

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS E GRUPOS  
SANGÜÍNEOS EM CAVALOS DAS RAÇAS MANGALARGA E  
MANGALARGA MARCHADOR**

Andréia Samaha Lippi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP  
2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L765ep	<p>Lippi, Andréia Samaha. Estudo de polimorfismos bioquímicos e grupos sangüíneos em cavalos das raças mangalarga e mangalarga marchador / Andréia Samaha Lippi. -- São Carlos : UFSCar, 2004. 94 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.</p> <p>1. Genética animal. 2. Polimorfismo (genética). 3. Cavalos. 4. Grupos sangüíneos em eqüinos. I. Título.</p> <p>CDD: 591.15(20ª)</p>
--------	--

**Orientadora: Prof. Dra. Norma Mortari**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Jalal e Maria, que tanto me incentivaram e me apoiaram na busca de conhecimento, e ao meu marido Adriano, pelo seu amor e dedicação.*

“Qualquer princípio de inteligência que alcançarmos nesta vida, surgirá conosco na ressurreição. E se nesta vida uma pessoa, por sua diligência e obediência, adquirir mais conhecimento e inteligência do que outra, ela terá tanto mais vantagem no mundo futuro”.

D&C 130:18-19

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai Celestial por ter me permitido e capacitado a realizar este trabalho.

À minha irmã Carla, por ter me dado a coragem de retomar meus estudos.

À minha irmã Érica pela ajuda na confecção das fotos.

Às minhas irmãs, Valquíria, e Priscila, e ao meu irmão Eric pelo amor e interesse que sempre demonstraram.

Às minhas amigas Célia e Adriane que sempre foram grandes incentivadoras.

Aos meus sogros, cunhados e sobrinhos por serem parte de minha família.

À todos os funcionários do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal de São Carlos, Pedro, Silvana, Paulo, Maristela, Jane, Mara, Patrícia e Maria Helena; por terem tolerado meus erros e pela paciência que tiveram em me ensinar. Principalmente à Marina, Regina e Silvia Helena que colaboraram imensamente no entendimento dos materiais e métodos e na obtenção dos resultados.

Ao doutorando Mercival Roberto Francisco, por ter despendido de seu tempo para me auxiliar nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes, pelos conselhos e incentivo nos momentos de desânimo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Norma Mortari por ter se interessado pelas minhas necessidades, e principalmente, por ter me aceito e acreditado que eu seria capaz.

## **Resumo**

As frequências alélicas de 12 locos (cinco de grupos sanguíneos: C, D, K e U; e sete de polimorfismos proteicos) foram calculadas para duas raças brasileiras de cavalos: Mangalarga e Mangalarga Marchador. O alto valor de identidade genética encontrada (96%) está de acordo com sua origem comum, embora em algum ponto do desenvolvimento do Mangalarga Marchador, o Mangalarga foi separado de sua linhagem original. A heterozigosidade média esperada foi maior em Mangalarga Marchador. As duas populações apresentaram diferenciação genética mostrada pelo valor significativo estatisticamente de  $F_{ST}$ . Os valores não significantes de  $F_{IS}$  mostraram que não há uma taxa apreciável de endocruzamentos em nenhuma das duas populações. A probabilidade de exclusão calculada para os 12 locos foi de 87,0% e 86,5% para Mangalarga Marchador and Mangalarga, respectivamente. Os locos A1B, Tf, and Es da raça Mangalarga Marchador não apresentaram equilíbrio genético. As frequências dos fatores sanguíneos A, Q e T também foram calculadas.

## **Abstract**

Allelic frequencies at 12 loci (five blood groups: C, D, K, P, and U; and seven protein polymorphisms: A1, A1B, Es, Gc, Hb, PGD, and Tf), are given for two Brazilian horse breeds: Mangalarga Marchador and Mangalarga. The high genetic identity value found (96.0%) is consistent with their common origin, although, at some point of the development of Mangalarga Marchador, Mangalarga separated from the original stock. The expected average heterozygosity was higher in Mangalarga Marchador. The populations presented genetic differentiation, as shown by the statistically significant value of  $F_{ST}$ . The nonsignificant  $F_{IS}$  values showed that there was no appreciable consanguineous mating in any of the two populations. Exclusion probability calculated for the 12 loci was 87.0% and 86.5% for Mangalarga Marchador and Mangalarga, respectively. No genetic equilibrium was observed in the A1B, Tf, and Es loci of Mangalarga Marchador. The frequencies of blood factors A, Q, and T were calculated.



## 1. Introdução

A determinação e a análise de marcadores genéticos, tais como os grupos sanguíneos e os polimorfismos bioquímicos, permitem caracterizar a estrutura e a variabilidade genética intra e inter populacional de diferentes raças eqüinas. Seu estudo possibilita a análise da manutenção da diversidade genética das raças. Devido ao seu caráter polimórfico, ao modo simples de herança, ao fato de não sofrerem a ação direta da seleção natural e à possibilidade de se testar um grande número de locos, eles prestam-se grandemente a estudos de caracterização racial e de comparação entre raças e populações.

Os grupos sanguíneos são aloantígenos da membrana da hemácia, detectados tradicionalmente por métodos serológicos, que se baseiam na reação antígeno-anticorpo. A grande contribuição ao conhecimento sobre serologia e genética dos grupos sanguíneos de cavalos foi dada por Stormont e Suzuki, com seus trabalhos pioneiros publicados em 1964.

Os polimorfismos bioquímicos são variantes protéicas, detectados tradicionalmente por métodos eletroforéticos, que se baseiam na migração diferencial das proteínas em um campo elétrico. Uma grande quantidade de locos polimórficos foi descrita na espécie eqüina.

As raças eqüinas Mangalarga e Mangalarga Marchador (*Equus caballus*) foram formadas no Brasil, a partir de meados do século XIX, tendo sua origem em cavalos trazidos da península ibérica. Cruzamentos realizados no sul de Minas Gerais, entre garanhões da raça Álder com éguas crioulas e Andaluz, iniciaram a formação da raça que viria a ser chamada de Mangalarga Marchador. Com o objetivo de desenvolver um cavalo mais veloz, ágil e com melhor galope, fazendeiros de São Paulo iniciaram cruzamentos de animais dessa raça que estava se formando, com animais Puro Sangue Inglês, Árabe, Anglo

Árabe e American Saddle horse acarretando diferenças notáveis com os cavalos de Minas Gerais. Essa nova raça passou a ser denominada de Mangalarga.

O presente trabalho teve por objetivo comparar e caracterizar essas duas raças brasileiras, Mangalarga e Mangalarga Marchador, com relação a essas duas classes de marcadores genéticos do sangue, identificados através de técnicas serológicas e eletroforéticas. Esse estudo apresenta a análise de oito locos de grupos sanguíneos e sete locos de polimorfismos bioquímicos, visando avaliar o grau de variabilidade de cada população estudada, bem como quantificar geneticamente a provável semelhança interpopulacional, comparando com dados obtidos em outras raças descritas na literatura. Tendo em vista que os marcadores genéticos estudados são usados para testes de verificação de parentesco, calculou-se a probabilidade de exclusão em 12 sistemas, onde foi possível estimar as frequências alélicas.





---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Cavalo e sua História Evolutiva

O cavalo doméstico (*Equus caballus*) pertence à classe *Mammalia*, ordem *Perissodactyla*, subordem *Hippomorpha*, superfamília *Equioidea*, família *Equidae*, subfamília *Equinae*, tribo *Equini*, gênero *Equus*. Os perissodáctilos são mamíferos ungulados (com cascos), de dedos ímpares e estômago simples. A família eqüídea possui um dedo funcional, com casco em cada perna. O gênero *Equus* inclui todos os eqüídeos vivos - cavalos, asnos, onagros, hemíonos e zebras. A análise de características morfométricas e de DNA mitocondrial mostrou que os eqüídeos existentes atualmente pertencem a três grupos distintos: cavalos, zebras e asnos mais hemíonos (cf. Groves & Ryder, 2000).

O cavalo foi domesticado, a cerca de 6000 anos atrás, em uma região de estepes, do que é hoje a Ucrânia e sudeste da Rússia. Desde então, os cavalos desempenharam um papel importante no desenvolvimento de várias civilizações. Nenhum outro animal teve um papel tão especial em acelerar os processos sociais e desenvolvimento político quanto o cavalo. O surgimento e a queda de impérios, conquistas de continentes, grandes batalhas, o desenvolvimento de sistemas de transporte, correio, progresso na agricultura e esporte, ocorreram com a participação dessa espécie de animal doméstico. O século 20 interrompeu o uso tradicional dos eqüinos, que vinha acontecendo ao longo da história. Apesar de uma queda dramática nos anos de 1930-50, a população de cavalos voltou a crescer novamente, em países desenvolvidos. De acordo com o banco de dados de FAOSTAT, de 1998, a população mundial de cavalos é de cerca de 62 milhões, além de 14,6 milhões de mulas e 43 milhões de asnos (Bowling & Ruvinsky, 2000).

O ancestral do cavalo apareceu na Terra durante a era Terciária. A família eqüídea como um todo evoluiu na América do Norte, de lá se espalhando para o Velho Mundo, através de várias ligações que apareceram e desapareceram entre os blocos de continentes,

---

que, por sua vez, também tiveram suas extensões e seus limites alterados. No continente americano, contudo, esses ancestrais tornaram-se extintos, por razões ainda não compreendidas (Jones & Bogart, 1973). Um dos últimos registros fósseis, na Califórnia, Estados Unidos, indica que esses ancestrais teriam sido exterminados pelos primeiros habitantes humanos, no início do Holoceno (Groves & Ryder, 2000).

O cavalo moderno é descendente de ancestrais que existiram há cerca de 60 milhões de anos, no período Eoceno. Em 1841, cientistas encontraram em rochas desse período, nos Estados Unidos, um esqueleto, bastante completo, daquilo que se tornou o primeiro ancestral da linhagem evolutiva do cavalo ou do cavalo primitivo. Essa primeira forma ancestral foi chamada de *Hyracotherium* (ou *Eohippus*, o Cavalo da Alvorada) (Edwards, 1994; Groves & Ryder, 2000). Esse ancestral apresentava quatro dedos em cada pé e não media mais que 36 cm, sendo do tamanho de uma raposa ou cão de porte médio. Ao longo da evolução, os ancestrais do cavalo aumentaram em altura e passaram a apresentar apenas um dedo. As mudanças evolucionárias foram estudadas ou observadas principalmente através de cinco características: altura do animal, formato do crânio, tamanho do cérebro, dentes e pés (Jones & Bogart, 1973). O registro fóssil dos eqüídeos é um dos mais conhecidos entre os mamíferos (Groves & Ryder, 2000).

É provável que os ancestrais dos cavalos, asnos e zebras evoluíram na América do Norte e, separadamente, espalharam-se para o Velho Mundo, através da passagem do estreito de Behring, a partir da metade do Plioceno. Tanto na Europa como na Ásia, a primeira aparição de eqüídeos monodáctilos data de cerca de 2,5 mya. Depois de 1 mya, começam a aparecer as espécies relacionadas com a forma moderna. Na África, os ancestrais dos eqüídeos entraram por volta de 2 mya, sendo que os fósseis restringem-se quase que exclusivamente a zebras (Groves & Rider, 2000). Segundo Jones & Bogart (1973), os três tipos de eqüídeos atuais desenvolveram-se no Velho Mundo: as zebra, no sul e leste da

---

África; os asnos, no norte da África e na Ásia Menor; e os cavalos, na Mongólia e Rússia. Várias espécies de cavalos selvagens existiram, mas todas foram extintas, exceto *Equus f. przewalskii* e *Equus caballus*.

Segundo Jones & Bogart (1973), várias evidências sugerem que *Equus caballus* desenvolveu-se em duas linhas, que são referidas como tipo leve e tipo pesado. O cavalo tipo leve tinha uma face curta, um focinho estreito e corpo e pernas esguias. O cavalo tipo pesado tinha um crânio longo, estreito, com uma face proeminente, e ossos maciços no corpo e pernas. Alguns autores separam esses dois tipos gerais em quatro tipos, referidos como pônei tipo I, pônei tipo II, cavalo tipo I e cavalo tipo II (Edwards, 1993; Geddes, 1976).

Três tipos de cavalos selvagens pré-históricos são considerados como os ancestrais mais próximos do cavalo moderno: os cavalos da estepe, da floresta e do platô. Eles são considerados como sendo a base para a tremenda diversidade de cavalos domésticos de hoje em dia. Como as variedades atuais podem entrecruzar-se, é razoável supor que cruzamentos entre esses três tipos básicos, devem ter ocorrido bem antes do ser humano praticar qualquer forma de seleção (Silver, 1987).

O interesse do homem pelo cavalo parece ter um paralelo com o desenvolvimento da agricultura. Há 25 mil anos, o homem já decorava as paredes das cavernas com pinturas de cavalos, apesar de não haver evidências de domesticação nessa época (Jones & Bogart, 1973).

A domesticação do cavalo deve ter ocorrido entre 5 a 6 mil anos atrás, na Eurásia. Evidência recente nesse sentido foi obtida em um sítio de assentamento humano, no sul da Ucrânia, datado de 4200 a 3800 AC. A domesticação de bois, carneiros, cabras e porcos ocorreu anteriormente, provavelmente por sua função como fonte de alimento. Os cavalos devem ter sido domesticados mais pela sua função em transporte e na agricultura, o que era reforçado pelas suas qualidades naturais. Entre os animais de fazenda, foi o menos afetado pela manipulação e seleção praticadas pelo homem (Bowling & Ruvinsky, 2000).

---

Pelo menos duas sub-espécies de cavalos selvagens são consideradas no tempo histórico: *Equus ferus ferus* e *Equus ferus przewalskii*. *Equus f. ferus*, ou Tarpan, viveu em regiões do sul da Europa Oriental, até o século 19. O último exemplar do cavalo Tarpan morreu no zoológico de Moscou, em 1888. *E. f. przewalskii* é o cavalo selvagem da região oriental da Europa. O nome foi dado em homenagem ao seu descobridor, o naturalista russo Coronel N. M. Przewalski, que, pela primeira vez, observou cavalos selvagens no noroeste da China, próximo à fronteira com a Mongólia, em 1879. Considera-se que a linhagem que deu origem ao cavalo Tarpan foi a mesma que originou o cavalo doméstico moderno (Bowling & Ruvinsky, 2000). Segundo Silver (1987), não está definitivamente comprovado se os cavalos de camponeses da Polônia, atualmente chamados de Tarpan, são descendentes do verdadeiro cavalo Tarpan. O cavalo Przewalski também estaria extinto hoje, se um número deles não tivesse sido capturado na natureza, no início do século 20, e trazido para a Europa, onde se reproduziram em zoológicos e parques de vida selvagem. Com essa preservação, está ocorrendo sua reintrodução em parques da Mongólia.

Para muitos autores, *E.f. przewalskii* não está na linhagem que originou o cavalo doméstico. Uma das razões é a diferença no número de cromossomos. O cavalo Przewalski possui 66 cromossomos, enquanto o cavalo doméstico possui 64. Outra explicação advém de dados de comportamento, relacionados à dificuldade de domar cavalos Przewalski e zebras. Assim, considera-se que a linhagem que originou o cavalo Tarpan apresentava uma pré-adaptação à domesticação. Não há, entretanto, dados cariotípicos sobre o cavalo Tarpan, considerado extinto (Bowling & Ruvinsky, 2000).

O uso de cavalos provavelmente começou entre 3500-3000 AC, alcançando o Oriente Médio no terceiro milênio AC. No segundo milênio AC, os cavalos chegaram ao Egito e à Grécia. Cavalaria egípcia e carroças puxadas por cavalos são mencionadas na descrição bíblica de Exôdo.



---

Pode-se considerar a existência de 14 espécies, ou grupos específicos, incluindo-se as sub-espécies, no gênero *Equus*: *E. caballus* (cavalo doméstico), *E. ferus przewalskii* (cavalo selvagem Przewalski), *E. ferus ferus* (cavalo selvagem Tarpan, extinto), *E. asinus* (asno doméstico), *E. africanus somaliensis* (asno selvagem da Somália), *E. hemionus hemionus* (asno selvagem da Mongólia), *E. hemionus onager* (asno selvagem da Pérsia), *E. hemionus kulan* (asno selvagem do Mar Cáspio), *E. hemionus khur* (asno selvagem da Índia), *E. kiang* (asno selvagem do Tibet), *E. zebra* (zebra da montanha), *E. grevyi* (zebra imperial), *E. burchelli* (zebra comum) e *E. quagga* (quaga) (Chowdhary & Raudsepp, 2000).

Todos os cavalos Przewalski cariotipados têm o número diplóide de 66 cromossomos. Todas as raças de cavalos domésticos têm 64 cromossomos, com exceção de pôneis do Mar Cáspio, que apresentam polimorfismo no número diplóide, com 64 e 65 cromossomos. A diferença entre o cavalo Przewalski e o cavalo doméstico pode ser explicada pela fusão de dois acrocêntricos ou pela divisão de um metacêntrico, dependendo da direção evolutiva (Bowling & Ruvinsky, 2000).

