com o peso vivo atual do animal. Esse foi o melhor modelo pois foi o que melhor se ajustou a todos os critérios de Akaike (Tabelas 6 e 7). Entretanto podemos observar que os modelos de Richard e Von-Bertalanffy (ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b), ambos associados a variância escalonada, são muito semelhantes ao modelo selecionado, sendo assim também passíveis de serem selecionados para descrição desta variável.

McManus et al. (2010) ao testar cinco modelos não lineares simples (Brody, Richards, Gompertz, Logístico e Weibull) para descrição da curva de crescimento da variável massa corporal em cavalos das raças Hanoveriana (HA), Brasileiro de Hipismo (BH), Puro Sangue Inglês (PSI) e mestiços (PSIxBH), criados pelo Exército Brasileiro recomendam, assim como neste estudo, o modelo de Brody para a descrição da curva de crescimento. Entretanto os mesmos autores observaram que os modelos de Brody e Weibull se ajustaram de forma similar para esta variável, sendo o modelo de Brody recomendado como o melhor, por possuir menos parâmetros. Essa similaridade não foi observada por Santos et al. (2007) que ao utilizar os mesmos cinco modelos, selecionando os que apresentaram menor erro médio quadrático combinado, recomenda o modelo de Weibull como o melhor para descrição da curva de crescimento para esta variável em cavalos da raça Pantaneiro criados à pastos. Contudo em nenhum dos trabalhos foram feitas tentativas para corrigir a heterogeneidade de variância ao longo do tempo, com a utilização de modelos mistos como no presente estudo.

Tabela 6. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável massa corporal em equinos da raça Brasileiro de Hipismo

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Brody	Escalonada	1432,8	0	0,392	1,0E+00
Richard	Escalonada	1433,8	1	0,238	1,6E+00
Von Bertalanffy – b	Escalonada	1433,9	1,1	0,226	1,7E+00

¹ Informação do critério de Akaike.

² Delta.

³ Probabilidade de Verossimilhança.

⁴ Razão de evidência.

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b.

Tabela 7. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável massa corporal em equinos da raça Brasileiro de Hipismo (continua)

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Brody	Assintótico	1437,3	4,5	0,041	9,5E+00
Von Bertalanffy	Escalonada	1437,8	5,0	0,032	1,2E+01
Richard	Assintótica	1438,0	5,2	0,029	1,3E+01
Von Bertalanffy – b	Assintótica	1438,0	5,2	0,029	1,3E+01
Gompertz – b	Escalonada	1441,2	8,4	0,006	6,7E+01
Von Bertalanffy	Assintótica	1442,1	9,3	0,004	1,0E+02
Gompertz	Escalonada	1445,2	12,4	0,001	4,9E+02
Gompertz – b	Assintótica	1445,8	13,0	0,001	6,7E+02
Brody – b	Escalonada	1446,2	13,4	0,000	8,1E+02
Lopez	Escalonada	1446,9	14,1	0,000	1,2E+03
Richard – b	Escalonada	1449,3	16,5	0,000	3,8E+03
Gompertz	Assintótica	1450,0	17,2	0,000	5,4E+03
Richard – b	Assintótica	1450,6	17,8	0,000	7,3E+03
Brody – b	Assintótica	1451,1	18,3	0,000	9,4E+03
Lopez	Assintótica	1452,8	20,0	0,000	2,2E+04
Von Bertalanffy – b	Exponencial	1453,0	20,2	0,000	2,4E+04
Richard	Exponencial	1454,6	21,8	0,000	5,4E+04
Brody	Exponencial	1455,7	22,9	0,000	9,4E+04
Von Bertalanffy	Exponencial	1456,7	23,9	0,000	1,5E+05
Logístico – b	Escalonada	1458,1	25,3	0,000	3,1E+05
Gompertz – b	Exponencial	1460,4	27,6	0,000	9,8E+05
Lopez – b	Escalonada	1461,4	28,6	0,000	1,6E+06
Logístico	Escalonada	1462,0	29,2	0,000	2,2E+06
Richard – b	Exponencial	1463,4	30,6	0,000	4,4E+06
Logístico – b	Assintótica	1463,8	31,0	0,000	5,4E+06
Gompertz	Exponencial	1464,0	31,2	0,000	6,0E+06
Lopez – b	Assintótica	1464,0	31,2	0,000	6,0E+06
Brody – b	Exponencial	1467,1	34,3	0,000	2,8E+07
Logístico	Assintótica	1468,0	35,2	0,000	4,4E+07
Lopez	Exponencial	1473,1	40,3	0,000	5,6E+08
Logístico – b	Exponencial	1478,1	45,3	0,000	6,9E+09
Lopez – b	Exponencial	1480,1	47,3	0,000	1,9E+10
Logístico	Exponencial	1481,5	48,7	0,000	3,8E+10
Von Bertalanffy – b	Homogênea	1590,1	157,3	0,000	1,4E+34
Gompertz – b	Homogênea	1592,1	159,3	0,000	3,9E+34
Von Bertalanffy	Homogênea	1594,3	161,5	0,000	1,2E+35
Richard – b	Homogênea	1595,2	162,4	0,000	1,8E+35
Gompertz	Homogênea	1596,1	163,3	0,000	2,9E+35
Richard	Homogênea	1596,5	163,7	0,000	3,5E+35
Logístico – b	Homogênea	1600,0	167,2	0,000	2,0E+36

Tabela 7. Continuação

Brody	Homogênea	1601,5	168,7	0,000	4,3E+36
Lopez – b	Homogênea	1602,8	170,0	0,000	8,2E+36
Logístico	Homogênea	1604,3	171,5	0,000	1,7E+37
Lopez	Homogênea	1604,8	172,0	0,000	2,2E+37
Brody – b	Homogênea	1628,8	196,0	0,000	3,6E+42

¹ Informação do critério de Akaike

² Delta

³ Probabilidade de Verossimilhança

⁴ Razão de evidência

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b

Após a escolha do modelo, foi avaliado se há influência do polimorfismo para cada parâmetro do modelo não-linear misto. Observou-se que há diferença nos perfis das curvas de crescimento para a característica massa corporal (Figura 6), confirmando a influência do SNP BIEC2-808543 sobre o perfil da curva para esta característica.

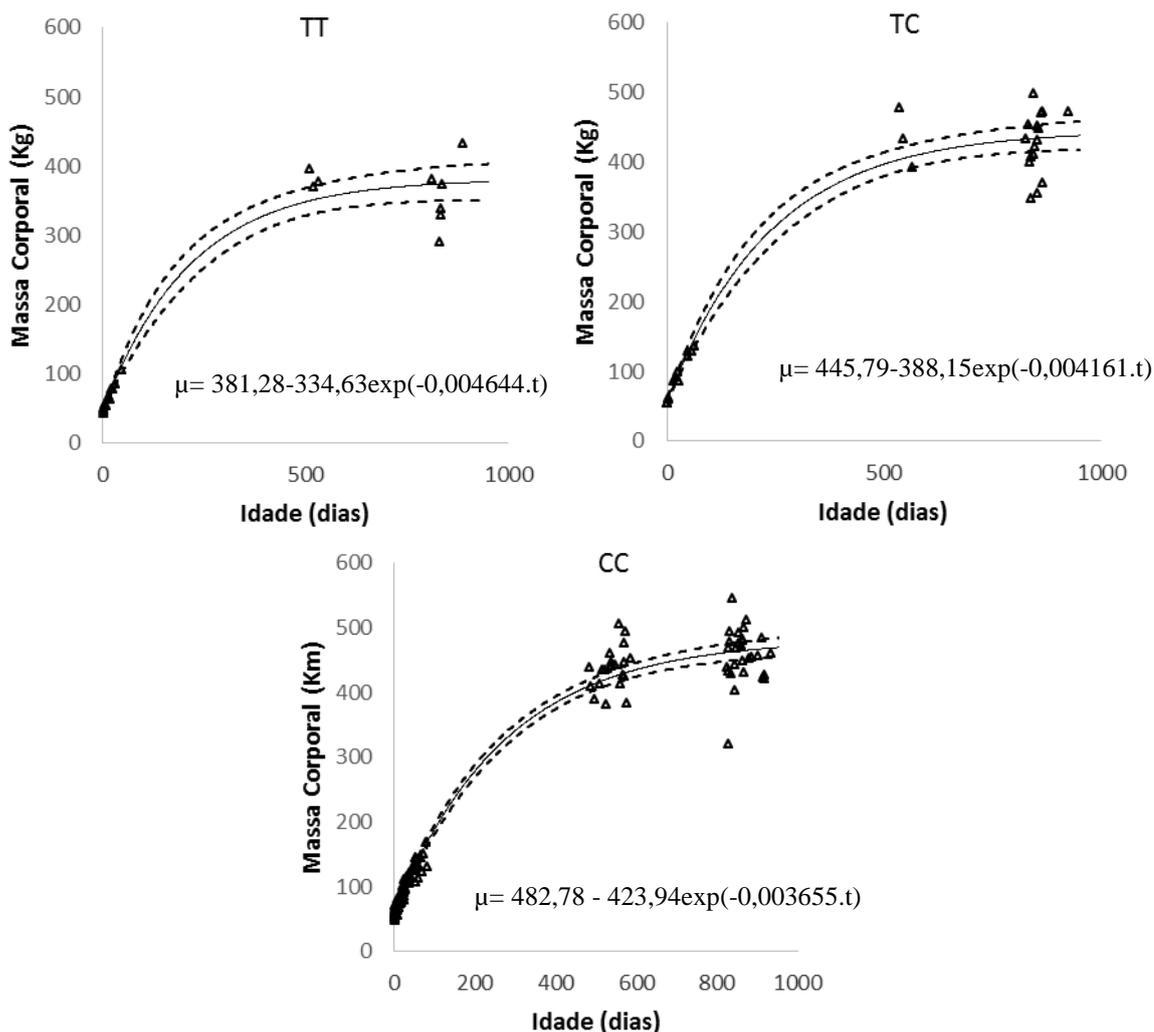


Figura 6. Dados observados (Δ), valores preditos (linha s3lida) e intervalos de confian3a 95% (linhas tracejadas) do massa corporal dos equinos da ra3a Brasileiro de Hipismo. Gr3fico a: gen3tipo TT, gr3fico b: gen3tipo TC, e gr3fico c: gen3tipo CC

De acordo com o par3metro Y_f , que prediz a massa corporal assint3tica a maturidade os animais com gen3tipo TT foram mais leves quando comparados com os que apresentaram os gen3tipos TC e CC ao n3vel de 5% de signific3ncia. N3o houve diferen3a significativa entre os gen3tipos TC e CC (Figura 7).

Massa Corporal Maturidade (Y_f)

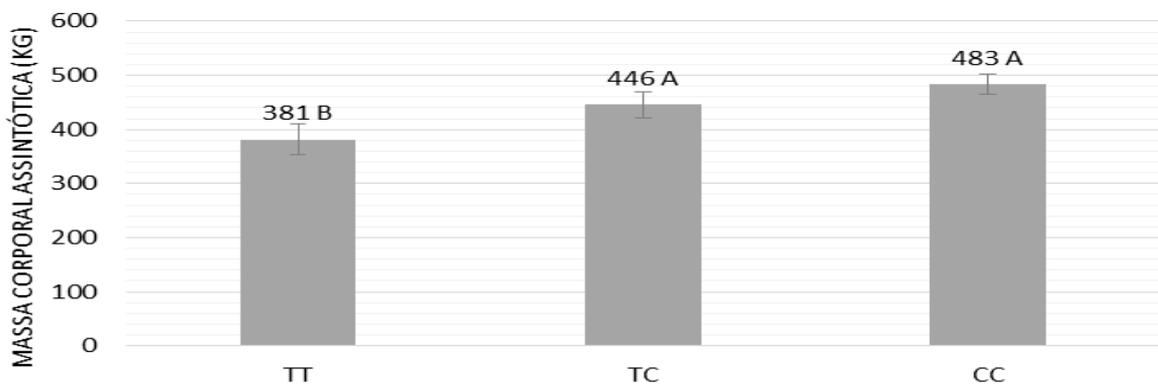


Figura 7. Massa corporal a maturidade para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo. Genótipo TT = yf_1 , genótipo TC = yf_2 e genótipo CC = yf_3

O modelo de Brody (1945) admite que a taxa de crescimento é inversamente proporcional à característica avaliada e a idade do indivíduo, entretanto apesar de observarmos essa inversa proporcionalidade, onde a taxa de crescimento dos menores animais (genótipo TT) é superior a taxa de crescimento animais heterozigotos (genótipo TC), que por sua vez é superior aos maiores animais (CC); essa diferença não foi significativa. (Figura 8).

Massa Corporal Taxa de Crescimento (k)

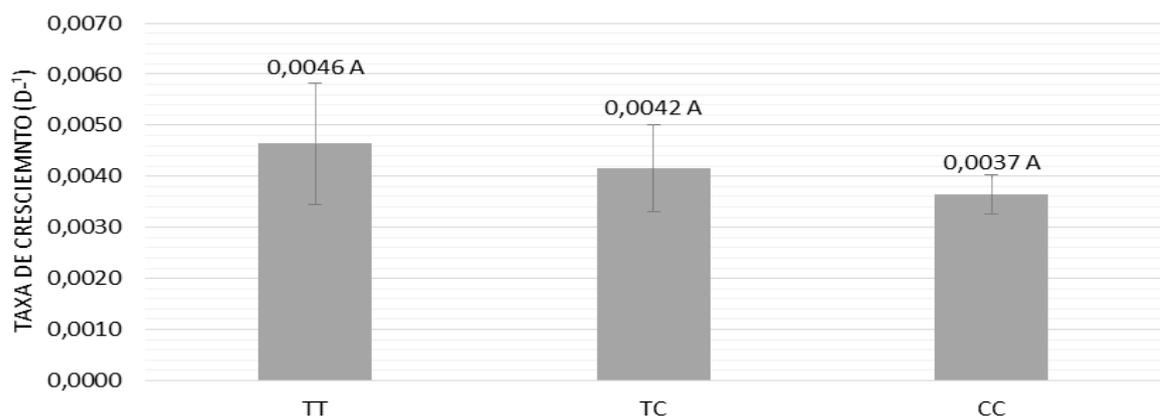


Figura 8. Taxa de crescimento referente a massa corporal para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k_1 , genótipo TC = k_2 e genótipo CC = k_3

4.2.2 Variável altura na cernelha (AC)

O modelo misto que melhor descreve a curva de crescimento para a variável altura na cernelha é o de Von Bertalanffy (1957) (ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b) associado com a variância assintótica, que é ponderada de acordo com o tempo, ou seja a variância vai aumentando ao longo do tempo até que se alcance um platô. Sendo este o modelo que melhor se ajustou a todos os critérios de Akaike (tabelas 8 e 9). Como podemos observar na tabela 8 os modelos pouco diferiram entre si o que realmente definiu o modelo que melhor descreve a variável AC foi a variância assintótica.

Diferindo do relatado por Santos et al. (1999) que recomendam o modelo de Weibull para descrição da curva de crescimento da variável altura na cernelha em cavalos pantaneiros e de Santos et al. (2007) que recomenda o modelo de Richard para a mesma variável utilizando a mesma raça. McManus et al. (2010) em estudos com cavalos do criatório do exército brasileiro, citam o modelo de Brody como o melhor para a descrição de crescimento desta variável. Essas diferenças na escolha do modelo provavelmente ocorreram por causa da número de animais e de observações em cada trabalho, pois todos os autores testaram os mesmos cinco modelos não-lineares simples: Brody, Richards, Gompertz, Logístico e Weibull, entretanto em nenhum dos trabalhos foram feitas tentativas para corrigir a heterogeneidade de variância ao longo do tempo.

Tabela 8. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça BH

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Von Bertalanffy – b ⁵	Assintótica	-541,3	0	0,118	1,0E+00
Gompertz - b	Assintótica	-541,2	0,1	0,112	1,1E+00
Brody - b	Assintótica	-541,0	0,3	0,102	1,2E+00
Logístico - b	Assintótica	-541,0	0,3	0,102	1,2E+00
Brody	Assintótica	-540,5	0,8	0,079	1,5E+00
Gompertz	Assintótica	-540,4	0,9	0,075	1,6E+00
Von Bertalanffy	Assintótica	-540,4	0,9	0,075	1,6E+00
Lopez	Homogênea	-540,3	1,0	0,072	1,6E+00

¹ Informação do critério de Akaike

² Delta

³ Probabilidade de Verossimilhança

⁴ Razão de evidência

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b

Tabela 9. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça BH.