Cruzamentos entre as espécies equídeas são comuns. O cruzamento mais popular é entre as espécies eqüina e asinina. Na época ou nos locais em que animais fortes para o trabalho eram uma necessidade, esse cruzamento foi muito utilizado, para se obter animais vigorosos. Cruzamentos entre outras espécies equídeas também produzem híbridos saudáveis, porém sem o vigor do híbrido visto em burros e mulas (Kaminski, 1979). Starr & Taggart (1992, p. 186) mostram os híbridos de cruzamentos, feitos com sucesso, entre cavalos e zebras, chamados zebróides.

Todos os híbridos são, entretanto, inférteis, devido ao não-balanceamento de cromossomos nas células sexuais. Na meiose do híbrido, a falta de homologia entre os complementos cromossômicos das duas espécies parentais origina gametas inviáveis. Entretanto, para o cruzamento entre o cavalo doméstico e o seu parente mais próximo, o

---

cavalo Przewalski, foram reportados híbridos férteis, o que foi interpretado como maior homologia entre os dois conjuntos cromossômicos (Jones & Bogart, 1973). Benirschke (1966; cf. Jones & Bogart, 1973), depois de estudar vários híbridos de mamíferos, concluiu que a falha na gametogênese é resultado da falha na formação das sinapses, ou, seja, é resultado de um pareamento incorreto entre os cromossomos. Apesar de serem numerosos os relatos de mulas férteis, esse autor comenta que nenhum deles foi bem documentado histologicamente. Em um estudo, ele analisou os pares de ovários de 47 mulas e encontrou poucos óvulos. Teoricamente, contudo, ele admite que seria possível os cromossomos da mula segregarem-se durante a meiose, tal que um gameta possua o material genético necessário para desenvolvimento e viabilidade. Ele conclui, portanto, que a possibilidade de uma mula ser fértil não pode ser descartada. Por outro lado, a similaridade na forma dos cromossomos ou número igual de cromossomos não significam que os híbridos serão férteis.

Nos cruzamentos entre as espécies eqüina e asinina, normalmente a égua é cruzada com um jumento, produzindo os híbridos mula (fêmea) e burro (macho). Nos casos menos comuns, em que a jumenta é coberta por um garanhão, o híbrido é denominado bardoto (macho e fêmea).

## **2.2 Raças de Eqüinos**

Classicamente, uma raça de animal doméstico representa um grupo distinto de animais, associado a uma área geográfica restrita, na qual ela se desenvolveu para atender às necessidades humanas, sob condições locais particulares. Além disso, diversas raças de eqüinos são controladas por Associações de Registro Genealógico, que mantêm os dados de filiação ou parentesco e determinam os padrões de seleção. A população mundial de eqüinos é calculada em cerca de 62 milhões. Cavalos com controle de registro genealógico representam

---

apenas 10% desse total. Cavalos não-registrados incluem os cavalos ferais e a grande maioria dos eqüinos usados em transporte e na agricultura (Bowling & Ruvinsky, 2000).

Segundo Mason, 1996 (cf. Bowling & Ruvinsky, 2000), existem cerca de 500 raças ou tipos de eqüinos, que incluem os cavalos propriamente ditos e os pôneis.

Silver (1987) descreve várias raças de eqüinos, dividindo-as inicialmente entre três tipos: pôneis, cavalos de sangue quente, ou tipo leve, e cavalos de sangue frio, ou tipo pesado.

De acordo com Edwards (1994), o que distingue basicamente os pôneis dos cavalos é a altura e a proporção do corpo. A altura dos eqüinos é medida até a cernelha. Os pôneis são pequenos, medindo até 150 cm de altura. Além dessa diferença, a proporção do corpo é distinta. Enquanto em um cavalo, como, por exemplo, da raça Puro Sangue Inglês, a distância da cernelha ao chão excede o comprimento do corpo e as pernas são maiores do que a circunferência do corpo, medida logo após os membros dianteiros, no pônei essa relação é ao contrário. Pode-se dizer que os pôneis têm os corpos mais compridos do que altos. Aceita-se em geral que os pôneis medem de 100 a 150 cm. Os pôneis podem ser considerados, portanto, como sendo um cavalo pequeno.

O cavalo leve (ou de sangue quente) apresenta aspectos de conformação que o torna especialmente adequado para ser montado pelo homem. A forma do dorso permite que uma sela seja colocada facilmente. O cavalo pesado (ou de sangue frio) dá a impressão de peso combinado com força, tendo sido selecionado e estando mais adaptado para a tração, para o trabalho. O cavalo leve mede de 150 a 170 cm de altura, enquanto o cavalo pesado mede de 160 a 180cm.

Bowling & Ruvinsky (2000) manifestam-se contrariamente à subdivisão baseada no tamanho (em pôneis, cavalos leves e cavalos pesados), ou baseada no temperamento (em cavalos de sangue quente e de sangue frio), por considerarem que esse esquema não é robusto,

---

nem coerente com todos os tipos existentes. Admitem, entretanto, que muitas vezes esses termos são úteis para descrever algumas raças.

Silver (1987) relata cerca de 60 raças ou tipos de pôneis, entre elas, Welsh Mountain, Exmoor, Shetland, Connemara e Hackney. Para os cavalos leves ou de sangue quente são descritas cerca de 89 raças ou tipos, entre elas Árabe, Berbere, Turkmene, Andaluz, Holstein, Criollo, Puro Sangue Inglês e Trakehner. Para os cavalos pesados ou de sangue frio são descritas cerca de 26 raças ou tipos, entre elas Percheron, Lipizanner, Ardennes, Shire e Suffolk. Diversas raças são consideradas como sendo fundadoras, por Jones & Bogart (1973), em contraposição às raças modernas, que se desenvolveram posteriormente.

### **2.3 Origem das Raças Mangalarga e Mangalarga Marchador**

A criação de equinos no Brasil começou após a introdução de cavalos oriundos da Península Ibérica, trazidos pelos colonizadores. Essa introdução ocorreu por volta de 1534, na Capitania de São Vicente, por Martim Afonso de Souza, em 1535, na Capitania de Pernambuco, por Duarte Coelho e em 1549, na Bahia, por Thomé de Souza. Com a vinda da Família Real Portuguesa ao Brasil, foram trazidos bons espécimes da Coudelaria Real de Álder de Chão, fato que desempenhou papel decisivo na formação das raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Os cavalos trazidos pelos colonizadores eram animais com alto grau de sangue da raça Berbere. Essa raça, também chamada de Bardo ou Cavallo do Norte Africano, teve sua origem na Ásia, mas formou-se efetivamente no Norte da África. Durante os seis séculos de invasão da Península Ibérica pelos mouros, os cavalos ibéricos foram grandemente impregnados com sangue da raça Berbere. Dessa forma, pode-se dizer que a raça Berbere teve grande influência para a formação do rebanho nacional. Alguns autores afirmam que os cavalos comuns nacionais são em sua grande maioria de origem Berbere. Como raça, entretanto, foram

---

trazidos exemplares das raças Andaluz e Álder. Além dessas duas raças mais importantes, houve também algumas introduções, em menor escala, de raças mais exóticas para nós, como, por exemplo, animais trazidos da Áustria, a pedido de Dona Leopoldina e cavalos da Alemanha, por Dom Pedro II.

Em 1819, duas cartas-régias criaram coudelarias, em São Paulo e Minas Gerais, objetivando o melhoramento dos cavalos criados no Brasil. A Coudelaria de Cachoeira do Campo, em Minas Gerais, foi de importância decisiva na formação da raça Mangalarga, pois os reprodutores da raça Álder, ali criados, foram muito utilizados pelos criadores da época, que, posteriormente, deram origem aos cavalos hoje conhecidos como Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Do ponto de vista qualitativo, o Andaluz e o Álder foram os principais formadores dos dois tipos de Mangalarga. Naquela época, o Andaluz era considerado o melhor cavalo de sela do mundo e o Álder, um subtipo do mesmo, embora com porte um pouco menor, possuía todas as qualidades como cavalo de sela. Assim sendo, reprodutores dessas duas raças foram os mais utilizados no rebanho de éguas que foi se formando no Brasil. Essa influência tornou-se ainda maior com a vinda da família Real Portuguesa ao Brasil, quando, em 1812, D. João VI presenteou um de seus garanhões da raça Álder ao Barão de Alfenas, Gabriel Francisco Junqueira. Este, fazendeiro abastado da região do Sul de Minas Gerais, iniciou um trabalho de seleção racial com o cruzamento do garanhão Álder com suas éguas andaluzas e crioulas.

Alguma introdução de raças diferentes deve ter acontecido durante as várias invasões, sendo lógico supor que alguma miscigenação tenha ocorrido com os animais aqui existentes. Mas, sem dúvida alguma, as maiores influências na formação do Mangalarga e do Mangalarga Marchador foram através das raças Andaluz e Álder.

As raças Mangalarga Marchador (Figura 1) e Mangalarga (Figura 2) são originárias do Sul de Minas Gerais, fruto do trabalho e dedicação da família Junqueira, nas regiões onde

---

hoje situam-se os municípios de Caxambu, Cruzília e cidades limítrofes. No início do século passado, a tradicional família Junqueira, em memorável epopéia, locomoveu-se do sul de Minas Gerais para o noroeste de São Paulo, em busca de melhores terras. Chegando ao Estado de São Paulo, a família Junqueira estabeleceu-se na região onde hoje localizam-se os municípios de Orlândia, Morro Agudo, São Joaquim da Barra e Ribeirão Preto. Os cavalos trazidos por eles eram de andamento marchado, muito macio em decorrência do pouco atrito e constante permanência dos membros em contato com o solo. Grandes distâncias eram percorridas a cavalo e animais de andamento macio eram os mais procurados. Naquela época, praticava-se a caça de veados, como lazer. Em São Paulo, a caça aos veados era feita em terreno de topografia mais plana e com veados maiores e mais velozes. Os criadores da época perceberam que precisavam de cavalos mais velozes e mais ágeis. A orientação de seleção passou a ser mais acurada, procurando-se animais mais equilibrados, de melhor galope e conseqüentemente de melhor conformação. Alguns cruzamentos foram realizados com raças exóticas tais como, Puro Sangue Inglês, Árabe, Anglo-Árabe e American Saddle horse. Como resultado dessa série de fatores, que incluiu terras mais férteis, melhor alimentação (que era feita ao pasto), seleção de animais mais bem conformados e equilibrados e os cruzamentos realizados, foram obtidos animais mais fortes, com melhores membros e garupa, com o andamento modificando-se para a marcha trotada, que passou a ser o andamento característico da raça Mangalarga. Um outro aspecto que se procurou desenvolver foi o de ter animais bons para o serviço de lida com o gado, particularmente em uma região em que a pecuária de corte estava se desenvolvendo.

Portanto, a seleção praticada visava produzir bons cavalos para o trabalho e para o esporte (na ocasião, a caça ao veado). Essa seleção deu origem a um tipo de cavalo diferente daquele oriundo das terras mineiras.

**FIGURA 1:** Mangalarga Marchador

**FIGURA 2:** Mangalarga

---

Em 1934, foi criada a Associação de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga, em São Paulo, que, mais tarde, passaria a ser chamada Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga. De 1934 a 1943, os animais foram inscritos em Livro Aberto de Registro Genealógico. A partir de dezembro de 1943, deu-se início ao registro em Livro Fechado, onde somente são registrados os animais filhos de pais também registrados.

Em Minas Gerais, a criação de cavalos Mangalarga continuou a ser orientada pelos padrões anteriores. Isso acarretou diferenças notáveis entre os assim chamados Cavalos Mangalarga de São Paulo e Cavalos Mangalarga de Minas Gerais. Com a criação da Associação em São Paulo, com definição do tipo racial, e, principalmente, com o fechamento do livro de registro, tornou-se difícil para o criador do Cavalos Mangalarga original conseguir registrar seus animais. Isso levou à formação de uma Associação independente.

Em uma reunião realizada em Caxambu (MG), em setembro de 1948, foi discutida a possibilidade de ser fundada uma Associação de Criadores do Cavalos Mangalarga Mineiro. Em julho de 1949, em Belo Horizonte, foi fundada oficialmente a Associação dos Criadores do Cavalos Marchador da Raça Mangalarga. O entrave para o nome era a já existente Associação dos Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga, criada em São Paulo, em 1934. Era necessário, portanto, qualificar o Mangalarga mineiro, que ficou então com o nome de Cavalos Marchador da Raça Mangalarga. Com o passar dos anos, essa raça foi reconhecida como Mangalarga Marchador e, finalmente a associação passou a ter o seu nome atual de Associação Brasileira dos Criadores do Cavalos Mangalarga Marchador. Em outubro de 1950 foi discutido o padrão racial do Cavalos Mangalarga Marchador, sendo que o ponto que mais causou controvérsia foi o andar, que somente em 1951 foi definido como: “marcha avante, batida ou picada, tanto quanto possível regular”. Foi estabelecido que os animais com andamento exclusivo de trote, marcha trotada e andadura estariam desclassificados para



---

registro. O fechamento do Livro de Registro de Machos ocorreu em dezembro de 1966 e do Livro de Registro de Fêmeas, em dezembro de 1984 (Carneiro et al., 1991; Bortoni, s.d.).

Os animais de ambas as raças são considerados cavalos de sela e apresentam várias características comuns. São selecionados para o trabalho e para o esporte, sendo animais de porte leve e musculatura forte. Todas as cores de pelagem são aceitas, sendo características o alazão e o castanho na raça Mangalarga e o tordilho e castanho na raça Mangalarga Marchador. A altura varia entre 1,37m a 1,57m nos animais Mangalarga Marchador e 1,47m a 1,57m nos animais Mangalarga.

A grande diferença inicial entre essas duas raças diz respeito ao tipo de andamento. Em Hipologia, considera-se que existem três tipos de andamentos naturais do cavalo, sendo eles passo, trote e galope. Os andamentos diferentes destes são considerados irregulares e artificiais, decorrentes de adestramento específico ou de defeitos de conformação. Os animais que deram origem às raças Mangalarga e Mangalarga Marchador foram submetidos a um conjunto de fatores, que incluíram ambiente inóspito e alimentação inadequada, que devem ter prejudicado sua conformação óssea e desenvolvimento muscular. Tudo isso provocou modificações nos andamentos regulares, dando origem aos andamentos irregulares, descritos como andadura, marcha picada e marcha batida (Bortoni, s.d.). O cavalo Mangalarga tem a marcha trotada, enquanto o Mangalarga Marchador, apresenta a marcha picada ou batida, como andamentos característicos. Atualmente esses tipos de andamento não são mais considerados como defeitos das raças, mas sim como andamentos característicos fixados geneticamente em cada uma delas.

## **2.4 Marcadores Genéticos**

Marcadores genéticos são características moleculares ou físicas, herdáveis, bem definidas, que apresentam variação em uma dada população. A variação deve ser explicada

---

geneticamente, segundo uma herança mendeliana. A caracterização de marcadores genéticos pode revelar o genótipo dos indivíduos estudados, a partir de seus fenótipos.

Grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos são marcadores genéticos tradicionalmente estudados no sangue de eqüinos.

O conhecimento dos grupos sanguíneos e dos polimorfismos bioquímicos representa um meio adequado para se investigar a variabilidade genética das populações. Devido ao seu caráter polimórfico, ao modo simples de herança, ao fato de não sofrerem a ação direta da seleção natural e à possibilidade de se testar um grande número de locos, eles prestam-se grandemente a estudos de caracterização racial e de comparação entre raças e populações.

O conhecimento da variabilidade genética de uma população ou de uma espécie, em termos de freqüências alélicas, representa uma forma de se conhecer a estrutura populacional, o que é ponto de partida para estudos mais amplos, tais como, a natureza das diferenças entre populações, as relações filogenéticas e a história evolutiva das populações e das raças (cf. Mortari, 1990).

#### **2.4.1 Grupos Sanguíneos**

Em 1900, Landsteiner descreveu os grupos sanguíneos ABO na espécie humana, com auxílio de anticorpos naturais anti-A e anti-B, fornecendo as bases para o conhecimento do primeiro sistema de grupos sanguíneos em qualquer espécie. Com essa descrição, Landsteiner demonstrou que as hemácias de indivíduos da mesma espécie não são idênticas, mas que exibem diferenças em seus constituintes da membrana. Igualmente importante, foi a observação, feita a seguir, de que essas diferenças eram geneticamente condicionadas, estando sob o controle dos alelos de um gene. No mesmo ano, em um experimento de interesse imunológico, Erlich e Morgenroth descreveram a ocorrência de determinantes antigênicos na membrana da hemácia ovina. Nesse trabalho, os autores relataram quatro especificidades

---

designadas por A, B, C e D. Em uma nota subsequente, Erlich definiu treze especificidades distintas, concluindo que as hemácias de cabra possuíam um grande número de receptores (determinantes antigênicos) em suas membranas (cf. Stormont, 1973).

Os trabalhos de Erlich e Mongenroth demonstraram dois aspectos importantes para o desenvolvimento do estudo de grupos sanguíneos. Primeiro, que a aloimunização era a maneira efetiva de se obter anticorpos contra determinantes antigênicos da membrana da hemácia. E, segundo, que o teste hemolítico era o teste indicado em espécies como cabras, bois e carneiros, nas quais a hemácia não é suscetível à aglutinação (cf. Mortari, 1990).