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Lopez	Exponencial	-538,7	2,6	0,032	3,7E+00
Lopez	Assintótica	-538,0	3,3	0,023	5,2E+00
Brody - b	Homogênea	-537,5	3,8	0,018	6,7E+00
Brody	Homogênea	-537,4	3,9	0,017	7,0E+00
Von Bertalanffy - b	Homogênea	-537,2	4,1	0,015	7,8E+00
Von Bertalanffy	Homogênea	-537,0	4,3	0,014	8,6E+00
Gompertz - b	Homogênea	-537,0	4,3	0,014	8,6E+00
Gompertz	Homogênea	-536,8	4,5	0,012	9,5E+00
Logístico	Homogênea	-536,2	5,1	0,009	1,3E+01
Logístico - b ⁵	Homogênea	-536,2	5,1	0,009	1,3E+01
Von Bertalanffy - b	Escalonada	-536,1	5,2	0,009	1,3E+01
Brody	Escalonada	-536,0	5,3	0,008	1,4E+01
Brody - b	Escalonada	-536,0	5,3	0,008	1,4E+01
Gompertz - b	Escalonada	-535,9	5,4	0,008	1,5E+01
Von Bertalanffy	Escalonada	-535,6	5,7	0,007	1,7E+01
Gompertz	Escalonada	-535,5	5,8	0,007	1,8E+01
Logístico - b	Escalonada	-535,5	5,8	0,007	1,8E+01
Brody - b	Exponencial	-535,3	6,0	0,006	2,0E+01
Brody	Exponencial	-535,2	6,1	0,006	2,1E+01
Von Bertalanffy - b	Exponencial	-535,1	6,2	0,005	2,2E+01
Gompertz - b	Exponencial	-534,9	6,4	0,005	2,5E+01
Logístico	Escalonada	-534,9	6,4	0,005	2,5E+01
Von Bertalanffy	Exponencial	-534,8	6,5	0,005	2,6E+01
Gompertz	Exponencial	-534,6	6,7	0,004	2,9E+01
Logístico - b	Exponencial	-534,3	7,0	0,004	3,3E+01
Lopez - b	Homogênea	-534,2	7,1	0,003	3,5E+01
Logístico	Exponencial	-534,0	7,3	0,003	3,8E+01
Lopez - b	Exponencial	-532,5	8,8	0,001	8,1E+01
Lopez - b	Escalonada	-532,0	9,3	0,001	1,0E+02
Lopez	Escalonada		541,3	0,000	3,5E+117
Logístico	Assintótica		541,3	0,000	3,5E+117
Lopez - b	Assintótica		541,3	0,000	3,5E+117

¹ Informação do critério de Akaike

² Delta

³ Probabilidade de Verossimilhança

⁴ Razão de evidência

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b.

Escolhido o modelo, avaliou-se se há influência do polimorfismo em cada parâmetro do modelo não-linear misto. Observou-se que há diferença nos perfis das curvas de crescimento para a característica altura na cernelha (AC) como demonstrado na Figura 9. O que indica a influência do polimorfismo BIEC2-808543 sobre o perfil da curva de crescimento para esta variável.

Esses resultados corroboram com os Signer-Hasler et al. (2012) onde o alelo C do SNP BIEC2-808543 T/C está associado a maiores valores de altura na cernelha em cavalos Franches-Montagnes (FM) e com os resultados de Metzger et al. (2013) que relata a associação desse mesmo polimorfismo à altura na cernelha dentro e entre raças de cavalos, sendo o genótipo TT mais frequente em animais com altura na cernelha inferior a 1,48m (pôneis); o genótipo TC mais frequentes em animais com AC entre 1,30 e 1,60m e a maior frequência do homozigoto CC foi observada em animais com altura na cernelha superior a 1,60m. Segundo esses autores o alelo C está associado a redução da expressão do gene *LCORL*, em cavalos de maior porte, pois nos equinos que apresentaram o genótipo CC, o gene *LCORL* foi cerca de 56% menos expresso e nos heterozigotos TC 40% menos expresso quando comparados com os menores cavalos, os que possuíam genótipo TT. E discutem que a proteína apresenta motivos de fatores de transcrição e por esta razão são essenciais em vários processos biológicos. Tozaki et al., 2015 ao investigarem a variabilidade genética do mesmo SNP em cavalos de raças pesadas (Percheron e Bretã) e de raças leves nativas do Japão (Kiso e Yonaguni) observaram que todos os animais das raças pesadas possuíam o genótipo CC, enquanto que todos os das raças nativas apresentaram o genótipo TT. Os mesmos autores ao avaliarem a influência deste polimorfismo sobre as variações de peso e altura em animais da raça Puro Sangue durante a fase de pré-treino não encontraram o genótipo CC na população em estudo, todavia os animais com genótipo TC foram significativamente ($p>0,05$) maiores (AC), mais pesados e possuíam proporção peso corporal / altura na cernelha superior, quando comparados com os animais com genótipo TT.

Apesar de encontrarmos na literatura trabalhos de associação deste polimorfismo à altura de cernelha em cavalos, não há trabalhos de associação desta variação gênica à parâmetros da curva de crescimento, afim de estimar o efeito do polimorfismo sobre perfil da curva de crescimento.

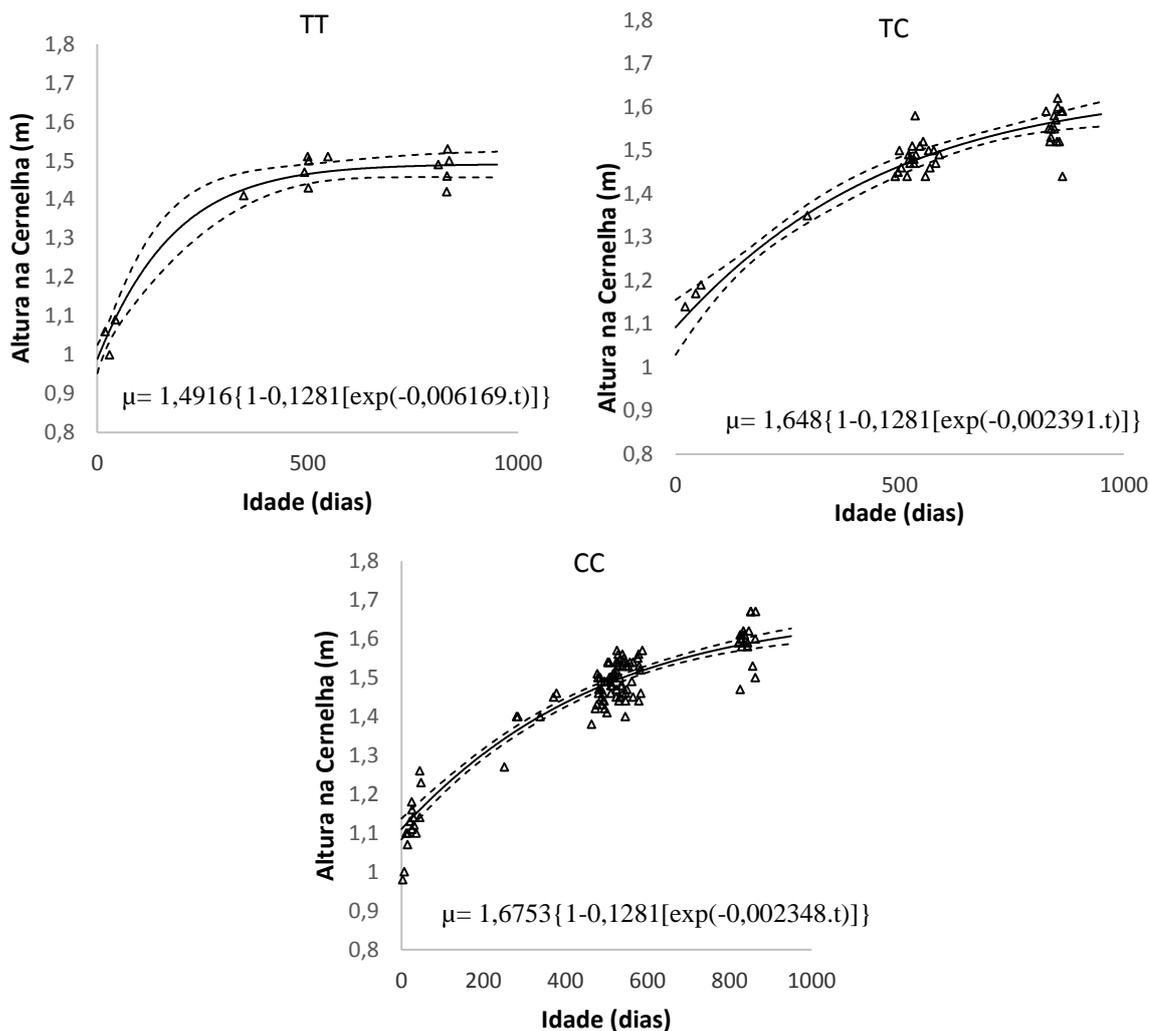


Figura 9. Dados observados (Δ), valores preditos (linha s3lida) e intervalos de confian3a 95% (linhas tracejadas) da altura de cernelha dos equinos da ra3a Brasileiro de Hipismo. Gr3fico a: gen3tipo TT, gr3fico b: gen3tipo TC, e gr3fico c: gen3tipo CC.