Entre os animais domésticos, foi com a espécie bovina que os primeiros resultados significativos sobre grupos sanguíneos foram obtidos, fruto dos trabalhos iniciados em 1938 na Universidade de Wisconsin, nos Estados Unidos, envolvendo principalmente Irwin, Ferguson, Stormont e Owen. Esses pesquisadores, utilizando técnicas de aloimunização, absorção e testes hemolíticos, produziram grande parte do conhecimento sobre grupos sanguíneos de bovinos (Mortari, 1990).

Os grupos sanguíneos representam aloantígenos da membrana da hemácia e, como tal, expressam uma variabilidade genética intra-específica. Eles são determinados geneticamente e apresentam herança mendeliana simples. A sua identificação leva ao conhecimento dos fenótipos dos indivíduos e, conseqüentemente, pode revelar seus genótipos.

Cada sistema de grupos sanguíneos é controlado, geralmente, por um gene, com pelo menos dois alelos segregando na população ou espécie, que apresentam uma relação de dominância / recessividade ou codominância. Os alelos dos sistemas de grupos sanguíneos controlam, direta ou indiretamente, a presença dos aloantígenos na membrana da hemácia. Sendo aloantígenos, os sistemas de grupos sanguíneos são intrinsecamente polimórficos. Por sua natureza de antígeno, essa categoria de marcadores genéticos tem sido classicamente determinada por meio de testes serológicos, que se baseiam na reação antígeno-anticorpo.

---

Dois tipos de testes serológicos são usados, aglutinação e hemólise. As hemácias são testadas frente a diferentes anticorpos. A reação entre o antígeno da membrana da hemácia e o anticorpo do soro pode ser visualizada de duas maneiras. Quando os anticorpos são aglutininas, a reação é revelada pela formação de um aglutinado visível. Quando os anticorpos são lisinas, a reação é detectada pela hemólise, a qual é dependente da adição de um terceiro componente à mistura; esse componente é o soro de coelho, que contém as enzimas do sistema complemento.

Uma única molécula da membrana da hemácia pode apresentar determinantes antigênicos, ou epítomos, diferentes. Na tipagem sanguínea de animais domésticos, cada epítomo é denominado fator sangüíneo, sendo caracterizado pelo anticorpo específico. Um conjunto de fatores sanguíneos presente em um antígeno e determinado por um único alelo é chamado de fenogruppo. Esse termo foi introduzido por Stormont (1955), para definir cada combinação de fatores transmitida pelo alelo de um único gene. Segundo Stormont (1972), esse termo foi empregado em substituição ao que estava sendo chamado de “complexos antigênicos”, para descartar a idéia de que representavam um bloco de substâncias antigênicas molecularmente separadas.

Os antígenos eritrocitários revelados nos animais domésticos mostram um arranjo expressivo de diferenças bioquímicas entre os indivíduos. Miller (1976) considerou algumas explicações para a diversidade e o papel biológico dos grupos sanguíneos. Uma delas é sua função como molécula de membrana, envolvida com o transporte e a interação celular; nesse caso, permanece sem explicação a razão de tantas formas alternativas. Uma outra explicação relaciona-se com o mimetismo molecular, que pressupõe o estabelecimento de interações entre parasita e hospedeiro. Do ponto de vista da espécie do hospedeiro, seria vantajoso manter uma grande variabilidade, para impedir a interação com um dado parasita. Do ponto de vista da espécie do parasita, a grande variação de antígenos do hospedeiro significaria

---

maior chance de mutação e adaptação a um deles. A grande diversidade dos grupos sanguíneos poderia ser explicada pela vantagem do heterozigoto.

#### **2.4.1.1 Grupos Sanguíneos em Eqüinos**

Em eqüinos, as primeiras tentativas de se estudar grupos sanguíneos foram feitas procurando-se anticorpos naturais que caracterizassem diferenças antigênicas da hemácia, à semelhança do que ocorrera na descoberta do sistema ABO. Esses estudos, publicados no final da década de 50, revelaram a presença de alguns antígenos, mas não tiveram continuidade (cf. Kelly, 1999). Um interesse maior pelos grupos sanguíneos de eqüinos foi causado pela descoberta de que a doença hemolítica do recém-nascido em cavalos e em híbridos eqüinos-asininos era provocada por uma imunização transplacentária, envolvendo antígenos da membrana das hemácias (Franks, 1962). Nesse trabalho, Franks identificou 11 fatores sanguíneos (antígenos) na hemácia eqüina, através de reagentes preparados a partir do soro de éguas imunizadas transplacentariamente. Ele concluiu, erroneamente, que cada fator era controlado por um gene, com um alelo de ação dominante, e que alguns desses genes estavam fortemente ligados.

A história dos grupos sanguíneos de cavalos pode, portanto, ser dividida em duas fases: a primeira, que precede e, a outra, que se segue à descoberta de que a doença hemolítica do potro recém-nascido, ou isoeritrólise neonatal, em cavalos e mulas, era provocada por uma imunização transplacentária.

A primeira fase, que se iniciou após a descoberta dos grupos sanguíneos ABO do homem, foi caracterizada pela busca de aloaglutininas naturais, como anti-A e anti-B, que permitiriam a classificação dos cavalos dentro dos quatro grupos: O, A, B e AB. Segundo Suzuki (1978), vários autores encontraram aglutininas naturais, que caracterizavam o que foi

---

interpretado como sendo quatro grupos, presumivelmente análogos aos grupos ABO do homem.

A segunda fase foi estimulada, em parte, pelo entendimento de que a doença hemolítica do potro recém-nascido possuía um caráter imunológico. Estudos de vários autores confirmaram o envolvimento de aloanticorpos na doença hemolítica do potro recém-nascido, em cavalos e nos híbridos, mulas e burros. A questão freqüente era se um fator sangüíneo de eqüinos, análogo ao fator Rh do homem, estava implicado na maioria dos casos de isoeritrólise neonatal em potros, ou se um número de fatores sangüíneos de eqüinos poderia ser quase igualmente responsável. Franks (1962) observou que um fator sangüíneo de eqüinos estava mais provavelmente envolvido em 82% dos 40 casos estudados e que, pelo menos, sete fatores adicionais também estavam implicados. A identificação desses fatores sangüíneos só foi possível com a determinação das especificidades serológicas e das bases genéticas dos grupos sangüíneos de cavalos (Suzuki, 1978).

A grande contribuição ao conhecimento dos grupos sangüíneos de cavalos, no entanto, foi dada por Stormont & Suzuki (1964) e por Stormont et al. (1964). Nesses dois trabalhos, os autores descreveram a ocorrência de 16 fatores sangüíneos, que foram designados A1, A2, A', C, D, H, J, K, P1, P2, P', Q, R, S, T e U. Realizando análise da segregação desses fatores nas famílias de 103 garanhões, com 639 descendentes e suas respectivas mães, os autores mostraram que os 16 fatores compreendiam oito sistemas genéticos, isto é, eram controlados por oito genes distintos. Esses sistemas foram designados A, C, D, K, P, Q, T e U, sendo os sistemas reconhecidos até hoje, com exceção de T. Os sistemas C, K, T e U apresentavam apenas um fator, com dois alelos. Os demais sistemas apresentavam mais de um fator e mais de dois alelos. Nesses trabalhos pioneiros, também foram apresentados dados sobre as freqüências alélicas em duas raças, pôneis Shetland e cavalos Puro Sangue Inglês. Essas pesquisas, desenvolvidas na Universidade da Califórnia, em Davis, foram bem sucedidas,

---

pois, pela experiência anterior com bovinos e ovinos, esse grupo de pesquisadores utilizou a técnica de aloimunização e heteroimunização para preparar anti-soros operacionalmente monoespecíficos, ao invés de se limitar a procurar anticorpos naturais ou anticorpos imunes no soro de éguas múltiparas.

Nas pesquisas iniciais, os fatores sanguíneos eram designados por uma letra maiúscula, seguida ou não de sub-índice numérico ou de apóstrofo. O sub-índice numérico correspondia a uma relação de subtipo linear; o apóstrofo correspondia a uma relação não-linear. Em 1974, em reunião da International Society for Animal Blood Groups Research (ISABR), uma nova nomenclatura foi adotada para os fatores sanguíneos de eqüinos, baseada naquela já usada em suínos (Anonymous, 1974). Cada fator passou a ser representado por uma letra maiúscula, indicando o sistema a que pertence, seguida por uma letra minúscula, indicando a sua especificidade antigênica. Nessa nomenclatura, os nomes dos fatores descritos até então foram mudados. Assim, por exemplo, os fatores A1, A' e H, do sistema A, passaram a ser designados como Aa, Ab e Ac; os fatores D, E1, E2, E2, J e Y, do sistema D, passaram a ser designados Da, Db, Dc, Dd, De e Df. Para os fatores descobertos depois dessa data, a nomenclatura moderna foi adotada.

Atualmente, 34 fatores sanguíneos, referentes a sete sistemas genéticos, são reconhecidos internacionalmente. Um fator sanguíneo tem reconhecimento internacional, quando, pelo menos dois laboratórios, de forma independente, produziram o reagente (anticorpo) específico para ele, o que é visto pelo padrão idêntico de reação em um Teste Comparativo Internacional, os quais são promovidos bianualmente pela sociedade internacional (ISABR/ISAG). Esses fatores e os sistemas a que pertencem são mostrados na Tabela 1, juntamente com os alelos reconhecidos pela International Society for Animal Genetics (ISAG, 1995, antiga ISABR). Os sistemas A e D são os mais complexos, pois os fatores são herdados em blocos, ou em fenogrupos.

Quanto ao tipo de reação serológica utilizada para sua identificação, os fatores dos sistemas A, C e K são definidos por reações de aglutinação e hemólise, o sistema D predominantemente por aglutinação, e os sistemas P, Q e U, predominantemente por hemólise.

O sistema T, relatado nos trabalhos iniciais, não teve reconhecimento internacional, pois, além da dificuldade em se reproduzir o reagente para o fator T em outros laboratórios, também não foi feita a comprovação de sua herança genética. Suzuki et al. (1978) relataram a descrição de dois novos fatores nesse sistema, V e W (cf. Sandberg, 1979).

**TABELA 1:** Sistemas de grupos sanguíneos de equinos:

SISTEMAS	FATORES	ALELOS ( FENOGRUPOS)
A	a,b,c,d,e,f,g	$A^a, A^{adf}, A^{adg}, A^{abdf}, A^{abdg}, A^b, A^{bc}, A^{bce}, A^c, A^{ce}, A^e, A^-$
C	a	$C^a, C^-$
D	a,b,c,d,e,f,g h,i,k,l,m,n, o,p,q,r	$D^{adl}, D^{adlnr}, D^{adlr}, D^{bcmq}, D^{cefgmq}, D^{cegimnq}, D^{cfgkm}, D^{cfmqr}, D^{cgm}, D^{cgmp}, D^{cgmq}, D^{cgmqr}, D^{cgmr}, D^{deklr}, D^{deloq}, D^{delq}, D^{dfklr}, D^{dghmp}, D^{dghmq}, D^{dghmqr}, D^{dkl}, D^{dlmq}, D^{dlnqr}, D^{dlqr}, D^q, (D^-)$
K	a	$K^a, K^-$
P	a,b,c,d	$P^a, P^{ac}, P^{acd}, P^{ad}, P^b, P^{bd}, P^d, P^-$
Q	a,b,c	$Q^{abc}, Q^{ac}, Q^a, Q^b, Q^c, Q^-$
U	a	$U^a, U^-$

### Sistema A:

Originalmente, o sistema A era composto por três fatores (Aa, Ab, Ac) e cinco alelos ( $A^a, A^b, A^c, A^{bc}$  e  $A^-$ ). Em seguida, foram descobertos os fatores Ae, Ad, Af e Ag. Acreditava-se que os fatores Aa e Ab eram produtos de alelos distintos, até que foram



---

encontrados os fenogrupos A<sup>abdg</sup>, nas raças Árabe, Paso Fino, Morgan e Poney, e A<sup>abdf</sup>, na raça Paso Fino. Atualmente, são reconhecidos sete fatores e 12 fenogrupos. Esse sistema está localizado no cromossomo 20, próximo ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (ELA) de eqüinos (cf. Kelly, 1999).

O fator Aa e o fator Qa estão predominantemente relacionados à incompatibilidade materno-fetal, que causa a doença hemolítica do potro recém-nascido (cf. Sandberg & Cothran, 2000).

### **Sistemas C, K e U:**

Cada um desses sistemas possui apenas um fator, com dois alelos. Um alelo de ação dominante controla a presença do fator na membrana da hemácia, enquanto que o outro, de ação recessiva, determina a sua ausência. Esses sistemas são considerados sistemas simples, com dominância (Stormont e Suzuki, 1964). Com relação ao sistema U, recentemente, Nogaj et al. (1997) descreveram três novos reagentes, Ua1, Ua2, Ua3, que mostraram uma relação linear entre si e com o fator Ua, já reconhecido, que chamaram de Ua4. Essa descrição tornaria o sistema U mais complexo, resultando em quatro fatores e cinco alelos.

### **Sistema D:**

Nos trabalhos iniciais de Stormont et al. (1964), dois fatores (D e J) foram descritos para o sistema D. Em 1973, Sandberg descreveu três novos fatores, designados E2, E' e Y. Junto com E1, descrito anteriormente, E2 e E' apresentavam uma relação serológica de subtipos linear e não-linear, respectivamente. Com essa descrição, o sistema expandia-se para o sistema mais complexo de eqüinos. Posteriormente, outros fatores foram descritos nesse sistema. .

---

Sandberg (1973) definiu esse sistema como fechado, através dos fatores Dc (E2) e Dd (E'), já que esses aparecem como características contrastantes, apresentando uma relação antitética, e não há indivíduos negativos para ambos os fatores.

Atualmente, esse sistema é composto por 17 fatores, que são herdados em blocos (ou fenogrupos). Um total de 25 fenogrupos do sistema D foi descrito nas várias raças.

A maioria dos fenogrupos do sistema D forma combinações que são reconhecidas nos genótipos heterozigotos. Há, entretanto, exceções, nas quais não se pode determinar o genótipo diretamente a partir do fenótipo. Um exemplo é o fenótipo deloq, que pode representar tanto o genótipo homozigoto deloq/deloq como o heterozigoto deloq/delq. A indeterminação, nesse exemplo, decorre do fato de que o fenótipo delq é mascarado por deloq. Existem outros fenogrupos novos neste sistema que ainda não foram incluídos na lista internacional, tais como: D<sup>adeo</sup>, encontrado em pôneis da raça Caspian no Irã e D<sup>dln0</sup> (Cothran e Long, 1994).

Alguns dados da literatura apontam que o sistema D pode não ser fechado entre os fatores Dc e Dd, devido à existência de alelos como D<sup>(c)eg</sup>, descrito por Kakoi et al. (1995), em um descendente de um garanhão Anglo-Árabe, e Dln0q (Bowling e Williams, 1991) e à possibilidade da presença de um alelo nulo, silencioso, D<sup>-</sup>. Estudando animais da raça Belga Canadense, Colling (1987) observou a ocorrência do alelo nulo, nesse sistema, em um garanhão cujas hemácias foram negativas para todos os reagentes testados. Através do estudo dos alelos presentes na linhagem parental e em descendentes do garanhão, ele concluiu que este havia transmitido o alelo nulo para dois de seus descendentes. Contudo, se esse alelo nulo estiver de fato segregando nas populações, devido à sua baixa frequência, e, portanto, à inexistência, até o momento, de indivíduos homozigotos, com genótipo d/d (-/-), a existência do alelo nulo ainda não está definitivamente confirmada.

---

**Sistema P:**

O sistema P apresenta quatro fatores (Pa, Pb, Pc e Pd) e oito alelos ( $P^a$ ,  $P^{ac}$ ,  $P^{acd}$ ,  $P^{ad}$ ,  $P^b$ ,  $P^{bd}$ ,  $P^d$ ,  $P^-$ ). Os fatores Pa e Pb apresentam uma relação antitética, sendo codificados por alelos distintos (Stormont & Suzuki, 1964). O fator Pd foi originalmente descrito como X, por Suzuki, em 1978. O fator Pc foi proposto por Bowling & Williams, em 1985.

**Sistema Q:**

Internacionalmente, esse sistema é reconhecido com três fatores (Qa, Qb e Qc) e cinco alelos ( $Q^{abc}$ ,  $Q^{ac}$ ,  $Q^b$ ,  $Q^c$ ,  $Q^-$ ) (cf. Sandberg, 1979).

**2.4.2 Polimorfismos Bioquímicos**

A detecção da variabilidade genética das proteínas demonstrou grande quantidade de polimorfismo nas populações. Os polimorfismos bioquímicos podem ser definidos como formas variantes de proteínas, geneticamente condicionadas. Nos animais, a investigação desse polimorfismo tem sido feita através da técnica de eletroforese usando-se como material, principalmente, as proteínas do sangue presentes no soro e nas hemácias, pela facilidade de obtenção desse material biológico e pela diversidade de proteínas que pode ser analisada.

O princípio da técnica de eletroforese baseia-se na existência de carga elétrica nas proteínas, em função da composição de aminoácidos que possuem e do pH do meio em que se encontram. Quando o pH do meio é menor do que o seu ponto isoelétrico, a proteína está positivamente carregada, e a migração ocorre em direção ao cátodo. Nesse caso, a proteína é considerada catódica. Quando o pH do meio é maior do que o seu ponto isoelétrico, a proteína está negativamente carregada, e a migração ocorre em direção ao ânodo. Nesse caso, a proteína é considerada anódica. Devido a essa propriedade, moléculas diferentes podem ser separadas quando submetidas a um campo elétrico. Quanto mais carga exibir a proteína, mais

---

rapidamente ela migrará no meio suporte. No ponto isoelétrico, as proteínas não apresentam carga líquida.

O conhecimento desses princípios permitiu o desenvolvimento de métodos para a separação das proteínas. O primeiro método, idealizado por Tiselius, em 1937, utilizava as proteínas em solução. Por esse método, qualquer efeito de aquecimento resultava em interrupção da separação das proteínas; além disso, a difusão continuava, após a eletroforese ter sido terminada, levando a uma separação mínima (cf. Hames e Ricwood, 1990). Para a minimização desses efeitos, foram utilizados meios suporte estáveis, preparados com uma solução-tampão, para que houvesse transmissão de corrente elétrica. Quando a solução-tampão utilizada no meio suporte é a mesma que a utilizada nas cubas, onde são colocados os eletrodos, o sistema eletroforético é chamado de contínuo. Quando a solução-tampão utilizada no meio suporte é diferente da que a utilizada nas cubas, o sistema eletroforético é chamado de descontínuo.

O primeiro meio suporte a ser usado foi o papel de filtro, em meados da década de 50. Praticamente na mesma época, introduziu-se o uso de gel, envolvendo inicialmente gel de ágar. Em 1955, Smithies introduziu o uso de gel de amido, e somente no final dessa década desenvolveu-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. (cf. Brewer, 1970).

A separação das proteínas, usando gel como meio suporte, é baseada na carga e tamanho dessas moléculas, em um pH selecionado, e na formação de poros no gel, os quais funcionam como um filtro na passagem das proteínas. O tamanho dos poros no gel de ágar é grande, tornando mínimo o efeito de filtração das proteínas. Nesse caso, a separação ocorre, principalmente, pelas diferenças de carga elétrica. Ao contrário, em um gel de amido ou de poliacrilamida, o tamanho dos poros pode ser planejado, o que torna o efeito de filtração pronunciado. As proteínas maiores são retardadas na migração, em relação às menores, e proteínas de mesma carga podem ser separadas com base no tamanho. A separação ou

---

migração das proteínas depende, portanto, da carga, do ponto isoelétrico, do tamanho e da conformação (cf. Mortari, 1990).

Em eqüinos, a técnica de eletroforese em gel de amido começou a ser aplicada a partir de 1963 com Stormont & Suzuki, que descreveram o polimorfismo da albumina. Gahne et al. (1977) desenvolveram a técnica em gel de poliacrilamida, que possibilitou a visualização fenotípica simultânea de várias proteínas séricas de bovinos. Essa técnica foi adaptada, para a visualização das proteínas do soro de equinos, por Juneja et al. (1978).

A variação molecular revelada pela eletroforese corresponde à variação genética, baseando-se no fato de que cada proteína, ou melhor, cada cadeia polipeptídica de uma proteína, é codificada por um gene estrutural, e que cada variante eletroforética dessa proteína é controlada por um alelo. Dessa forma, as alterações na mobilidade das proteínas refletem as modificações ocorridas nas seqüências codificadoras dos alelos dessas proteínas, os quais, por se expressarem codominantemente, revelam os genótipos através de fenótipos eletroforéticos.

Em 1979, Ryder et al. utilizaram o método da focalização isoelétrica (IEF) em eqüinos, para demonstração do polimorfismo da cadeia alfa da hemoglobina.

A técnica de focalização isoelétrica é considerada um tipo especial de eletroforese, apresentando, como diferença, uma variação de pH no gel. Na eletroforese convencional, o pH é constante, enquanto que, na focalização isoelétrica, há um gradiente de pH ao longo do gel. Dessa forma, a focalização isoelétrica pode ser definida como eletroforese em gradiente de pH. Esse gradiente é formado pela mistura de pequenos polímeros com multicargas, chamados de polianfólitos, os quais apresentam vários valores de pI. Com a corrida eletroforética, um gradiente de pH é estabelecido (cf. Stryer, 1995, p 48).

Para que ocorra a migração de uma molécula na técnica de IEF, esta precisa possuir a propriedade de anfólito, ou seja, precisa possuir carga elétrica, e essa carga tem que depender do pH do meio. Substâncias anfóteras são compostos que se dissociam em água, originando

---

íons  $H^+$  e  $OH^-$ , podendo, portanto, agir tanto como ácidos quanto como bases (cf. Morris, 1972).

O princípio da IEF consiste no fato de que uma proteína migra, enquanto o valor do pH do meio não atingir o ponto isoelétrico (pI) dessa proteína. Quando esse ponto é atingido, a migração cessa e a proteína concentra-se (ou focaliza) nesse ponto.

A metodologia eletroforética, apesar de ter sido aprimorada, apresenta ainda um poder resolutivo limitado. O total de locos polimórficos detectados representa uma estimativa, uma vez que nem toda variabilidade genética manifesta-se em variação protéica detectada por eletroforese. Além disso, alelos nulos podem não ser determinados. Atualmente, polimorfismo em 16 sistemas genéticos protéicos são reconhecidos em eqüinos, pela International Society for Animal Genetics (Tabela 2).

Serão descritos, a seguir, apenas os polimorfismos protéicos utilizados no presente trabalho.

#### **2.4.2.1 Albumina**

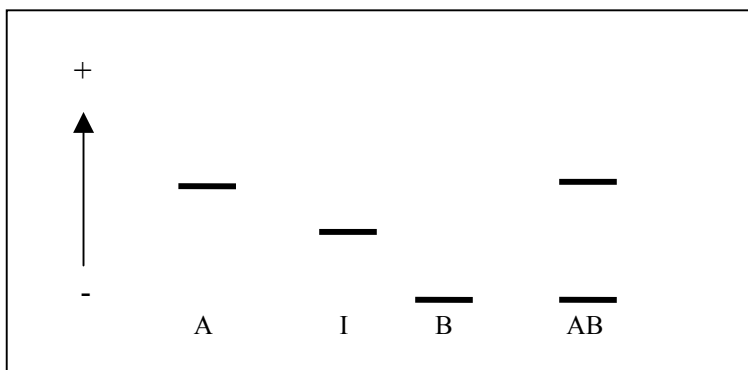
A albumina é uma proteína globular, com um peso molecular de 66 mil daltons, que constitui perto da metade das proteínas do soro sangüíneo. Através de interações não-covalentes, liga perto de 10 moléculas de ácidos graxos por monômero. Ligados a esta proteína solúvel, os ácidos graxos, de outra forma insolúveis, são transportados para os tecidos, onde dissociam-se da albumina e difundem-se para o citosol das células nas quais servirão como fonte de energia. Suas principais funções são manter a pressão osmótica e transportar íons e hormônios.

**TABELA 2.** Sistemas eletroforéticos de eqüinos reconhecidos.

<i>Sistemas</i>	<i>Símb. do loco</i>	<i>Alelos reconhecidos</i>
glicoproteína A1B	A1B	F, K, S
Albumina	Al	A, B, I
Fosfatase ácida	AP	F, S
Anidrase carbônica	CA	E, F, I, L, O, S
Catalase	Cat	F, S
NADH – diaforase	Dia	F, S
Carboxilaesterase	Es	F, G, H, I, (L), (M), O, R, S
Proteína ligante de vitamina D	Gc	F, S
Glucose fosfato isomerase	GPI	F, I, (L), S
Hemoglobina alfa	Hb	A, AII, BI, BII, (C), (N), (V)
Peptidase A	Pep A	F, S
6–fosfogluconato desidrogenase	PGD	D, F, S
Fosfoglucomutase	PGM	F, S, V
Inibidor de protease	Pi	F, G, H, I, K, L, L2, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, Z
Plasminogênio	PLG	1, 2
Transferrina	Tf	D, (D1, D2, D3), F1, F2, (F3), (G), H1, H2, J, M, O, R

ISAG (1992). Os parênteses indicam as variantes reconhecidas, mas que os dados familiares não foram publicados

O sistema da albumina foi um dos primeiros polimorfismo protéicos descritos em cavalos, por Stormont & Suzuki, 1963 (cf. Gahne, 1966). Os três fenótipos, observados através de eletroforese em gel de amido, foram atribuídos a dois alelos autossômicos codominantes, designados Al<sup>A</sup> e Al<sup>B</sup>. A migração rápida foi designada de zona A e a migração lenta de zona B (Figura 3). Braend e Efremov (1965) designaram a zona rápida de F e a zona lenta de S, introduzindo assim, uma nova nomenclatura (cf. Sandberg, 1972). Atualmente, a nomenclatura mais usada continua sendo A para a zona rápida e B para a zona lenta. Os alelos correspondentes são designados Al<sup>A</sup> e Al<sup>B</sup>.



**FIGURA 3:** Diagrama dos fenótipos da Albumina de acordo com a migração de seus alelos (A, B e I) e o sentido da mesma (do polo negativo ao polo positivo).

Sandberg (1972) encontrou um novo alelo no sistema da albumina. A nova zona, designada I, migra entre A e B, levemente mais próxima a A. Segundo esse autor, algumas técnicas usadas na determinação dos tipos de albumina não separaram suficientemente as zonas A e B, a ponto de revelarem a zona I. Como o sistema da albumina é freqüentemente usado na análise de parentesco, esse fato deve ser levado em conta, para não se correr o risco de uma falsa exclusão nesse sistema.

#### 2.4.2.2 Transferrina

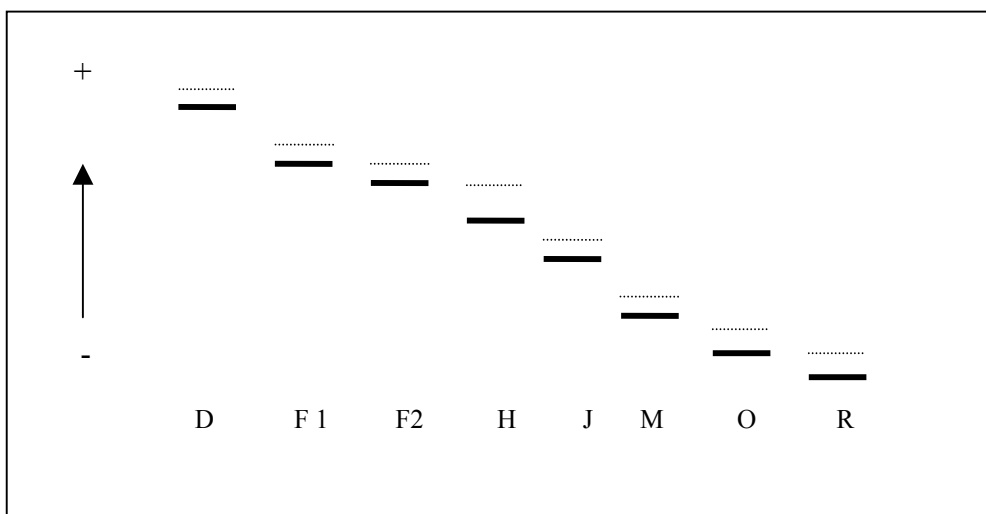
Na fração beta-globulínica do soro, encontram-se as transferrinas. Essas proteínas têm por função o transporte de ferro no organismo e apresentam ação bacteriostática, por impedir que as bactérias tenham acesso ao ferro. Dentre os vertebrados não-humanos, as variantes de transferrina bovina foram as primeiras a serem descobertas e estudadas intensivamente (Lush, 1966).

A heterogeneidade da transferrina ocorre em muitas espécies de vertebrados. O entendimento dessa heterogeneidade, em termos de detalhes da composição química, ainda é precário. Possivelmente, as transferrinas são heterogêneas devido ao conteúdo dos



carboidratos. De acordo com estudos de Stratil et al. (1984), as transferrinas eqüinas têm dois componentes principais, com peso molecular de 75.200 e 80.500 daltons. A composição de aminoácidos de ambos os componentes nas extremidades N- e C-terminal é similar, havendo diferenças na composição de carboidratos, um contendo dois resíduos de ácido siálico (componente catódico) e o outro, componente principal, contendo quatro resíduos (banda mais forte, anódica).

Em eqüinos, o sistema da transferrina é um dos mais polimórficos, tendo 14 alelos reconhecidos, sendo oito os mais comuns. Cada alelo apresenta uma forte banda catódica e uma fraca banda anódica. As primeiras variantes descritas foram: D, F1, F2, F3, G, H, J, M, O, R E X (Cothran et al.; 1991; Kelly, 1999; Scott, 1970). A Tf<sup>H</sup> foi subdividida em H1 e H2, sendo ambas mais catódicas que D, com H1 sendo mais anódica que H2 (Bell et al., 1988). Recentemente, Niini et al. (1997) detectaram uma nova variante em uma família de cavalos Finlandeses, que denominaram Tf<sup>N</sup>. Essa variante é atípica, pois apresenta uma banda simples e fraca, que migra ligeiramente mais rápido que a banda anódica de Tf<sup>M</sup>, a pH 9, não possuindo banda catódica (Figura 4).



**FIGURA 4:** Diagrama dos fenótipos da Transferrina segundo a migração dos alelos (D, F1, F2, H, J, M, O e R).

---

Nesse sistema, distinguem-se D, F1, F2, H e J como variantes de migração mais rápida, e M, O e R, como variantes de migração mais lenta (Braend & Stormont, 1964). Segundo Bowling (1996), os alelos mais encontrados em todas as raças são D e F2. As frequências alélicas variam segundo as raças, sendo D e F as variantes mais frequentes nos cavalos ligeiros (PSC, Árabe) e H, mais frequente nos cavalos Breton e Hispano-Breton.

Em um teste de rotina de tipagem sanguínea, Schmid et al. (1990) encontraram evidências da presença de um alelo silencioso no sistema da transferrina. Testando uma família de animais da raça Puro Sangue Inglês, eles confrontaram-se com uma exclusão devido à ausência da banda F<sub>1</sub>, sendo que em todos os outros sistemas testados o produto era compatível com os pais. Os autores concluíram que a mãe possuía um alelo silencioso no loco da transferrina e que esse alelo foi transmitido para cinco de seus produtos. Através de estudos imunoeletroforéticos quantitativos, concluíram que a quantidade de transferrina presente nos animais que apresentavam o alelo nulo era a metade da quantidade presente nos animais que não apresentavam esse alelo. Nesse mesmo trabalho, foi encontrado que a quantidade de transferrina difere em animais jovens e velhos, sendo significativamente maior no soro dos potros do que no soro de animais adultos. Essas diferenças no nível de transferrina não afetam sua capacidade de ligar-se ao ferro, não afetando fisiologicamente os animais. Isso ocorre porque somente um terço da quantidade de transferrina existente no organismo é necessária para que o metabolismo seja normal. Entretanto, animais homozigotos para o alelo silencioso possuem uma completa deficiência de transferrina, o que pode causar um efeito adverso no transporte de ferro.

---

### 2.4.2.3 Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína mais abundante nas hemácias de mamíferos, constituindo mais de 95% do total de proteínas solúveis (cf. Mortari, 1990). É determinada por uma família multigênica constituída por vários genes similares, resultantes de um processo evolutivo, a partir de um gene ancestral. (cf. Kelly, 1999).

Nos eqüinos, assim como em humanos, e, provavelmente, nos mamíferos em geral, a hemoglobina dos adultos é um heterotetrâmero, constituída por duas cadeias de  $\alpha$ -globina e duas de  $\beta$ -globina, unidas em um arranjo aproximadamente tetraédrico, com um cofator heme ligado a cada uma das cadeias. Cada tipo de globina,  $\alpha$  e  $\beta$ , pertence a uma família gênica, cujos produtos polipeptídicos diferem entre si por uns poucos aminoácidos. Os genes da família da alfa-globina humana são:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\zeta$ . Os genes da família beta-globina são:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ . Os tipos de globinas  $\alpha$  são:  $\alpha_1, \alpha_2$  e  $\zeta$  e as globinas  $\beta$  são:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (Brown, 1992). Dentro delas existem alguns pseudogenes como  $\psi\beta_1$  e  $\psi\alpha_1$ . Sua molécula é esférica com um diâmetro de aproximadamente 5,5 nm. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  contém vários segmentos de  $\alpha$ -hélice separados por curvas e exibem uma estrutura terciária formada por um único polipeptídeo (cf. Kelly, 1999).

A função da molécula de hemoglobina é o transporte de oxigênio no organismo. Sua molécula se liga ao oxigênio através da formação de um complexo de coordenação com o átomo de ferro do grupo M (o oxigênio não está ligado ao ferro, mas sim coordenado).