Para o par3metro Y_f que prediz a altura na cernelha assint3tica a maturidade, os animais com gen3tipo TT foram mais baixos quando comparados com os que apresentaram os gen3tipos TC e CC ao n3vel de 5 % de signific3ncia. N3o houve diferen3a significativa entre os gen3tipos TC e CC (Figura 10). No entanto a altura na cernelha assint3tica (Y_f) para cada gen3tipo n3o 3 obrigatoriamente a altura deste animais na fase adulta, mas sim a m3dia a ser atingida independente de condi33es sazonais. Os valor estimados pelo modelo para cada gen3tipo, est3 representado pela figura 10.

AC Maturidade (Y_f)

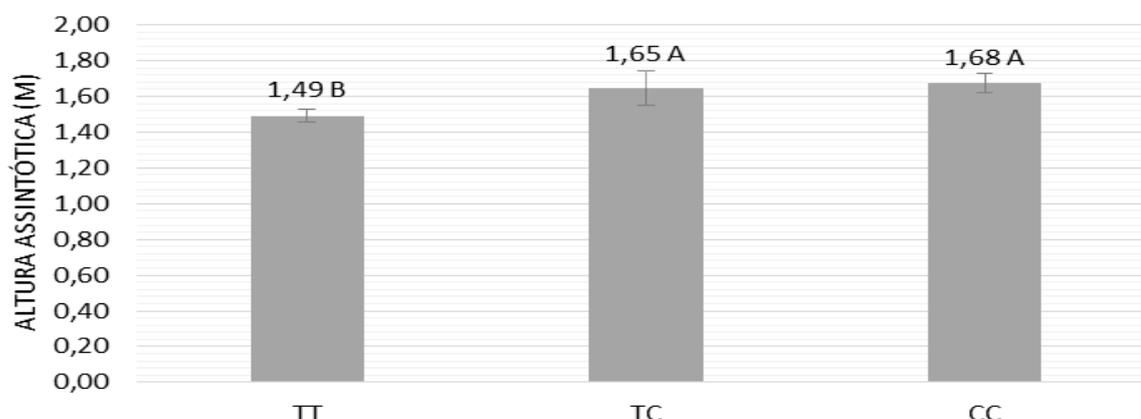


Figura 10. Altura na Cernelha à maturidade para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = yf1, genótipo TC = yf2 e genótipo CC = yf3.

O modelo de Von Bertalanffy (1957) baseia-se na suposição de que a taxa de crescimento resume-se na diferença entre as taxas de anabolismo e catabolismo do indivíduo. O parâmetro k que representa a taxa de crescimento relacionada a altura na cernelha não diferiu entre os genótipos (Figura 11).

AC Taxa de Crescimento (k)

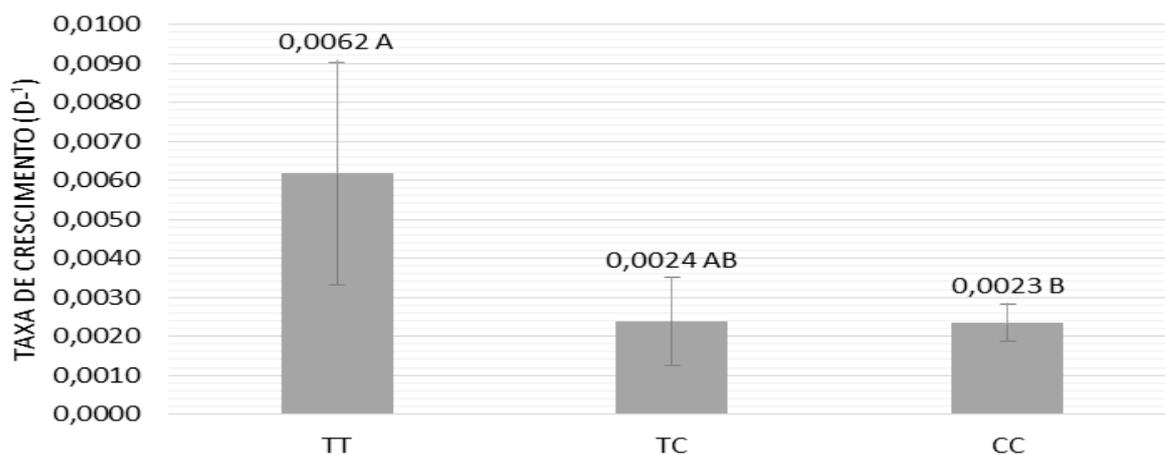


Figura 11. Taxa de crescimento referente a altura na cernelha (AC) para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k_1 , genótipo TC = k_2 e genótipo CC = k_3 .

4.2.3 Variável altura na garupa (AG)

Na avaliação do crescimento para a variável altura na garupa o modelo misto proveniente da associação do modelo de Brody (1945) à variância assintótica, que é ponderada em função do tempo, até que se alcance um platô, foi o que melhor descreveu o crescimento de equinos da raça BH para esta variável, sendo este o modelo que melhor se ajustou aos critérios de Akaike (Tabela 10 e 11). Como podemos observar na tabela 10, com exceção do modelo de Lopes, os modelos pouco diferiram entre si, o que realmente definiu o modelo que melhor descreve a variável AG foi a variância assintótica.

Não foram encontrados trabalhos sobre curvas de crescimento especificamente para a variável altura na garupa, possivelmente por ser mais habitual medir a altura dos equinos pela altura na cernelha. Contudo Pinto et al. (2005) ao realizarem a avaliação morfométrica de potros da raça Mangalarga Marchador, a partir da análise de componentes principais, relatam que em potros recém-nascidos de ambos os sexos, a característica altura na garupa está entre os componentes principais necessários para explicar um percentual mínimo de 80% da variação total existente e descartam a necessidade de mensuração da variável altura na cernelha para avaliação do crescimento em potros desta idade, pois, segundo a análise efetuada esta variável não apresenta variação importante ou está fortemente relacionada com uma das variáveis selecionadas, sendo possível reduzir o número de variáveis morfométricas de 25 para nove, em potros, e para 7 em potras com a mesma idade. Neste mesmo trabalho ao analisarem potros de um ano a altura na garupa juntamente com a largura da anca foram capazes de explicar cerca de 62,8% da variação total existente, evidenciando a importância desta variável na análise de crescimento em equinos, mesmo sendo diretamente proporcional à altura na cernelha.

Tabela 10. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os melhores modelos ajustado para variável altura na garupa (AG) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo.

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Brody	Assintótica	-577,0	0	0,115	1,0
Von Bertalanffy	Assintótica	-576,6	0,4	0,094	1,2
Gompertz	Assintótica	-576,4	0,6	0,085	1,3
Logístico	Assintótica	-575,7	1,3	0,060	1,91
Von Bertalanffy – b ⁵	Assintótica	-574,5	2,5	0,033	3,49
Brody - b	Assintótica	-574,4	2,6	0,031	3,67
Gompertz - b	Assintótica	-574,2	2,8	0,028	4,05

¹ Informação do critério de Akaike

² Delta

³ Probabilidade de Verossimilhança

⁴ Razão de evidência

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b.