A afinidade do oxigênio livre depende do pH do meio para se coordenar ao ferro. Quando há uma mudança no pH, a molécula de hemoglobina sai de um estado tenso (coordenada ao  $O_2$ ) para um estado relaxado (libera  $O_2$ ).

Em eqüinos, o polimorfismo da hemoglobina deve-se exclusivamente a diferenças na duplicação dos genes que codificam as cadeias de  $\alpha$ -globina. Nenhum polimorfismo tem sido

---

reportado no loco das cadeias  $\beta$ -globina (Clegg et al, 1984). O gene  $\alpha$  da hemoglobina está mapeado no cromossomo 13q (cf. Kelly, 1999).

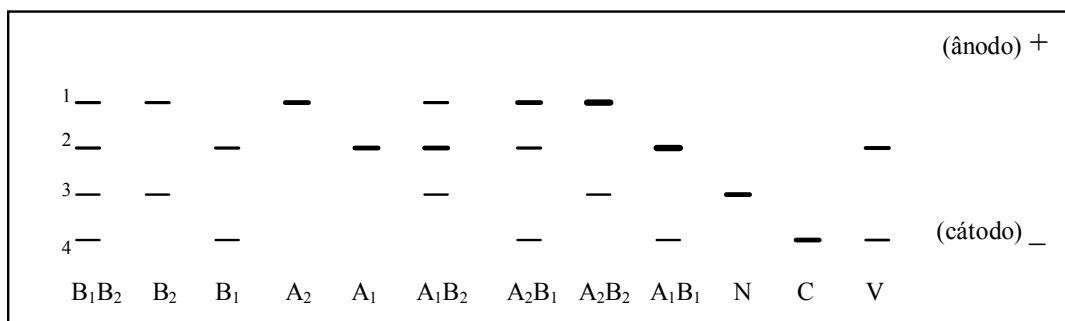
Os cavalos normais possuem dois genes de  $\alpha$ - globina separados por 5kb e flanqueados por um gene embrionário ( $\zeta$ ) na extremidade 5' e um pseudogene  $\alpha$  ( $\psi\alpha$ ) na extremidade 3'.

Em eletroforese em gel de amido somente hemoglobinas com cargas elétricas diferentes causadas pelas variações entre os aminoácidos da posição 60, eram detectadas. Essa limitação da técnica ocasionava apenas a separação das cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  não tornando possível a visualização dos diferentes haplótipos. Com o surgimento da técnica de focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida os seguintes haplótipos puderam ser claramente distinguidos: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, N e V.

Inicialmente foram descritos dois haplótipos principais (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) que codificam as cadeias  $\alpha$ - globina e que estão presentes em todas as raças eqüinas. Esses haplótipos diferem de acordo com o aminoácido codificado na posição 24 da cadeia polipeptídica. O haplótipo B<sub>1</sub> codifica para tirosina e o haplótipo B<sub>2</sub> codifica para fenilalanina. Já as cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  desses haplótipos diferem entre si pela variação dos aminoácidos lisina e glutamina na posição 60 da cadeia polipeptídica (Figura 5). Na extremidade 5', o gene  $\alpha_2$  codifica uma cadeia contendo glutamina na posição 60 e na extremidade 3' o gene  $\alpha_1$  codifica uma cadeia contendo lisina nesta mesma posição (cf. Bowling et al. 1988). Sendo que os haplótipos B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> codificam duas cadeias  $\alpha$  diferentes, cada um apresenta dois componentes eletroforéticos para os indivíduos homozigotos. O componente correspondente a cadeia  $\alpha_2$  mais anódico e o correspondente a cadeia  $\alpha_1$  mais catódico. Esses componentes possuem taxas de expressão na proporção de aproximadamente 60:40 (Figura 6).

O haplótipo A foi descrito por Clegg (1970). Os dois locos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  codificam duas cadeias  $\alpha$ - globinas iguais com tirosina na posição 24 e glutamina na posição 60. Esse





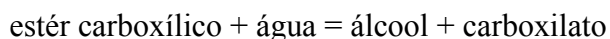
**FIGURA 6:** Esquema dos haplótipos de hemoglobina como vistos na técnica de focalização isoeletrica.

Estudando animais da raça Árabe, Bowling et al. (1988) descreveram um novo haplótipo raro denominado V. Os autores notaram a presença de um haplótipo no qual a expressão do gene  $\alpha_2$  era significativamente maior do que a do haplótipo B<sub>1</sub> normal. Através de análises peptídicas os autores confirmaram que o novo haplótipo era uma variante do haplótipo B<sub>1</sub> o qual continha três cadeias  $\alpha$ , sendo duas cadeias  $\alpha_2$  iguais a cadeia  $\alpha_2$  do haplótipo B<sub>1</sub> e uma cadeia  $\alpha_1$ . A formação do haplótipo V pode ter ocorrido pela duplicação do gene  $\alpha_2$  do haplótipo B<sub>1</sub> ou pela inserção de um gene  $\alpha$  adicional com a estrutura idêntica aos genes que codificam as cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ .

Outros haplótipos raros tais como C e N também foram descritos. O loco  $\alpha$  codifica duas cadeias  $\alpha$  iguais contendo tirosina na posição 24 e lisina na posição 60 para o haplótipo C ou duas cadeias iguais contendo fenilalanina na posição 24 e lisina na posição 60 para o haplótipo N (cf. Bowling et al. 1988).

#### 2.4.2.4 Carboxilesterase

A enzima carboxilesterase pertence à um grupo de enzimas amplamente distribuídas nos tecidos e com uma ampla especificidade. É a enzima catalizadora da seguinte reação:

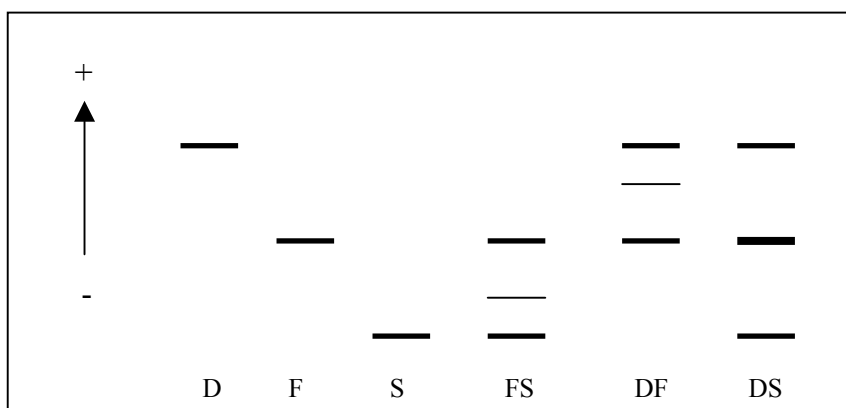




### 2.4.2.5 6-Fosfogluconato desidrogenase (PGD)

Essa enzima possui uma estrutura dimérica e apresenta três alelos codominantes: D, F e S. O alelo D é mais anódico e o S é mais catódico. Os fenótipos homozigotos são homodímeros e aparecem no gel com uma só banda. Os fenótipos heterozigotos produzem três bandas (Figura 8) formadas por dois alelos diferentes que produzem dois polipeptídeos diferentes que se associam formando 50% de heterodímeros (banda intermediária) e 25% de homodímeros para cada um dos dois polipeptídeos (cf. Kelly, 1999).

O gene que codifica para a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase encontra-se no cromossomo 2p ligado ao gene que codifica o grupo sanguíneos K que pertence ao grupo de ligação I (cf. Kelly, 1999).



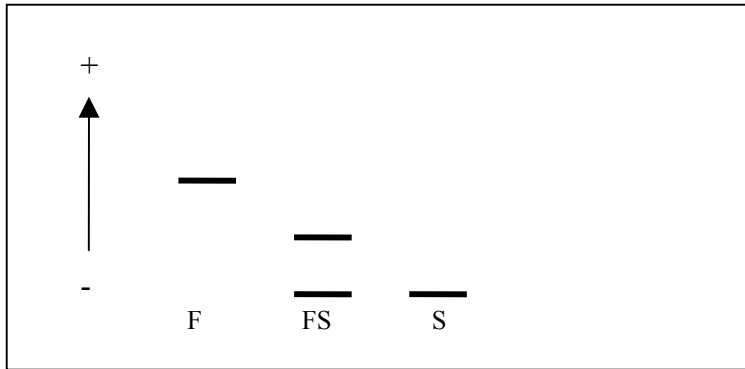
**FIGURA 8:** Diagrama dos fenótipos de PGD segundo a migração dos alelos (D, F e S).

### 2.4.2.6 Proteína ligante de à vitamina D (Gc)

O sistema Gc (componente grupo específico) foi descrito por Juneja et al. (1978) e corresponde a uma proteína carregadora ligada à vitamina D. Esse sistema compreende dois alelos autossômicos codominantes designados por F e S (Fig. 9). Os autores observaram que o loco da albumina é ligado ao loco da proteína Gc em humanos e em cavalos. A ocorrência dessa ligação em espécies tão diferente demonstra a ocorrência de um segmento cromossômico que tem sido conservado durante o curso da evolução.



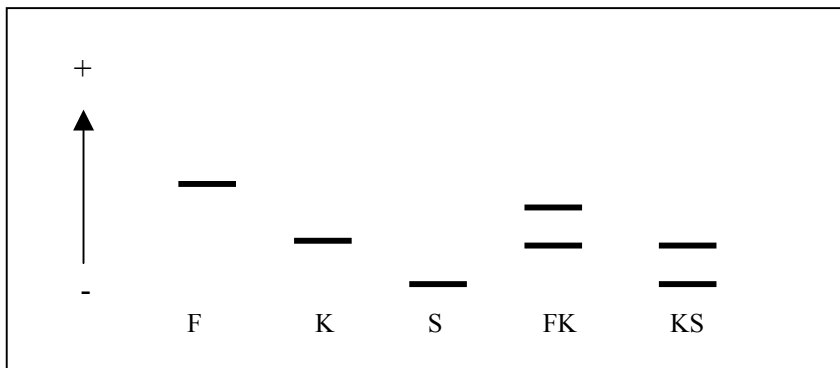
Um novo alelo denominado D foi descrito por Ouragh e Juneja (1994a) na raça Berbere, apresentando-se mais anódico que a banda F, parecendo ser característico dessa raça. O sistema Gc é pouco polimórfico em cavalos tendo como predominante o alelo F.



**FIGURA 9:** Diagrama dos fenótipos de Gc segundo a migração de seus alelos F e S

#### 2.4.2.7 Glicoproteína A1B

A glicoproteína A1B (alfa 1 glicoproteína) apresenta três alelos, F, K e S, com muito pouca variabilidade genética em diferentes raças eqüinas. Primeiramente esse sistema era chamado de pós-albumina até que Juneja et al. (1978) a denominaram A1B. Seus alelos visualizam-se como bandas únicas, sendo a variante F de migração mais rápida, a variante K intermediária e a S lenta (Figura 10).



**FIGURA 10:** Diagrama dos fenótipos do sistema A1B com seus alelos F, K e S

---

O gene que codifica a glicoproteína A1B está localizado no grupo de ligação IV no cromossomo 10 (Weitkamps et al., 1982).

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

Os cavalos estudados nesse trabalho foram tipados pelo Laboratório de Imunogenética, da Universidade Federal de São Carlos, dentro do serviço de tipagem sanguínea de eqüinos, oferecido às várias Associações de Raças. Tanto a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga, como a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador mantêm programas de tipagem sanguínea, como um meio auxiliar para garantir maior veracidade ao registro genealógico. Esses programas incluem a tipagem de animais premiados em exposições, ganhões, produtos de transferência de embrião e produtos com irregularidade no processo de registro. No geral, portanto, são tipados reprodutores (ganhões e éguas) e produtos, esses últimos com a finalidade de verificação de parentesco, ou seja, de filiação.

A amostra estudada incluiu 680 animais, de cada uma das raças, Mangalarga e Mangalarga Marchador. Todos são animais registrados junto ao Serviço de Registro Genealógico, da respectiva Associação. Esses animais foram tipados no período entre janeiro de 1999 e janeiro de 2001, para a raça Mangalarga e, setembro a dezembro de 2001, para a raça Mangalarga Marchador. O período maior relativo à raça Mangalarga deve-se ao fato de um menor número de animais dessa raça ter sido tipado pelo laboratório. Nos períodos considerados, foram tipados 1660 e 1221 animais das raças Mangalarga e Mangalarga Marchador, respectivamente. Para compor a amostra, a partir dos animais tipados nesses períodos, foram selecionados machos e fêmeas adultos, em idade reprodutiva. Foram excluídos os animais tipados como produtos (filhos), com a finalidade precípua de verificação de parentesco. O critério de seleção da amostra foi adotado no sentido de se ter uma amostra casual, evitando-se uma estrutura familiar deliberada. Entretanto, alguma sobreposição de geração (relações do tipo pais-filhos) pode ocorrer na amostra, em consequência da estrutura

---

natural dos rebanhos de eqüinos. Os animais são provenientes de inúmeras fazendas, na sua maioria localizadas nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil.

### **3.2 Coleta do Sangue.**

As amostras de sangue foram coletadas por técnicos credenciados pelas Associações, e enviadas para teste, de acordo com instruções fornecidas pelo laboratório.

O sangue foi coletado da veia jugular, através de uma agulha com dupla extremidade, que permite perfurar, ao mesmo tempo, a veia do animal e a rolha de plástico que fecha o tubo de ensaio, fechado a vácuo. De cada animal foram coletados dois tubos, de 10 mL, um deles com e o outro sem anticoagulante. Os tubos com anticoagulante continham heparina ou ACD (ácido cítrico/citrato/dextrose). Na coleta, os tubos foram rotulados com o nome e/ou o número do animal coletado.

As amostras foram transportadas refrigeradas para o laboratório, em mãos ou pelo correio. O período de tempo entre a coleta e a chegada ao laboratório não excedeu a três dias, na maioria dos casos. No laboratório, as amostras receberam um código e foram devidamente catalogadas.

Os tubos contendo o sangue total, não coagulado, serviram como fonte de hemácias para os testes serológicos, os quais foram realizados, no máximo, até três dias após a chegada ao laboratório e, durante esse período, estiveram conservados em geladeira, a cerca de 4°C.

Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados para a separação do soro logo após sua chegada ao laboratório. Os soros e o restante das hemácias lavadas usadas no teste serológico foram estocados em tubos devidamente rotulados, a cerca de -20°C, para serem usados nos testes eletroforéticos.

---

### **3.3 Marcadores Genéticos Estudados**

Nesse trabalho, estudou-se a variabilidade genética em oito sistemas de grupos sanguíneos (A, C, D, K, P, Q, U e T) e sete sistemas de polimorfismos bioquímicos (A1B, albumina, esterase, Gc, hemoglobina, 6-PGD e transferrina). Para a raça Mangalarga Marchador, toda a amostra foi testada para os 15 locos estudados. Com relação à raça Mangalarga, para alguns locos de polimorfismo bioquímico, um número menor de animais foi testado. Com essa redução, 522 animais foram testados para A1B, Gc e Tf e, 475, para a Hb.

### **3.4 Técnicas Serológicas**

Todos os animais da amostra foram submetidos a testes serológicos, para a identificação de 27 fatores, de oito sistemas de grupos sanguíneos - sistemas A, C, D, K, P, Q, U e T. Esse último sistema, conforme mencionado anteriormente, não tem reconhecimento internacional. Os grupos sanguíneos foram caracterizados por meio de testes de aglutinação e de hemólise, usando-se soro de coelho como fonte de complemento.

#### **3.4.1 Teste de Aglutinação e Teste Hemolítico**

Um total de 27 fatores sanguíneos, referentes a oito sistemas de grupos sanguíneos, foi testado, utilizando-se uma bateria com 45 reagentes. Sempre que disponível, dois reagentes foram testados para um mesmo fator. A relação dos fatores testados, com o tipo de reação serológica e o número de reagentes utilizados, é mostrada na Tabela 3. Os reagentes foram produzidos pelo Laboratório de Imunogenética, da Universidade Federal de São Carlos. Os testes de hemólise e de aglutinação foram realizados de acordo com as técnicas originais, descritas por Stormont e Suzuki (1964), com modificações.

**TABELA 3:** Fatores sanguíneos testados e o número de reagentes correspondentes para os testes de hemólise (H) e de aglutinação (A).