Tabela 11. Valores de Akaike e os critérios de verossimilhança para os piores modelos ajustado para variável variável altura na cernelha (AC) em equinos da raça Brasileiro de Hipismo (continua)

MODELO	VARIÂNCIA	AICC ¹	Δ^2	W ³	ER ⁴
Brody	Homogênea	-573,5	3,5	0,020	5,75
Von Bertalanffy	Homogênea	-572,8	4,2	0,014	8,17
Gompertz	Homogênea	-572,4	4,6	0,011	9,97
Brody	Escalonada	-571,6	5,4	0,008	14,87
Brody	Exponencial	-571,4	5,6	0,007	16,44
Logístico	Homogênea	-571,3	5,7	0,007	17,29
Von Bertalanffy	Escalonada	-570,9	6,1	0,005	21,11
Brody – b ⁵	Homogênea	-570,7	6,3	0,005	23,34
Von Bertalanffy	Exponencial	-570,7	6,3	0,005	23,34
Gompertz	Escalonada	-570,6	6,4	0,005	24,53
Gompertz	Exponencial	-570,3	6,7	0,004	28,50
Von Bertalanffy - b	Homogênea	-569,7	7,3	0,003	38,47
Logístico	Escalonada	-569,6	7,4	0,003	40,45
Logístico	Exponencial	-569,3	7,7	0,002	46,99
Gompertz - b	Homogênea	-569,2	7,8	0,002	49,40
Brody - b	Escalonada	-568,5	8,5	0,002	70,10
Brody - b	Exponencial	-568,4	8,6	0,001	73,69
Von Bertalanffy - b	Escalonada	-567,9	9,1	0,001	94,63
Logístico - b	Homogênea	-567,8	9,2	0,001	99,48
Gompertz - b	Escalonada	-567,6	9,4	0,001	109,94
Von Bertalanffy - b	Exponencial	-567,5	9,5	0,001	115,58

Tabela 11. Continuação

Gompertz - b	Exponencial	-567,1	9,9	0,001	141,17
Logístico - b	Escalonada	-566,7	10,3	0,001	172,43
Logístico - b	Exponencial	-566	11	0,000	244,69
Logístico - b	Assintótica	-563,6	13,4	0,000	812,40

¹ Informação do critério de Akaike

² Delta

³ Probabilidade de Verossimilhança

⁴ Razão de evidência

⁵ Modelo ajustado sem efeito de polimorfismo no parâmetro b.

Selecionado o modelo que melhor descreve a variável altura na garupa (AG), avaliou-se a influência do polimorfismo em parâmetros do modelo não-linear misto derivado do modelo de Brody (1945) associado à variância assintótica. Observou-se que há diferença nos perfis das curvas de crescimento para a variável altura na garupa (AG) como demonstrado na Figura 12.

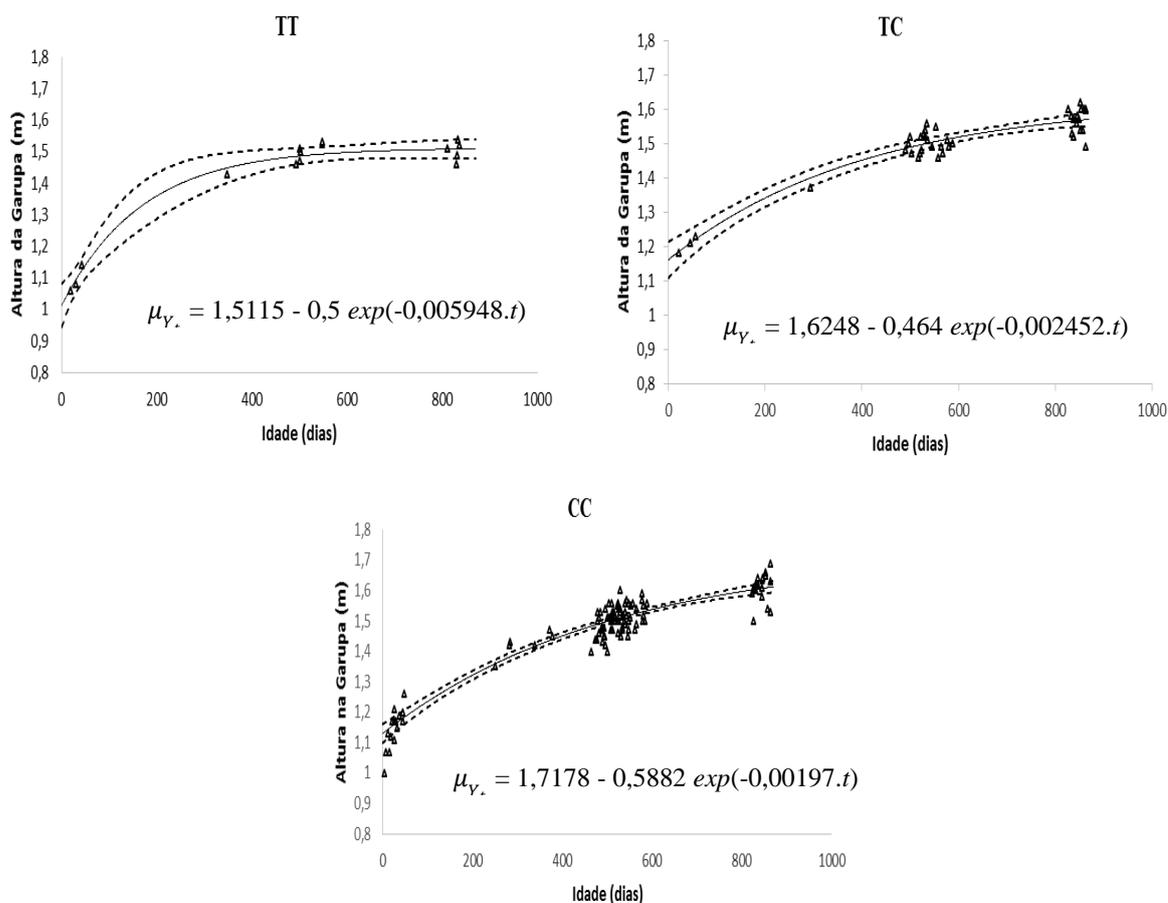


Figura 12. Dados observados (Δ), valores preditos (linha sólida) e intervalos de confiança 95% (linhas tracejadas) da altura na garupa dos equinos da raça Brasileiro de Hipismo.

Para o parâmetro Y_f que prediz a altura na garupa assintótica a maturidade, os animais com genótipo TT foram mais baixos quando comparados com os que apresentaram os genótipos TC e CC ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os genótipos TC e CC (Figura 13).

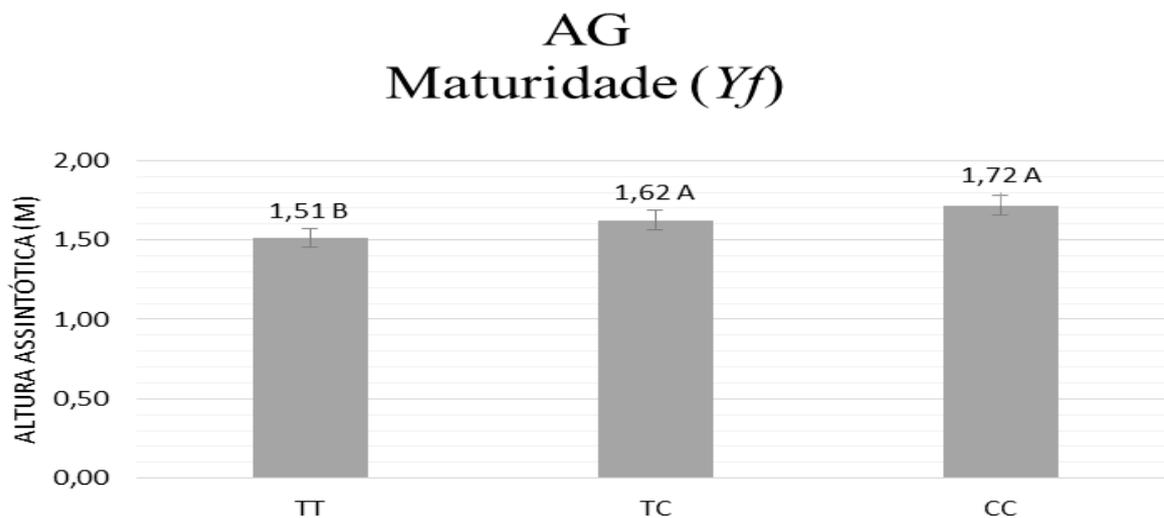


Figura 13. Altura na Cernelha à maturidade para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = yf_1 , genótipo TC = yf_2 e genótipo CC = yf_3 .

Assim como na característica peso o melhor modelo foi o modelo de Brody (1945) que admite uma taxa de crescimento inversamente proporcional à altura na garupa, entretanto apesar de observarmos essa inversa proporcionalidade, onde a taxa de crescimento dos menores animais (os que apresentam o genótipo TT) é superior a taxa de crescimento dos maiores (os que apresentam genótipo TC e CC), essa diferença não é significativa (Figura 14).

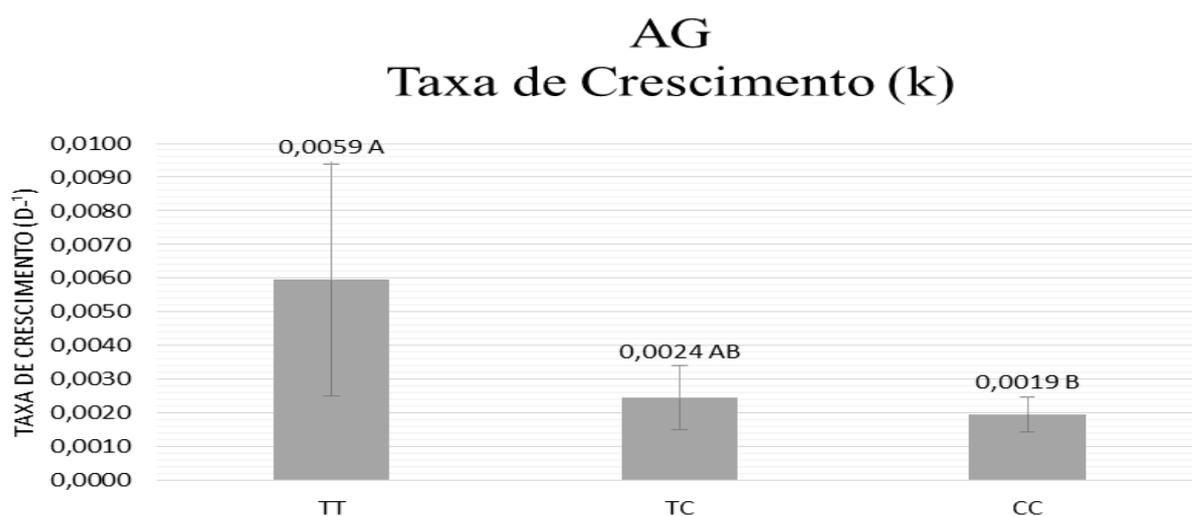


Figura 14. Taxa de crescimento referente a altura na cernelha para o polimorfismo do gene *LCORL* (BIEC2-808543) em equinos da raça Brasileira de Hipismo. Genótipo TT = k_1 , genótipo TC = k_2 e genótipo CC = k_3 .

Nos criatórios geralmente os cavalos são medidos e pesados, entretanto não possuem uma curva de referência para auxiliar na interpretação das informações coletadas, logo a utilização das curvas de crescimento como referência permite que os criadores possam avaliar precocemente o desenvolvimento dos potros, tomando decisões adequadas de manejo e seleção conforme o padrão da raça e necessidade do criatório. O desenvolvimento ideal dos potros deve estar nas faixas de variação definidas pelas curvas. Potros que estão com peso ou altura abaixo ou acima da respectiva curva de crescimento devem receber maiores atenções, visando identificar as prováveis causas do sub ou super desenvolvimento (Santos et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

A variação gênica descrita na região promotora do gene *MSTN* não foi observada, estando o alelo T fixado na população. O SNP BIEC2-808543 está significativamente associado as características: altura na cernelha (AC), altura na garupa (AG) e massa corporal, influenciando o perfil da curva de crescimento destas variáveis em equinos da raça BH. Os animais que apresentaram o genótipo TT foram menores e mais leves quando comparados com os demais genótipos, no entanto os indivíduos com genótipo TC e CC não diferiram entre si em nenhuma das estimativas das variáveis avaliadas. Este polimorfismo pode ser utilizado como marcador molecular para a seleção precoce de potros quanto às três características avaliadas. Os modelos não-lineares mistos são de fato promissores para a descrição de curvas de crescimento de equinos, pois os modelos simples não diferiram muito entre si o que definiu a seleção do modelo foi a variância, sendo para massa corporal a variância escalonada e para as alturas (na cernelha e na garupa) a variância assintótica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCCH – Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos de Hipismo. **Regulamento do Stud Book Brasileiro do Cavalos de Hipismo**. Disponível em: <http://www.brasileirodehipismo.com.br/upload/arquivos/REGULAMENTO_STUDBOOK_FINAL_2011.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2013.

AKAIKE, H. **A new look at the statistical model identification**. Automatic Control, IEEE Transactions on, v.19, n.6, p.716-723, 1974.

ALMEIDA, M. I. V.; MARTINS FILHO, S.; OLIVEIRA, J. E. G. Aplicação da identidade de modelos na análise de dados de crescimento de eqüinos. In: Escola de Modelos de Regressão, 2011, Fortaleza, CE. **Anais.. XII Escola de Modelos de Regressão**. Fortaleza, 2011. v.01, p.1-4, 2011.

BAKHTIARI, J.; HESHMAT, G. Estimation of genetic parameters of conformation traits in Iranian Thoroughbred horses. **Livestock Science**, v.123, n.2, p.116-120, 2009.

BARBOSA, C. G. Estudo morfométrico na raça Mangalarga Marchador. **Uma abordagem multivariada**. 1993. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARD, Y. **Nonlinear Parameter Estimation**. New York: Academic Press, Inc., v.513, 1974.

BARON, E. E., LOPES, M. S., MENDONÇA, D., MACHADO, A. C. SNP identification and polymorphism analysis in exon 2 of the horse myostatin gene. **Animal Genetics**, v.43, n.2, p.229-232, 2012.

BINNS, M. M.; BOEHLER, D. A.; LAMBERT, D. H. Identification of the *myostatin locus* (*MSTN*) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in de USA. **Animal Genetics**, v.41, suppl.2, p.154-158, 2010.

BOMAN, A., KLEMETSDAL, G., BLICHFELDT, T., NAFSTAD, O., VAGE, D. I.M. A frame shift mutation in the coding region of the myostatin gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v.40, n.4, p.418-422, 2009.

BRODY, S.; RAGSDALE, A. C.; TURNER, C. W. The relation between the initial rise and the subsequent decline of milk secretion following parturition. **The Journal of General Physiology**, v.6, n.5, p.541-545, 1924.

BRODY, S. **Bioenergetics and Growth**. New York: Reinhold Publ. Co. p.1-1023, 1945.

BROOKS, S. A.; GABRESKI, N.; MILLER, D.; BRISBIN, A.; BROWN, H. E.; STREETER, C.; MEZEY, J.; COOK, D.; ANTCZAK, D. F. Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in myosin V a responsible for Lavender Foal Syndrome. **PLoS. Genetics**, v.6, n.4, p.e1000909, 2010.

BURNHAM, K.P. & ANDERSON, D. R. Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. **Sociological Methods & Research** v.33, n.2, p.261-304, 2004.

CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C. R.; PINTO, L. F. B.; SANTOS E. M.; CORASSA, A. Avaliação morfológica de equinos da raça Mangalarga Marchador: Medidas Lineares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.989-1000, 2004a.

CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; AZEVEDO, P.C.N.; QUIRINO, C. R.; SANTOS E. M.; CORASSA, A.; PINTO, L. F. B. Avaliação Morfológica de Equinos da Raça Mangalarga Marchador: Medidas Angulares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1790-1797. 2004b.

CAMARGO, M.X.; CHIEFFI, A. **Ezoognósia**. São Paulo, CPA/ Instituto de Zootecnia, 1971. 320p.

COLOG. **Normas para o controle dos equídeos no Exército Brasileiro** (NORCE 2013 / EB40-N-30.001). Brasília: Ministério da Defesa, 53p., 2013.

DALL'OLIO, S., FONTANESI, L., COSTA, L. N., TASSINARI, M., MINIERI, L., FALASCHINI, A. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, 2010.

DALL'OLIO, S., WANG, Y., SARTORI, C., FONTANESI, L., MONTOVANI, R. Association of myostatin (*MSTN*) gene polymorphisms with morphological traits in the italian heavy draft horse breed. **Livestock Science**, v.160, p.29-36, 2014.