Fatores	Reagentes	Fatores	Reagentes
Aa	1 (H) 1 (A)	Dk	1 (A)
Ab	2 (H)	Dl	1 (A)
Ac	2 (H) 2 (A)	Do	1 (A)
Ag	1 (A)	Ka	2 (A)
Ca	1 (H) 1 (A)	Pa	1 (H)
Da	2 (A)	Pb	1 (H)
Db	2 (A)	Pd	2 (H)
Dc	1 (A)	Qa	2 (H)
Dd	1 (A)	Qb	2 (H)
De	2 (A)	Qc	1 (H)
Df	2 (A)	Ua	2 (H)
Dg	1 (A)	TV	1 (H)
Dh	2 (A)	TW	1 (H)
Di	1 (A)		

Salina fisiológica (NaCl a 0.91%, com 2% de dextrose) foi usada para lavar e preparar a suspensão das hemácias. Para a montagem dos testes, foram utilizadas placas de titulação, com 8 x 12 cavidades, de fundo em U. Os vários componentes foram colocados nas placas, por meio de uma pipetadora automática, de 96 canais, que libera 25µL por canal. No teste de aglutinação, foram adicionados, em cada cavidade, 50µL de um reagente específico e 25µL de suspensão de hemácias. Para o teste hemolítico, colocou-se, após a adição das hemácias, 25µL de complemento. Após a montagem, as placas foram colocadas em um agitador, para misturar os componentes. As placas foram mantidas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

---

Foram realizadas três leituras das reações, para cada teste. No teste hemolítico, as leituras foram feitas a intervalos de 30, 90 e 150 minutos, após a montagem. Após cada leitura, as placas eram novamente agitadas. No teste de aglutinação, a primeira leitura foi realizada 120 minutos após a montagem, as placas foram agitadas e, após 10 minutos, foi realizada a segunda leitura. A primeira leitura mostra a intensidade da aglutinação, após total sedimentação das hemácias, enquanto a segunda, mostra o efeito da aglutinação sobre a velocidade de sedimentação das hemácias. A terceira leitura foi feita após 60 minutos, sem agitar as placas. Todas as leituras foram feitas a olho nu, por observação da reação vista no fundo da placa, refletida em um espelho com aumento. Os resultados foram anotados de acordo com o grau de hemólise ou aglutinação das células, variando de **0** (nenhuma reação visível) a **4** (reação completa), para a hemólise e de **0** (nenhuma reação visível) a **2** (reação intensa), para aglutinação. Graus intermediários foram registrados como **tr** (traços de reação), **1** (10 a 30% de hemácias lisadas), **2** (40 a 60% de hemácias lisadas) e **3** (70 a 90% de hemácias lisadas) ou **tr** (traços de aglutinação) e **1** (aglutinação fraca). Duas pessoas revezaram-se nas leituras, com uma pessoa lendo o teste e a outra anotando os resultados.

As reações duvidosas foram repetidas, e no caso de não esclarecidas, estas foram excluídas individualmente da análise, ou seja, excluiu-se apenas o dado referente àquele fator e não o animal como um todo.

### **3.4.2 Produção dos Reagentes**

Por não serem comercializados, os reagentes foram produzidos pelo próprio laboratório. Os reagentes são anti-soros policlonais, operacionalmente monoespecíficos, obtidos a partir de técnicas de imunização, injetando-se sangue de um animal em outro. Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram obtidos por aloimunização. Os

---

procedimentos de imunização foram baseados em métodos descritos por Stormont e Suzuki (1964), com algumas modificações.

O procedimento de aloimunização envolveu a injeção de hemácias de um equino doador em um receptor da mesma espécie, para estimular o sistema imune do receptor a produzir anticorpos contra os fatores sangüíneos do doador que não lhe são próprios. Normalmente, quando são feitas as aloimunizações, já se tem o conhecimento prévio das especificidades de anticorpos que serão produzidos pelo receptor. Esse conhecimento baseia-se na tipagem prévia dos animais doadores e receptores.

Nas aloimunizações, foram feitas de 5 a 8 injeções endovenosas, de 50 mL de suspensão de hemácias, a 50%, em salina fisiológica, uma por semana. Nos procedimentos mais recentes, fazia-se, conjuntamente, injeção intramuscular de 3mL, da mesma suspensão, algumas vezes com adjuvante de Freund, para maximizar a resposta imune. O acompanhamento da produção de anticorpos foi realizado pela análise, em diluições sucessivas, do soro coletado semanalmente. Quando a resposta imune era considerada satisfatória, um volume maior de sangue era coletado do receptor (cerca de 500 a 1000 mL).

A obtenção do anti-soro foi feita de diferentes maneiras ao longo do trabalho do laboratório. Inicialmente, o soro era obtido diretamente do sangue, coletado sem anticoagulante, em frascos de vidro, após contração do coágulo e centrifugação do líquido obtido. Posteriormente, adotou-se o procedimento de coletar o sangue com anticoagulante. O plasma obtido era convertido em soro, recompondo-se as concentrações de íons cálcio e magnésio. Mais recentemente, o sangue tem sido coletado sem anticoagulante e, em seguida, colocado horizontalmente em bolsas de plástico, cuja maior superfície de contato, promove maior contração do coágulo e, conseqüentemente, maior liberação e aproveitamento do soro.

O anti-soro obtido foi separado e colocado em banho de água, a 56°C por 30 minutos, para a inativação das enzimas do sistema complemento, e estocado à -20°C.



---

A obtenção de reagentes de tipagem dos grupos sanguíneos é feita pela análise extensiva desses anti-soros. Essa análise refere-se basicamente a procedimentos serológicos de titulação e de absorção.

A absorção envolve a separação das várias especificidades dos anticorpos, que porventura foram produzidos, com vistas à preparação de soros (reagentes) operacionalmente monoespecíficos. A absorção foi realizada adicionando-se, ao anti-soro, hemácias eqüinas que continham, em sua membrana, antígenos específicos para os anticorpos que seriam descartados. Os anticorpos com tal especificidade ligam-se aos antígenos da membrana das hemácias e sedimentam-se, com a centrifugação, restando, no sobrenadante, os anticorpos não específicos àqueles antígenos. Esse procedimento foi realizado até a obtenção de um soro operacionalmente monoespecífico.

Os reagentes usados nesse trabalho foram participaram dos Testes Comparativos, promovidos bianualmente pela International Society of Animal Genetics.

### **3.4.3 Complemento**

O sistema complemento, encontrado normalmente no plasma de vertebrados, consiste de um grupo de proteínas séricas, que, em sua maioria, apresentam atividade proteolítica. Esse sistema complementa, de forma inespecífica, a ação dos anticorpos. As enzimas que constituem o sistema complemento encontram-se em sua forma inativa. Uma das vias de ativação, chamada via clássica, ocorre após a formação do complexo antígeno-anticorpo. Se o antígeno estiver na membrana de uma célula, o sistema complemento promoverá a lise dessa célula-alvo (cf. Kuby, 1997). Assim, sua ação no teste hemolítico é a de promover lesões na membrana das hemácias, nos locais onde os anticorpos estão ligados aos antígenos. A ocorrência de hemólise indica que o animal é positivo para o fator testado, ou seja, que ele expressa esse fator na membrana da hemácia.

---

Para a tipagem dos grupos sanguíneos de eqüinos, foi usado, como fonte de complemento, o soro de coelhos da raça Nova Zelândia, criados pelo Laboratório de Imunogenética. As coletas foram realizadas a intervalos, de pelo menos 40 dias, sendo retirados 50mL de sangue, por punção cardíaca, com aproveitamento de soro de cerca da metade.

Antes de ser usado no teste hemolítico, o soro obtido de vários coelhos foi misturado e absorvido com hemácias de vários eqüinos, para a retirada do anticorpo anti-Forssman. Os coelhos, sendo uma espécie antígeno Forssman-negativa, apresentam anticorpo natural anti-Forssman no soro. Os eqüinos são antígeno Forssman-positivos, apresentando esse antígeno na membrana das hemácias. Devido a isso, o soro de coelhos deve ser previamente absorvido com hemácias eqüinas, para se evitar uma falsa interpretação ao ser usado no teste hemolítico. Para bloquear a ação do complemento durante a absorção, e conseqüente lise das hemácias, foi adicionada uma parte de EDTA 0,1M, pH 7,2, em dez partes de soro. Após a absorção, a atividade do complemento foi restaurada pela adição de igual quantidade de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  e de  $\text{MgCl}_2$ , a 0,1M. A absorção foi feita em duas vezes, de 20 minutos cada uma. Todo o procedimento de preparo do soro de coelho é feito de forma refrigerada, para evitar a inativação das enzimas do sistema complemento. Depois de absorvido, o soro de coelho foi dividido em alíquotas de 10mL e estocado em congelador à  $-20^\circ\text{C}$ .

### **3.5 Testes Eletroforéticos**

Foram estudados os seguintes sistemas protéicos: proteína A1B, albumina, esterase, proteína Gc, hemoglobina, 6-PGD e transferrina. Esses polimorfismos bioquímicos do sangue foram caracterizados por técnicas de eletroforese convencional, com exceção da hemoglobina, a qual foi revelada através da técnica de focalização isoeletrica. A caracterização dessa variabilidade envolveu a confecção de quatro tipos diferentes de géis, sendo dois de amido de

milho (Penetrose 30<sup>TM</sup>) e dois de poliacrilamida. Foi utilizado amido de milho, fornecido pela Corn Products Brasil, antiga Refinações de Milho Brasil.

Originalmente, amido hidrolisado de batata, produzido por Sigma ou Connaught, era utilizado, ao invés do amido de milho. Durante a realização desse trabalho, houve descontinuidade no fornecimento de amido de batata com a qualidade necessária, o que levou ao uso alternativo de amido de milho. Essa substituição inviabilizou a confecção de um outro sistema de gel, em pH ácido, para tipagem do loco da proteína inibidora de protease (Pi), que se pretendia realizar, e do loco da esterase, revelando outros dois alelos adicionais.

A Tabela 4 mostra os sistemas de polimorfismos testados, com o tipo de gel, pH e as variantes que podiam ser detectadas.

**TABELA 4.** Sistemas de polimorfismos bioquímicos e as variantes detectadas no presente trabalho.

<b>Proteína</b>	<b>Loco</b>	<b>Técnica</b>	<b>pH do Gel</b>	<b>Variantes detectadas</b>
Albumina	Al	poliacrilamida	8,9	A, B
Glicoproteína A1B	A1B	poliacrilamida	8,9	F, K, S
Esterase	Es	amido de milho/ poliacrilamida	7,7 - 7,8	F, I, S
6- PGD	PGD	amido de milho	6,6-6,7	D, F, S
Proteína Gc	Gc	Poliacrilamida	8,9	F, S
Hemoglobina	Hb	poliacrilamida/IEF	5 - 8	A1, A2, B1, B2
Transferrina	Tf	amido de milho/ poliacrilamida	7,7 - 7,8	D, F, H, J, M, O, R D, F1, F2, H, M, O, R

Com relação à transferrina, o gel de poliacrilamida apresenta uma melhor resolução, além de permitir a subdivisão de alelos que não são distinguidos no gel de amido de milho ou

amido de batata. No presente trabalho, com o gel de poliacrilamida foi possível subdividir o alelo F, visto no gel de amido de milho, em F1 e F2. Os dois tipos de géis (amido de milho e poliacrilamida) usados para o sistema transferrina e esterase serviram ao propósito de confirmação dos resultados e, para o sistema transferrina, o gel de amido de milho serviu para confirmar os alelos O e R, que tiveram pouca resolução na poliacrilamida.

A seguir serão relatados os quatro sistemas eletroforéticos, com as proteínas estudadas em cada um.

### **3.5.1 Gel de Amido de Milho para Transferrina e Esterase**

O gel de amido de milho foi preparado na concentração de 14%, em 200mL de solução-tampão, pH 7,7-7,8. A solução-tampão foi preparada com 12,8mL de solução A (10,5g/L de ácido cítrico monoidratado) 38,4mL de solução B (23g/L de tris) e 32mL de solução C, ou tampão de Gahne (5,0g de LiOH, 28,32g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, em 2 litros de água) e completada com água deionizada. Cerca de 100mL da solução-tampão foram separados e o restante colocado para ferver sobre uma placa de aquecimento. Um pouco antes da solução entrar em ebulição, o amido de milho foi dissolvido nos 100mL previamente separados. O tampão quente foi então adicionado à suspensão, enquanto o kitasato foi vigorosamente agitado. O amido de milho foi cozido, até formar uma massa viscosa e sem grumos. Por ser um gel de amido de milho, não foi necessário proceder-se a desaeração do gel.

O gel foi colocado sobre uma placa de vidro, medindo 260 x 180 x 5mm, com laterais de uma moldura de acrílico, de 5mm de espessura, e de medidas internas de 215 x 140mm. Após o resfriamento, o gel foi coberto por uma folha de plástico para evitar o ressecamento e ser usado, geralmente, no dia seguinte.

As amostras de soro dos animais foram aplicadas dentro de um corte transversal, feito ao longo da largura da placa, a uma distância de 4,5cm da extremidade catódica. A aplicação

---

foi feita por meio de pedaços de papel de cromatografia (Whatman nº.3), de 0,7 x 0,7mm, embebidos no soro de cada animal. Em cada gel foram colocadas amostras de 15 animais, além de três amostras-controle; no final de cada corte foi colocado um marcador de azul de bromofenol, para indicar a corrida eletroforética. O corte foi cuidadosamente fechado, para que não ficassem bolhas de ar que impedissem a passagem de corrente elétrica. A folha de plástico que cobria o gel foi dobrada, deixando-se 2cm expostos em cada extremidade. A corrente elétrica foi aplicada nas cubas contendo cerca de 175mL de solução-tampão Gahne, por meio de eletrodos conectados a uma fonte de voltagem constante e transmitida ao gel por pontes de tecido Perfex, com uma das extremidades mergulhada nas cubas e a outra colocada sobre as extremidades expostas do gel. A corrida foi iniciada a 150V, por 10 minutos, após os quais, os pedaços de papel foram retirados do gel, o corte foi cuidadosamente fechado e a voltagem foi aumentada para 350V. Durante a eletroforese, o gel foi mantido sobre uma placa de refrigeração, a cerca de 12,5°C.

A corrida eletroforética foi interrompida quando o marcador atingia 13cm (após aproximadamente 3 horas e meia). A moldura de acrílico foi retirada e o gel foi cortado longitudinalmente em duas partes, com o auxílio de um fio de nylon esticado entre as mãos. Na parte superior, foi feita uma coloração enzimática, para revelar as zonas de esterase, com uma mistura contendo 50mL de água deionizada, 1,0mL de alfa-naftil-acetato e uma pequena quantidade de Fastblue Salt. Essa solução foi aplicada sobre o gel por alguns minutos, até as zonas de atividade de esterase começarem a aparecer. A parte inferior foi corada com amido black (corante inespecífico de proteínas), durante 3-4 minutos, para revelar as bandas de transferrina. Após o período de coloração de cada parte do gel, ambos foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante. Em seguida, os géis foram mergulhados cuidadosamente em solução descorante e fixadora (5 volumes de metanol, 5 volumes de água destilada e 1 volume de ácido acético glacial), ficando até o dia seguinte.

---

### 3.5.2 Gel de Amido de Milho para 6- Fosfogluconato Desidrogenase (6-PGD)

A separação de variantes da enzima eritrocitária 6-PGD foi baseada na técnica descrita por Bengtsson e Sandberg (1973), usando-se o sistema contínuo de tampão fosfato-EDTA-magnésio (tampão FEM), pH 6,6-6,7. No sistema contínuo, o mesmo tampão é colocado no gel e nas cubas dos eletrodos.

O gel de amido de milho foi preparado na concentração de 14%, em 250mL de solução-tampão. A solução-tampão foi composta de 27,6g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 28,4g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,0g de EDTA e 4,0g de  $\text{MgCl}_2$ , em 2 litros de água deionizada.

O gel foi colocado sobre uma placa de vidro, medindo 260 x 215 x 5mm, com laterais de uma moldura de acrílico, de 5mm de espessura, e de medidas internas de 215 x 165mm. Após o resfriamento do gel, o mesmo foi coberto por uma folha de plástico para evitar o ressecamento e ser usado, geralmente, no dia seguinte.

As amostras foram preparadas, a partir das hemácias que foram lavadas e usadas previamente no teste serológico, misturando-se 100 $\mu\text{L}$  de hemácias descongeladas e 100 $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol, a 0,2%. Foram feitos três cortes no gel, distantes entre si por 5cm, medidos a partir da extremidade catódica. As amostras foram aplicadas no gel, com papéis Whatman n°. 3, de tamanho 0,7 x 0,7mm. Foram aplicadas 18 amostras por corte, sem o uso de controle, totalizando 54 por gel. Os papéis foram retirados após 30 minutos de corrida, a qual teve duração total de aproximadamente 3 horas e 15 minutos, sob uma corrente de 150mA. A temperatura da placa refrigerada foi de -1°C. Além disso, sobre o gel foi colocada uma placa de vidro contendo bolsa de gelo, para ajudar na dissipação do calor.

Terminada a corrida, o gel foi cortado em duas partes, com o auxílio de um fio de nylon, descartando-se a metade superior. Hastes de acrílico, com 8mm de espessura, foram colocadas ao redor da parte inferior, para permitir a colocação da solução-corante.

---

O corante, preparado para dois géis, consistiu de 30mg de ácido fosfogluconico, 15mL de solução de tris (18,171g/0,5L, pH 8,0), 1,5mL de solução de cloreto de magnésio (0,81g/100mL), 1,0mL de solução de  $\beta$ -NADP (5mg/mL), 1,0mL de solução de PMS (5mg/mL) e 1,0mL de solução de MTT (5mg/mL), completados para 60mL de ágar, a 2%. Depois de aplicado o corante, o gel foi colocado em estufa, por uma hora. Decorrido esse tempo, a leitura do resultado foi feita diretamente, sem necessidade de fixação do gel.

### **3.5.3 Gel de Poliacrilamida para Albumina, Esterase, Glicoprotéina A1B, Proteína Gc e Transferrina**

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em alta voltagem, foi feita, com base na técnica descrita por Juneja et al. (1978), para a determinação do polimorfismo das seguintes proteínas séricas: albumina, esterase, glicoproteína A1B, proteína Gc e transferrina.

O gel de poliacrilamida foi preparado com três concentrações diferentes ao longo do gel - 10%, 4% e 8%. As amostras de soro são aplicadas na região de 4%. A separação das proteínas ocorre na região de 10%.

Para a região de 10%, usou-se 19mL de solução-estoque de acrilamida, 11mL de água deionizada, 15mL de solução-tampão tris-citrato e 15 mL de solução de persulfato de amônia. O preparo dessas soluções está descrito a seguir. Para a região de 4%, foram utilizados 2mL de solução-estoque de acrilamida, 8mL de água deionizada, 2mL de solução-tampão tris-citrato, 10 $\mu$ L de Temed, 4mL de solução de persulfato de amônia e 5 $\mu$ L de hemácias de eqüinos. A região de 8% foi preparada com 2mL de solução-estoque de acrilamida, 3mL de água deionizada, 1mL de solução-tampão tris-citrato, 10 $\mu$ L de Temed e 2mL de solução de persulfato de amônia.

A solução estoque de poliacrilamida foi preparada com 32g de acrilamida, 0,8g de bis-acrilamida e 70mL de água. O tampão tris-citrato, para um gel, foi preparado da seguinte

---

forma: 12,5mL de uma solução de tris (18,2g em 100mL de água), 12,5mL de uma solução de ácido cítrico (4,0g em 100mL de água), 75 $\mu$ L de Temed e 37 $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. A solução de persulfato de amônia consistiu de 100mg de persulfato em 50mL de água. Todas as soluções foram feitas com água deionizada.

O gel foi montado entre duas placas de vidro, de 2 x 260 x 300mm, fechadas com um espaçador de lexan, de 8 mm de espessura e 2,0 cm de largura, ao longo de sua borda. As duas placas foram mantidas firmemente unidas por prendedores de metal, nas laterais e na parte inferior. Na parte superior, ao longo da extensão de 300mm, o espaçador era descontinuado, deixando uma abertura, para a aplicação da solução do gel. A solução de poliacrilamida foi aplicada, através dessa abertura, na parte superior, com o auxílio de uma seringa, com a estrutura mantida levemente inclinada. Na parte interna de uma das placas, foi aplicado silicone (Repel Silane), para que o gel não ficasse aderido nessa placa, no momento da sua retirada, para a corrida eletroforética.

Para orientar a colocação da quantidade de solução de poliacrilamida, a placa superior (siliconizada) foi marcada em três posições, a 16, 19 e 21cm, a partir da extremidade superior interna do espaçador. A solução a 10% foi aplicada até atingir a marca de 16cm. Esperou-se 20 minutos para ocorrer a polimerização, para então aplicar-se a solução a 4%, até atingir a marca de 19cm. Após 20 minutos, foi aplicada a solução a 8%, até chegar à marca de 21cm. Depois de ocorrida a polimerização da camada de 8%, as placas foram embrulhadas com plástico e guardadas em geladeira, para serem usadas no dia seguinte.

Antes da corrida, a placa superior é retirada, sendo descolada com o auxílio de uma espátula ou bisturi, para que o gel não se quebre.

A fim de evitar o ressecamento do gel, uma folha de transparência, de 14,25 x 28cm, foi colocada sobre a região de 10%. Duas tiras de papel Whatman nº. 3, medindo 26,5 x 1cm e 26,5 x 2cm, embebidas com tampão das cubas, foram colocadas, respectivamente sobre a



---

região do gel a 8%, no cátodo, e na região do ânodo, deixando a região do gel a 4% exposta, para a aplicação das amostras. Deve-se evitar que a tira catódica entre em contato com a região de 4%.

Foram aplicadas amostras de soro de 48 animais por gel. Além disso, a cada 10 amostras e nas duas extremidades foram colocadas amostras-controle, de genótipo conhecido no sistema da transferrina. As amostras de soro foram aplicadas com papel Whatman nº. 17 cortados em quadrados de 4mm. Antes de ser colocados sobre o gel, os papéis foram dispostos horizontalmente na ponta de uma tira de plástico, apoiada em uma régua, com a aderência adequada para reter os papéis de filtro. Em seguida, essa tira de plástico foi posicionada sobre a região de aplicação das amostras, com uma inclinação de cerca de 75°. Com o auxílio de uma espátula, os papéis foram sucessivamente empurrados, para tocarem levemente a região do gel a 4%.

Nas cubas, foi colocado tampão tris-borato, pH 8,9 (8,0g de tris, 2g de ácido bórico, em 1L de água). Na cuba catódica, foi colocado azul de bromofenol, como marcador da corrida. A corrente elétrica foi aplicada nas cubas, contendo cerca de 350mL de solução-tampão, por meio de eletrodos conectados a uma fonte de eletricidade e transmitida ao gel por pontes de tecido tipo Perfex, com uma das extremidades mergulhada nas cubas e a outra colocada sobre as tiras de papel.

A corrida eletroforética foi iniciada com uma corrente de 70mA. Após três minutos, os papéis foram retirados e a corrente foi mantida a 70mA. A temperatura da placa refrigerada foi de 1,5°C. A corrida foi interrompida no momento em que as bandas da albumina, coradas pelo azul de bromofenol, atingiram 11,5cm dentro da região do gel a 10%.

Antes de se retirar o gel da placa, procedeu-se à coloração da esterase, feita com a mesma solução-corante mencionada no item 3.5.1. Essa solução deve ser aplicada somente sobre a região de migração da esterase, evitando-se a região da Gc, mais anódica. Depois da

---

revelação das zonas de esterase, o gel foi lavado e mergulhado em um pirex, contendo o corante Coomassie Blue (0,4g de Coomassie, 50mL de etanol e 100mL de ácido fosfórico, em 1L de água), até o dia seguinte, quando aplicou-se a solução-descolorante descolorante (5% de ácido acético glacial, em água).

#### **3.5.4 Gel de Poliacrilamida para a Hemoglobina**

A detecção do polimorfismo da hemoglobina foi feita pelo método da focalização isoelétrica, com base na técnica descrita por Ryder et al. (1979). O gel foi preparado usando-se 4,5mL de água deionizada, 6,0mL de solução-estoque A (8,685g de acrilamida, 0,315g de bis-acrilamida, em 100mL de água deionizada), 0,5mL de Pharmalyte, com faixa de pH entre 5 e 8, 0,9mL de solução de persulfato de amônia (0,4g em 20mL de água deionizada) e 12 $\mu$ L de Temed.

Para a montagem do gel, utilizou-se duas placas, uma de vidro e outra de acrílico, medindo 2 x 200 x 250mm. Uma película de filme transparente, fixador de gel (Gel Bond – PAG), de 124 x 258mm, foi aderida na parte interna da placa de vidro, previamente umedecida. As duas placas foram montadas, colocando-se dois espaçadores, com espessura de 0,8mm e 10mm de largura, colocados entre as placas, ao longo da maior extensão. As duas placas foram mantidas unidas, pelas laterais, com presilhas de metal.

A solução de poliacrilamida foi aplicada, entre as placas, com o auxílio de uma seringa. Esperou-se de 20 a 30 minutos para ocorrer a polimerização. Antes da aplicação das amostras, a placa de acrílico foi descolada, com o auxílio de uma espátula.

As amostras foram preparadas, a partir das hemácias lavadas e usadas previamente no teste serológico, podendo ser utilizadas hemácias frescas ou congeladas. Foram utilizados papéis de cromatografia Whatman nº. 3, de 2 x 4mm. A placa de vidro foi colocada sobre um papel milimetrado, para melhor visualização da colocação das amostras sobre o gel. Em cada

---

gel, foram aplicadas 72 amostras, divididas e espaçadas em grupos de doze, sempre iniciados com uma amostra-controle. Duas tiras de papel de filtro (IEF Electrode) foram umedecidas, uma em solução de NaOH, 1M (4,0g em 100mL) e colocada sobre a região do cátodo, e a outra, em uma solução de ácido glutâmico (0,588g em 100mL), colocada sobre a região do ânodo. O gel foi colocado sobre uma placa de refrigeração, a 12°C, e conectado a uma fonte de alta voltagem, própria para focalização isoeletrica, sistema LKB 2117, unidade Multiphor II. Uma potência elétrica entre 9 a 12W foi mantida durante aproximadamente 45 minutos, para ocorrer a focalização isoeletrica da hemoglobina.

Após o término da corrida, o gel, aderido à folha de Gel Bond, foi retirado da placa de vidro e mergulhado, inicialmente, em uma solução fixadora de ácido tricloro-acético, a 10%, por 30 minutos e, em água, por mais 30 minutos. Após esse período, o gel foi deixado para secar à temperatura ambiente.

### **3.6 Análise dos Dados**

Com o objetivo de comparar as raças equinas estudadas, foram realizados cálculos estatísticos a partir dos resultados relativos aos fatores dos sistemas de grupos sanguíneos A, P, Q e T, aos alelos dos sistemas de grupos sanguíneos C, D, K e U, e às variantes protéicas relativas aos sete sistemas de polimorfismos bioquímicos.

#### **3.6.1 Freqüência dos Fatores Sanguíneos**

Para os sistemas de grupos sanguíneos foram calculadas as freqüências dos fatores, através da contagem direta dos mesmos, ou seja, contando-se os indivíduos positivos para cada fator e dividindo-se pelo número total de animais. Nos sistemas A, Q e T, nos quais não foi possível estimar as freqüências alélicas, a freqüência dos fatores foi a única medida de caracterização do sistema.

---

As frequências dos fatores foram analisadas através de tabela de contingência, comparando-se o número de indivíduos com um determinado fator com o número de indivíduos que não apresentaram aquele fator.

### 3.6.2 Frequências Alélicas

Nos sistemas dominantes simples, C, K e U, dois fenótipos são observados: dominante (a) e recessivo (-). As frequências alélicas foram calculadas através do método da raiz quadrada, que pressupõe que a população se encontra em equilíbrio genético, de acordo com a lei de Hardy-Weinberg.

O método da raiz quadrada é representado pela seguinte fórmula:

$$p = 1 - \sqrt{R/n}$$

Sendo **p**, a frequência do alelo dominante, **R** o número observado do homozigoto recessivo e **n** o número total da amostra (Kelly, 1999, Del Lama, 1992 e Mortari, 1990).

Para os sistemas de polimorfismos bioquímicos, controlados por dois ou mais alelos codominantes, as frequências alélicas foram estimadas pelo método de contagem direta do número de alelos na amostra. Para o caso de dois alelos A e B, as frequências foram estimadas por:

$$p = (A + 1/2 H) / N \quad e \quad q = (B + 1/2 H) / N$$

onde, **A** é o número de indivíduos homozigotos do alelo A, **B** é o número de indivíduos homozigotos do alelo B, **H** é o número de heterozigotos e **N** é o total de indivíduos.

### 3.6.3 Frequências Alélicas do Sistema P.

O cálculo das frequências alélicas do sistema P foi realizado considerando-se apenas os fatores Pa e Pb, pelo fato desse sistema ser análogo ao sistema sanguíneo humano ABO.

O cálculo foi realizado pela aplicação da equação de Bernstein, assumindo equilíbrio genético (cf. Beiguelman, 1981).

As frequências dos alelos Pa e Pb foram calculadas como:

$$p' = 1 - ((B + D)/N)^{1/2}, q' = 1 - ((A + D)/N)^{1/2} \text{ e } r' = (D/N)^{1/2},$$

onde A, B, C e D são os números observados de indivíduos para os fenótipos a, b, a/b, (-), respectivamente e N o número observado total.

Essas estimativas são consideradas estimativas preliminares cuja soma raramente é igual a um. As estimativas corrigidas foram então calculadas da seguinte maneira:

$$p = p' (1 + d/2), \quad q = q' (1 + d/2) \text{ e } r = (r' + d/2) (1 + d/2) \text{ ou } r = 1 - (p + q)$$

$$\text{onde } d = 1 - (p' + q' + r')$$

O desvio (d) foi testado para verificar o quanto é diferente de zero, através de um teste de qui-quadrado, com grau de liberdade igual a 1.

$$X^2 = 2N (1 + r'/p'q')d^2$$

### **3.6.4 Caracterização dos Fenogrupos do Sistema D e Estimativa das Frequências Alélicas**

A caracterização dos fenogrupos do sistema D de cada animal, na tentativa de conhecer seu genótipo, foi feita com base na lista oficial de fenogrupos da ISAG (Tabela 5). A partir do fenótipo do animal, procurou-se determinar um ou ambos os alelos.

Os animais foram testados para 12 fatores do sistema D: Da, Db, Dc, Dd, De, Df, Dg, Dh, Di, Dk, Dl e Do; o reagente para esse último fator foi descontinuado ao longo desse trabalho, mas isso não impediu a caracterização dos fenogrupos pretendida. Com o uso desses reagentes, 12 fenogrupos poderiam ocorrer na amostra: Dadl, Dbc, Dcegi, Dcfigk, Dcg, Ddekl, Ddel, Ddelo, Ddfkl, Ddgh, Ddkl e Ddl. Assumiu-se que o fenogrupos negativo não existe na amostra estudada.

---

Após a identificação dos fenogrupos de cada indivíduo, a amostra foi classificada em três grupos:

- A. Animais com genótipo determinado (homozigotos e heterozigotos), ou seja, com os dois alelos determinados;
- B. Animais com um alelo determinado; o outro alelo, a ser inferido entre mais de um alelo possível;
- C. Animais cujo fenótipo poderia ser determinado por vários genótipos, a serem inferidos.

A frequência dos fenogrupos foi estimada, em uma primeira etapa, por contagem direta dos fenogrupos, entre os animais dos grupos A e B. Isso proporcionou uma primeira estimativa das frequências de todos os fenogrupos.

Para os alelos que se enquadram estritamente no grupo A, isto é, aqueles que podem ser definitivamente estabelecidos em todos os animais, a frequência foi calculada diretamente, sem necessidade de alocação.

Para os grupos B e C, os alelos não-determinados foram alocados, com base no método de Braend (1963), com modificações.

A alocação aos possíveis alelos ou genótipos foi feita sob a suposição de que a amostra encontrava-se em equilíbrio genético. Os animais dos grupos B e C foram proporcionalmente alocados aos genótipos possíveis, com base no esperado pela suposição de equilíbrio genético. Usando-se as frequências alélicas estimadas na primeira etapa, foram calculadas as frequências esperadas dos genótipos possíveis. A partir dessas frequências, encontraram-se as frequências relativas, para se distribuir, proporcionalmente, o número de indivíduos aos genótipos possíveis.

---

### 3.6.5 Testes de Equilíbrio Genético

A hipótese de equilíbrio genético foi testada nos sistemas codominantes de polimorfismos bioquímicos. As frequências alélicas observadas foram utilizadas para se calcular as frequências genótípicas esperadas sob a hipótese de equilíbrio genético. A dimensão dos desvios entre as distribuições genótípicas esperada e observada foi verificada através de um teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de aderência, com um nível de significância de 5%, sobre a hipótese nula. Os graus de liberdade foram calculados como o número de classes genótípicas menos o número de alelos (Beiguelman, 1981).

O teste de  $\chi^2$  foi calculado por:

$$\chi^2 = \sum (\text{obs} - \text{esp})^2 / \text{esp}$$

Nos sistemas dominantes simples, as frequências alélicas foram estimadas sob a suposição de equilíbrio genético e, portanto, não podem ser utilizadas para o teste de equilíbrio.

### 3.6.6 Heterozigosidade

A variabilidade genética intrapopulacional foi estimada através do cálculo da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) em cada loco, da seguinte forma:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2, \text{ onde } p_i \text{ é a frequência do alelo } i.$$

A heterozigosidade foi calculada para cada um dos sete locos de polimorfismos bioquímicos e para os sistemas de grupos sanguíneos C, D, K e U. A heterozigosidade média total foi calculada através da soma de todos os locos, dividida pelo número total de locos, para cada uma das raças (Ferguson, 1980).

O número de heterozigotos e homozigotos dentro e entre as populações foi comparado através do teste de qui-quadrado por tabela de contingência 2x2, com auxílio do software BioEstat (Ayres, et.al., 2000).

---

O grau de endocruzamento dentro de cada população foi estimado pelo coeficiente de endocruzamento ( $F_{is}$ ), e a estimativa das divergências existentes entre as duas raças como consequência de deriva genética ( $F_{st}$ ), calculados de acordo com Weir & Cockerham (1984), através de procedimento de randomização (280 randomizações), utilizando-se o software FSTAT (Goudet, 1995), o qual utilizou as seguintes fórmulas:

$F_{is} = H_s - H_i / H_s$ , onde  $H_s$  é a média dos valores de heterozigosidade esperada e  $H_i$  é a probabilidade de um indivíduo retirado aleatoriamente ser heterozigoto.

$F_{st} = H_t - H_s / H_t$ , onde  $H_t$  é a heterozigosidade esperada da população supostamente original (cf. Francisco, 2001).