Dias, I. M. G., Bergmann, J. A. G., Rezende, A. S. C., Castro, G. H. F. Formação e estrutura populacional do equino Brasileiro de Hipismo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.6, p.647-654, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352000000600016&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em: 08 jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000600016>.

FARIA, R.; SILVA, M. A.; BUENO, R. S.; TORRES, R.A.; LOPES, P. S.; EUCLYDES, R. F.; PEREIRA, J. C. C.; BERGMAN, J; A. G.; FRIDRICH, A. B.; FERREIRA, I. C. Avaliação genética e fenotípica de características de conformação em potros de três raças equinas. **Revista Ceres**, v.51, p.333-344, 2004.

FREITAS, A.R. Curvas de Crescimento na Produção Animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.786-795, 2005.

GIESECKE, K.; HAMANN, H.; SIEME, H.; DISTL, O. INHBA-associated markers as candidates for stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.2, p.342-347, 2010.

GIESECKE, K.; SIEME, H.; DISTL, O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: A review. **The Veterinary Journal**, v.185, n.3, p.265-271, 2010.

GODOI, F.N., **Avaliação cinemática de variáveis relacionadas ao resultado dos saltos de potros**. 2012, 149p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GODOI, F.N.; BERGMANN, J. A. G.; ALMEIDA, F. Q.; SANTOS, D. C. C.; MIRANDA, A. L. S.; VASCONCELOS, F. O.; OLIVEIRA, J. E. G.; KAIPPER, R. R., ANDRADE, A. M. Morfologia de potros da raça Brasileiro de Hipismo. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.736-742, 2013.

GONZALEZ-CADAVID, N. F., TAYLOR, W. E., YARASHESKI, K., SINHA-HIKIM, I., MA, K., EZZAT, S., BHASIN, S. Organization of the human *myostatin* gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.25, p.14938-14943, 1998.

GROBET, L., PONCELET, D., ROYO, L. J., BROUWERS, B., PIROTTIN, D., MICHAUX, C., GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle, **Mammalian Genome**, v.9, n.3, p.210-213, 1998.

GU, J.; MACHUGH, D. E.; MCGIVNEY, B. S.; PARK, S. D. E.; KATZ, L. M.; HILL, E. W. Association of sequence variants in *CKM* (creatine kinase, muscle) and *COX4/2* (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.38, p.569-575, 2010.

GU, J.; ORR, N.; PARK, S. D. E.; KATZ, L. M.; SULIMOVA, G.; MACHUGH, D. E.; HILL, E. W. A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses. **PLoS one**, v.4, n.6, p.e5767, 2009.

HILL, E. W.; GU, J.; EIVERS, S. S.; FONSECA, G. R.; MCGIVNEY, B. A.; GOVINDARAJAN, P.; ORR, N.; KATZ, L. M.; MACHUGH, D. A Sequence Polymorphism in *MSTN* Predicts Sprinting Ability and Racing Stamina in Thoroughbred Horses. **PLoS ONE**, v.5, n.1, p.e8645, 2010a.

HILL, E. W.; MCGIVNEY, B. A.; GU, J.; WHISTON, R.; MACHUGH, D. E. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine *myostatin* (*MSTN*) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. **BMC Genomics** v.11, n.1, p.552-559, 2010b.

HINTZ, H.F.; HINTZ, R.L.; VAN VLECK, L.D. Growth rate of thoroughbreds. Effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. **Journal of Animal Science**, v.48, n.3, p.480-487, 1979.

HOLMTRÖM, M. **How do we recognize elite Show Jumpers**. In: Conference on Equine Sports Medicine and Science. The elite show jumper, Sicily, Italy. Proceedings, CESMAS. p.45-56, 2000.

HORVAT, S., MEDRANO, J.F. 1995. Interval mapping of high growth (hg), a major locus that increases weight gain in mice. **Genetics**, v.139, n.4, p.1737-1748, 1995.

JORDÃO, L. P.; CAMARGO, M. X. Estudo sobre algumas medidas do cavalo Mangalarga criado na Coudelaria Paulista. **Boletim da Indústria Animal**, v.11, p.81-95, 1950.

LINDHOLM-PERRY, A. K.; SEXTEN, A. K.; KUEHN, L. A.; SMITH, T. P. L.; D ANDY KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; FERRELLI, C. L.; JENKINS, T. G.; SNELLING, W. M.; FREELY, H. C. Association, effects and validation of

polymorphisms within the NCAPG - LCORL locus located on BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. **BMC Genetics**, v.12, n.1, p.103-116, 2011.

LINDHOLM-PERRY, A. K.; KUEHN, L. A.; OLIVER, W. T.; SEXTEN, A. K.; MILES, J. R.; REMPEL, L. A.; CUSHMAN, R. A.; FREETLY, H. C. 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, p.e80882, 2013.

LÓPEZS, S.; FRANCE, J., GERRITS, W. J. J.; DHANOA, M. S., HUMPHRIES, D. J.; DIJKSTRA, J. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. **Journal of Animal Science**, v.78, n.7, p.1816–1828, 2000.

LUSZCZYNSKI, J.; PIESZKA, M.; KOSINIAK-KAMYSZ K. Effect of horse breed and sex on growth rate and radiographic closure time of distal radial metaphyseal Growth plate. **Livestock Science**, v.141, n.2, p.252-258, 2011

MAKVANDI-NEJAD, S.; HOFFMAN, G. E.; ALLEN, J. J.; CHU, E., GU, E., CHANDLER, A. M., SUTTER, N. B. Four loci explain 83% of size variation in the horse. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.e39929, 2012.

MAYR, E. 1963. **Animal species and evolution**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1963.

MARTIN-ROSSET, W. **Growth and development in the equine**. In: The Growing Horse: Nutrition and Prevention of Growth Disorders, Eds: V. Juliand; W. Martin-Rosset, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. v.114, p.15-50, 2005.

MATIS, J. H.; HARTLEY, H. O. Stochastic compartmental analysis: model and least squares estimation from time series data. **Biometrics** v.27, p.77–102, 1971.

MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M. C.; CRISA, A.; NARDONE, A.; MARSAN, P.A.; VALENTIN, A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. **Mammalian Genome**, v.14, n.6, p.392-395, 2003.

McGIVNEY, B. A.; BROWNE, J. A.; FONSECA, R. G.; KATZ, L. M.; MACHUGH, D. E.; WHISTON, R.; HILL, E. W. MSTN genotypes in Thoroughbred horses influence skeletal muscle gene expression and racetrack performance. **Animal Genetics**. v.43, n.6, p.810-812, 2012.

McMANUS, C.; LOUVANDINI, H; CAMPOS, V. A. L. Non-linear growth curves for weight and height in four genetic groups of horses. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.80-89, 2010.

McPHERRON, A. C., LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v.387, n.6628, p.83-90, 1997.

MEIRA, C. T.; FARAH, M. M.; FORTES, M. R. S.; MOORE, S. S.; PEREIRA, G. L., SILVA, J. A. V. S.; MOTA M. D. S.; CURI, R. A. A genome-wide association stud for morphometric traits in quarter horse. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.34, n.8, p.1028-1031, 2014.

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, p.e56497, 2013.

MOSHER, D. S., QUIGNON, P., BUSTAMANTE ET AL., C. D.; SUTTER, N. B.; MELLERSH, C. S.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **PLoS Genetics**, v.3, n.5, p.e79, 2007.

MOTA, M. D. S.; OLIVEIRA, H. N.; PUOLI FILHO, J. N. P. Avaliação do crescimento em potros da raça Quarto de Milha. **Revista Eletrônica de Veterinária**. v.11, n.1, p.1-10, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of horses. 6° ed. Rev. Washington, D.C.: **National Academies Press**, 2007. 341p.

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

PALJAN, A.; FERNANDES, I.; VERWAY, M.; KOURELIS, M.; BASTIEN, Y.; TAVERA-MENDOZA, L. E.; SACHELI, A.; BOURDEAU, V.; MADER, S.; WHITE, J. H. Ligand-dependent corepressor LCoR is a attenuator of progesterone-regulated gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v.284, n.44, p.30275-30287, 2009.

PAZ, C. C. P. **Associação entre polimorfismos genéticos e parâmetros da curva de crescimento de bovinos de corte**. 2002, 120p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

PEARL, R. & REED, L. J. **On the mathematical theory of population growth**. *Metron*, v.3, n.1, p.6-19, 1923.

PETERSEN, J. L.; MICKELSON, J. R.; RENDAHL, A. K.; VALBERG, S. J.; ANDERSSON, L. S.; AXELSSON, J.; BAILEY, E.; BANNASCH, D.; BINNS, M. M.; BORGES, A. S.; BRAMA, P.; MACHADO, A. C.; CAPOMACCIO, S.; CAPPELLI, K.; COTHRAN, E. G.; DISTL, O.; FOX-CLIPSHAM, L.; GRAVES, K. T.; GUÉRIN, G.; HAASE, B.; HASEGAWA, T.; HEMMANN, K.; HILL, E. W.; LEEB, T.; LINDGREN, G.; LOHI, H.; LOPES, M. S.; MCGIVNEY, B. A.; MIKKO, S.; ORR, N.; PENEDO, M. C. T.; PIERCY, R. J.; RAEKALLIO, M.; RIEDER, S.; ROED, K. H.; SWINBURNE, J.; TOZAKI, T.; VAUDIN, M.; WADE, C. M.; MCCUE, M. E. Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds. **PLoS one**, v.9, n.1, p.e1003211, 2013.

PINTO, L. F. B.; ALMEIDA, F. Q.; QUIRINO, C. R.; AZEVEDO, P. C. N.; CABRAL, G. C.; CORASSA, A. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.589-599, 2005.

PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R.; AZEVEDO, P.C.N.; CABRAL, G.C.; SANTOS E.M.; CORASSA, A. Evaluation of the sexual dimorphism in Mangalarga Marchador horses using discriminant analysis. **Livestock Science**, v.119, n.1, p.161-166, 2008.

REGATIERI, I. C.; MOTA, M. D. S., Melhoria genética de equinos: Aspectos Bioquímicos. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.28, n.4, p.227-233, 2012.

REISSMANN, M.; BIERWOLF, J.; BROCKMANN, G. A. Two SNPs in the SILV gene are associated in silver coat colour in ponies. **Animal Genetics**, v.38, n.1, p.1-6, 2007.

RICHARDS, F. J. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v.10, n.2, p.290-301, 1959.

RINGLER, J.E.; LAWRENCE, L.M. Comparison of Thoroughbred growth data to body weights predicted by the NRC. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.2, p.97-101, 2008.

ROCHA, N. S., VIEIRA, R. A. M., ABREU, M. L. C., ARAUJO, R. P., GLÓRIA, L. S., TAMY, W. P., CAMISA NOVA, C. H. P.; FERNANDES, A. M. Traditional and biphasic nonlinear models to describe the growth of goat kids of specialized dairy breeds. **Small Ruminant Research** v.123, n.1, p.35-46, 2015.

RATKOWSKI, D. A. Nonlinear regression modeling: a unified practical approach. **Marcel Dekker**, New York, 1983.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977

SANTOS, S.A.; CARVALHO, R.T.L.; COUTO, H.T.; MAZZA, M.C.M. Influência de alguns fatores ambientais sobre características de crescimento de cavalos Brasileiro de Hipismo até um ano de idade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.1, p.171-179, 1992.

SANTOS, S. A.; SOUZA, G. S.; OLIVEIRA, M. R.; SERENO, J. R. Using nonlinear models to describe height growth in pantaneiro horses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1133-1138, 1999

SANTOS, S. A.; SOUZA, G. S.; ABREU, U. G. P.; MCMANUS C.; COMASTRI FILHO, J. A. Monitoramento do desempenho de cavalos pantaneiros por meio de curvas de crescimento. **Archivos de Zootecnia**, v.56, supl.1, p.647-654, 2007.

SARMENTO, J.L.R.; REGAZZI, A.J.; SOUZA, W.H.; TORRES, R.A.; BREDA, F.C.; MENEZES, G.R.O. Estudo da curva de crescimento de ovinos Santa Inês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.435-442, 2006.

SCHUELKE, M., WAGNER, K. R., STOLZ, L. E. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in achild. **New England Journal of Medicine**, v.350, n.26, p.2682-2688, 2004.

SCHROEDER, W. **Athletic performance and conformation in Hanoverian warmblood horses - population genetic and genome-wide association analyses**. (tese), Hannover: University of Veterinary Medicine, 2010.

SCHROEDER, W.; Klostermann, A.; Stock, K. F.; Distl, O. A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**, v.43, n.4, p.392-400, 2011.

SIGNER-HASLER, H.; FLURY, C.; HAASE, B.; BURGER, D., SIMIANER, H., LEEB, T., RIEDER, S. A genome-wide association study reveals loci influencing height and other conformation traits in horses. **PLoS ONE**, v.7, n.5, p.e37282, 2012.

SMALE, S. T. & KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review Biochemistry**, v.72, n.1, p.449-479, 2003.

SONG, Y.; SHAN, S.; ZHANG, Y.; LIU, W.; DING, W.; REN, W.; XIA, H.; LI, X.; ZHANG, Q.; ZHAO, L.; LI, X.; YAN, J.; YING, H. Ligand-dependent corepressor acts as a novel corepressor of thyroid hormone receptor and repress hepatic lipogenesis in mice. **Journal of Hepatology**, v.56, n.1, p.248-254, 2012.

SOVIO, U.; BENNETT, A. J.; MILLWOOD, I. Y.; MOLITOR, J.; O'REILLY, P. F.; TIMPSON, N. J.; KAAKINEN, M.; LAITINEN, J.; HAUKKA, J.; PILLAS, D.; TZOULAKI, I.; MOLITOR, J.; HOGGART, C.; COIN, L. J. M.; WHITTAKER, J.; POUTA, A.; HARTIKAINEN, A.; FREIMER, N. B.; WIDEN, E.; PELTONEN, L.; ELLIOTT, P.; MCCARTHY, M. I.; JARVELIN, M. Genetic Determinants of Height Growth Assessed Longitudinally from Infancy to Adulthood in the Northern Finland Birth Cohort 1966. **PLoS Genetics**, v.5, n.3, p.e1000409, 2009.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 6. ed. Guanabara Koogan, 2013. 760p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. SAS Version 9.0. Cary, NC, USA: 2004.

STINCKENS, A., LUYTEN, T., BIJTTEBIERETAL, J. Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity, **Animal Genetics**, v.39, n.6, p.586-596, 2008.

TETENS, J.; WIDMANN, P.; KUHN, 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.

THOMPSON, K.N. Skeletal growth rates of weanling and yearling Thoroughbred horses. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p.2513-2517, 1995.

TOZAKI, T., HILL, E. W.; HIROTA, K.; KAKOI, H., GAWAHARA, H.; MIYAKE, T.; SUGITA, S.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; NAKANO, Y.; KUROSAWA, M. A cohort study of racing performance in Japanese Thoroughbred racehorses using genome information on ECA18. **Animal Genetics**, v.43, n.1, p.42-52, 2011a.

TOZAKI, T., KAKOI, H., HIROTA, K., GAWAHARA, H., SATOU, F., ISHIMARU, M., NAMBO, Y. Influence of *LCORL* gene polymorphism on body size in Thoroughbred horses. **Journal of Equine Science**, v.26, n.1, p.34, 2015.

TORRES, A.P.; JARDIM, W.R. **Criação do cavalo e de outros equinos**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 654p.

VALETTE, J.P.; ROBERT, C.; DENOIX, J.M. Use of linear and nonlinear functions to describe the growth of young sport and race horses born in Normandy. **Animal**, v.2, n.4, p.560-565, 2008.

VELIE, B.D., JÄDERKVIST, K., IMSLAND, F., VILUMA, A., ANDERSSON, L.S., MIKKO, S., ERIKSSON, S., E LINDGREN, G. Frequencies of polymorphisms in myostatin vary in Icelandic horses according to the use of the horses. **Animal genetics**, v.46, n.4, p.467-468, 2015.

VIEIRA, R.A.M., CAMPOS, P. R. S. S., SILVA, J. F. C., TEDESCHI, L. O., TAMY, W. P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. **Animal Feed Science and Technology**, v.171, n.2, p.154-166, 2012.

VON BERTALANFFY, L. Quantitative laws in metabolism and growth. **The Quarterly Review of Biology**, v.32, n.3, p.217-231, 1957.

WINSOR, C. P. The Gompertz curve as a growth curve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.18, n.1, p.1-8. 1932.

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. **Molecular Biology and Evolution**, v.32, n.3, p.711-725, 2014.