### 3.6.7 Teste de Heterogeneidade

O teste de heterogeneidade foi aplicado, individualmente, nos sistemas de polimorfismos bioquímicos, com a finalidade de verificar a hipótese das populações serem homogêneas quanto às proporções dos resultados observados e esperados sob hipótese de equilíbrio (Beiguelman, 1981).

O qui-quadrado de heterogeneidade (H) foi calculado pela seguinte fórmula:

$H = \sum \chi^2_i - \chi^2_T$ , onde,  $\sum \chi^2_i$  é a soma dos qui-quadrados obtidos para cada população e,  $\chi^2_T$  é o qui-quadrado calculado para a amostra total, ou seja, considerando-se a distribuição genotípica total das duas populações.

Os graus de liberdade do qui-quadrado de heterogeneidade foram calculados como a soma dos graus de liberdade dos qui-quadrados individuais menos os graus de liberdade da amostra total.



### 3.6.8 Probabilidade de Exclusão

Para as análises de parentesco, a probabilidade de exclusão de um pai ou mãe foi calculada para cada loco a partir das frequências dos diferentes alelos observados nesse loco. Nos sistemas dominantes simples, com um par de alelos, a probabilidade de exclusão foi calculada por:

$P = pq^4$ , onde  $p$  é a frequência do alelo dominante e  $q^4$  é a frequência do acasalamento entre dois indivíduos recessivos (Salzano, 1983).

Nos sistemas com codominância, a probabilidade de exclusão foi calculada pela fórmula:

$P = \sum p_i (1-p_i)^2 - \sum (p_i p_j)^2, [4-3 (p_i - p_j)], i > j$ , onde  $p_i$  e  $p_j$  são as frequências dos alelos  $i$  e  $j$ , considerando  $i$  como mais freqüente que  $j$ .

### 3.6.9 Identidade Genética

O grau de diferença entre as duas raças foi calculado a partir de suas frequências alélicas, utilizando-se a distancia genética de Nei. O princípio básico deste método consiste no fato de que as diferenças alélicas dos marcadores genéticos são consequência de mudanças a nível gênico, assumindo que o número médio dessas diferenças é estimado a partir das frequências alélicas. A distância genética ( $D$ ) calcula o número de substituições alélicas por loco e é determinada pela seguinte fórmula:

$D = -\ln I$ , onde  $I$  é a identidade genética de Nei.

A identidade genética de Nei é aplicada quando as frequências alélicas entre duas populações são muito parecidas, o que demonstra que há uma semelhança genética entre elas. A probabilidade de dois alelos, um de cada população, serem idênticos é calculada através da identidade genética, que pode variar de 0 (nenhum alelo em comum) a 1 (todos os alelos iguais). Esse teste foi aplicado para os sistemas de polimorfismos bioquímicos e para os sistemas de grupos sanguíneos de dominância simples (C, D, K, P e U).

---

A identidade genética para um loco e duas populações foi calculada por:

$I = \sum a_i b_i / \sqrt{\sum a_i^2 \sum b_i^2}$ , sendo  $a_i$  e  $b_i$  a frequência dos alelos  $i$  tomados na população A e B.

A semelhança genética entre as populações, em vários locos, medida pela identidade genética média foi calculada por:

$I = I_{ab} / \sqrt{I_a I_b}$ , onde  $I_{ab}$  e  $I_a I_b$  são as médias dos valores de todos os locos de  $\sum a_i b_i / \sqrt{\sum a_i^2 \sum b_i^2}$  (Ferguson, 1980).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados referentes às raças Mangalarga (ML) e Mangalarga Marchador (MM) são apresentados em conjunto, considerando-se inicialmente os grupos sanguíneos e depois os polimorfismos bioquímicos. Como um dos objetivos do presente trabalho é caracterizar e comparar essas duas raças, a apresentação dos resultados foi acompanhada de uma comparação entre elas.

No geral, os 680 animais de cada raça foram testados para os 27 fatores, relativos aos oito sistemas de grupos sanguíneos, e para os sete sistemas de polimorfismos bioquímicos estudados. Entretanto, os reagentes para os fatores Pa, do sistema P, e Qa, do sistema Q, não foram utilizados em alguns testes, envolvendo a raça Mangalarga Marchador, porque seus estoques terminaram e não foram repostos imediatamente. Assim, as frequências desses fatores foram calculadas com um número menor de animais para a raça Mangalarga Marchador (487). Os animais descartados para esses fatores foram, entretanto, incluídos nas demais análises. Com relação à raça Mangalarga, para alguns locos de polimorfismo bioquímico, um número menor de animais foi testado. Com essa redução, 522 animais foram testados para A1B, Gc e Tf e, 475, para a Hb.

### **4.1 Frequências dos Fatores Sanguíneos**

Para os sistemas de grupos sanguíneos, foram calculadas as frequências dos 27 fatores testados, através da contagem direta dos mesmos. Os resultados de ambas as raças, para cada sistema encontram-se na Tabela 5.

As figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos através dos testes de aglutinação e hemólise.

**TABELA 5:** Frequência dos fatores dos grupos sanguíneos e teste de qui-quadrado nas raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Sistemas	Fatores	Frequência dos fatores		$\chi^2$	Probabilidade
		ML	MM		
<b>A</b>	a	0.67	0.90	98.37	P<<<0.001*
	b	0.13	0.12	<b>0.49</b>	0.3<P<0.5
	c	0.04	0.12	24.13	P<0.001*
	g	0.10	0.19	22.84	P<0.001*
<b>C</b>	a	0.99	0.87	64.28	P<<<0.001*
<b>D</b>	a	0.20	0.39	56.63	P<<<0.001*
	b	0.44	0.27	37.97	P<<<0.001*
	c	0.51	0.36	31.03	P<<<0.001*
	d	0.90	0.95	9.29	0.001<P<0.01*
	e	0.43	0.39	<b>2.92</b>	0.05<P<0.07
	f	0.31	0.34	<b>1.62</b>	0.2<P<0.3
	g	0.25	0.31	4.47	0.02<P<0.05*
	h	0.15	0.21	8.29	0.001<P<0.01*
	i	0.00	0.00	<b>0.33</b>	0.5<P<0.7
	k	0.44	0.43	<b>0.24</b>	0.5<P<0.7
	l	0.85	0.87	<b>0.75</b>	0.3<P<0.5
	o	0.11	0.00	76.63	P<<<0.001*
	<b>K</b>	a	0.01	0.00	4.18
<b>P</b>	a	0.09	0.15	10.51	0.001<P<0.01*
	b	0.04	0.15	31.80	P<<<0.001*
	d	0.07	0.20	37.65	P<<<0.001*
<b>Q</b>	a	0.63	0.12	239.77	P<<<0.001*
	b	0.73	0.18	227.74	P<<<0.001*
	c	0.74	0.80	<b>3.63</b>	0.05<P<0.10
<b>U</b>	a	0.83	0.73	20.59	P<0.001*
<b>T</b>	V	0.99	1.00	<b>2.26</b>	0.1<P<0.2
	W	0.10	0.09	<b>0.28</b>	0.5<P<0.7

\*  $\chi^2$  significativo ao nível de 0,05. Em negrito: desvios não-significativos

A comparação entre as frequências dos fatores dos sistemas de grupos sanguíneos foi realizada pelo cálculo do qui-quadrado. Dos 27 fatores testados, 18 apresentaram desvio significativo e 9 não apresentaram diferenças. Esses desvios provavelmente se devem à introdução de alelos de diferentes raças eqüinas, através de cruzamentos, os quais teriam contribuído diferentemente na formação das duas raças.



**FIGURA 11:** Placa de microtitulação de reação de aglutinação. Seta indica a cavidade com reação completa.



**FIGURA 12:** Placa de microtitulação de reação de hemolítica. Seta indica a cavidade com reação completa.

## 4.2 Frequências Alélicas dos Sistemas de Grupos Sangüíneos C, K e U

Os sistemas C, K e U são sistemas simples, apresentando um único fator sangüíneo, com dominância. As frequências alélicas desses sistemas de grupos sangüíneos estão representadas na Tabela 6.

No sistema K, o alelo K<sup>a</sup> não foi encontrado na raça Mangalarga Marchador. Na raça Mangalarga, aparece com baixa frequência (0,005). A baixa frequência de ocorrência de animais positivos para esse fator também é observada em outras raças eqüinas, tais como Puro Sangue Inglês (0.025), Paso Fino (0.001), Crioulo do Uruguai (0.017), sendo igual a zero na raça Árabe. (Bowling & Clark, 1985; Kelly, 1999).

**TABELA 6:** Frequências alélicas dos sistemas de grupos sangüíneos C, K e U nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga.

Sistemas	Alelos	MM	ML
C	C <sup>a</sup>	0.647	0.885
	C <sup>-</sup>	0.353	0.115
K	K <sup>a</sup>	0.000	0.005
	K <sup>-</sup>	1.000	0.995
U	U <sup>a</sup>	0.480	0.591
	U <sup>-</sup>	0.520	0.409

As frequências dos alelos dos sistemas C e U apresentaram algumas variações. O alelo C<sup>a</sup> foi o mais freqüente em ambas as raças, com maior valor na raça Mangalarga (0.885) do que na Mangalarga Marchador (0.647). Esses valores apresentaram similaridade com a raça Pura Raça Espanhola, estudada por Kelly (1999), que observou valores iguais nesse sistema. No trabalho de Bowling & Clark (1985), das sete raças estudadas, apenas a raça Paso Fino, o

alelo C<sup>a</sup> (0.369) foi menos freqüente do que o alelo recessivo C<sup>r</sup> (0.631). No sistema U, as duas raças apresentam um perfil diferente, pois o alelo U<sup>a</sup> foi o mais freqüente na raça Mangalarga (0.591), contrapondo-se ao alelo U<sup>r</sup>, que foi o mais freqüente na raça Mangalarga Marchador (0.520).

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg não foi realizado para esses sistemas, pelo fato do método da raiz quadrada, usado no cálculo das freqüências alélicas, ser baseado na suposição das populações estarem em equilíbrio genético.

#### 4.3 Freqüência dos Alelos do Sistema P

As freqüências dos alelos do sistema P (Tabela 7) foram calculadas considerando-se apenas os alelos Pa e Pb.

**TABELA 7.** Freqüência dos alelos P<sup>a</sup>, P<sup>b</sup> e P<sup>r</sup> e teste de  $\chi^2$  nas raças Mangalarga Marchador (MM) e Mangalarga (ML).

	MM	ML
P <sup>a</sup>	0.079	0.022
P <sup>b</sup>	0.086	0.045
P <sup>r</sup>	0.835	0.933
$\chi^2$	<b>19.86*</b>	<b>0.526</b>

\* desvio significativo.

O alelo P<sup>r</sup> foi o mais freqüente em ambas as raças estando de acordo com os dados obtidos por Kelly et. al., 2002 e Bowling & Clark, 1985.

O desvio significativo apareceu apenas na raça Mangalarga Marchador, assim como os sistemas A1B, Es e Tf.

#### 4.4 Freqüência dos Fenogrupos do Sistema D

A tipagem do sistema D envolveu o teste de 12 fatores sanguíneos, que permitiriam a detecção de 12 fenogrupos distintos. Em cada raça, foram identificados 11 fenogrupos, pela

simples observação do fenótipo dos indivíduos. Os fenogrupos que não apareceram na amostra estudada foram:  $D^{dekl}$ , na raça Mangalarga e,  $D^{dl}$ , na raça Mangalarga Marchador.

Para se estimar as frequências dos fenogrupos do sistema D, primeiramente procedeu-se à identificação do genótipo de cada indivíduo, ou seja, dos fenogrupos que ele exibia. Os fenogrupos  $D^{adl}$ ,  $D^{bc}$ ,  $D^{cegi}$ ,  $D^{delo}$ , e  $D^{dgh}$  foram identificados mesmo em heterozigosidade, ou seja, em todos os animais que o possuíam, por não serem mascarados por nenhum outro. A definição dos fenogrupos  $D^{cfgk}$ ,  $D^{cg}$ ,  $D^{dekl}$ ,  $D^{del}$ ,  $D^{dfkl}$ ,  $D^{dkl}$  e  $D^{dl}$  foi dependente do fenótipo do animal, pois estes podiam estar mascarados por outro fenogrupos ou estar presentes em combinações que originavam mais de um genótipo.

A partir dessa identificação dos genótipos, a amostra ficou dividida em três classes, mostradas na Tabela 8. Na classe A, estão os animais com genótipo conhecido; na classe B, os animais com apenas um alelo conhecido e o outro a ser inferido; na classe C, os animais com ambos os alelos a serem inferidos. Dos 680 animais de cada raça, não foram considerados nessa análise quatro e seis animais, das raças Mangalarga Marchador e Mangalarga, respectivamente, por motivo de resultado duvidoso quanto a algum fator do sistema D, o que inviabilizou a determinação correta dos seus alelos. Como pode ser visto na tabela, a maioria dos animais (76,9 e 86,1%) teve o genótipo conhecido, 20,9 e 13,6% tiveram o genótipo conhecido parcialmente e, apenas 2,2 e 0,3%, ficaram com ambos os alelos indefinidos, para as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga, respectivamente.



**TABELA 8:** Classificação da amostra quanto aos fenogrupos do sistema D.

Classes *	MM		ML	
	Animais	Alelos definidos	Animais	Alelos definidos
A	520	1040	580	1160
B	141	141	92	92
C	15	0	2	0
Total	676	1181	674	1252

\*: Explicação no texto

Uma primeira estimativa das frequências dos 11 fenogrupos de cada raça foi feita com base no número de alelos contado nas classes A e B, ou seja, com base no total de 1181 e 1252 alelos definidos.

Essa primeira estimativa serviu de base para se alocar os indivíduos com um ou ambos alelos indefinidos a um determinado genótipo possível. Para essa alocação, adotou-se o método de Braend (1963), com modificações. Como exemplo, pode ser citada a observação de quatro animais da raça Mangalarga Marchador, incluídos na classe B, que apresentaram o fenótipo D<sub>cf</sub>gk. Esses animais poderiam apresentar dois genótipos: D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup>/D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup> ou D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup>/D<sup>cg</sup>. Através da primeira estimativa (classes A e B), as frequências dos alelos D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup> e D<sup>cg</sup> foram de 0,0152 e 0,0356, respectivamente. A alocação do alelo indefinido desses quatro animais foi feita com base na frequência relativa entre esses dois genótipos, de acordo com as frequências genóticas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram calculadas e somadas as duas frequências genóticas esperadas. As frequências relativas foram multiplicadas por quatro, o que forneceu os valores de 0,70, para o genótipo D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup>/D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup> e 3,29, para o genótipo D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup>/D<sup>cg</sup>. Dessa forma, e por aproximação, foram alocados um alelo D<sup>cf<sub>g</sub>k</sup> e três alelos D<sup>cg</sup>

para a amostra inicial. Nesse caso foram alocados alelos, pois o genótipo já era parcialmente definido. Para a classe C, fez-se o mesmo procedimento, mas ambos os alelos foram alocados.

As freqüências alélicas do sistema D são mostradas na Tabela 9.

**TABELA 9:** Freqüência dos alelos do sistema D das raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Fenogrupos	ML	MM
adl	<b>0.110</b>	<b>0.216</b>
bc	<b>0.256</b>	<b>0.155</b>
cegi	0.001	0.001
cfgk	0.001	0.017
cg	0.049	0.039
dekl	-	0.006
del	<b>0.188</b>	0.030
delo	0.058	<b>0.188</b>
dfkl	<b>0.168</b>	<b>0.168</b>
dgh	0.082	<b>0.118</b>
dkl	0.081	0.062
dl	0.006	-

Em negrito: alelos mais freqüentes ( $\geq 0,1$ ). “ - ” : alelo não encontrado na amostra estudada.

Assumiu-se que o fenogrupa negativo não existe na amostra estudada, considerando-se que esse sistema é fechado, com respeito aos alelos da série Dc e Dd. Essa suposição é reforçada pelas seguintes evidências. Bowling e Clark (1985), estudando 116.596 cavalos, de diferentes raças, não detectaram o genótipo homozigoto para o alelo negativo D<sup>-</sup>. Durante o trabalho de tipagem sanguínea de eqüinos, o Laboratório de Imunogenética analisou cerca de 92 mil cavalos, de várias raças, incluindo 5300 e 15650 Mangalarga e Mangalarga Marchador, respectivamente, também não tendo encontrado o genótipo homozigoto negativo.

Os resultados mostram que os fenogrupos  $D^{adl}$ ,  $D^{bc}$  e  $D^{dfkl}$  aparecem com frequência apreciável, maior ou igual a 0,1, em ambas as raças, sendo o alelo  $D^{bc}$ , o mais freqüente na raça Mangalarga (0,256) e, o alelo  $D^{adl}$ , o mais freqüente (0,216) na raça Mangalarga Marchador. O alelo  $D^{dfkl}$  teve igual freqüência nas duas raças (0,168). Os alelos  $D^{delo}$  e  $D^{dgh}$  apresentaram freqüência maior que 0,1, somente na raça Mangalarga e o alelo  $D^{del}$ , somente na Mangalarga Marchador, mas tendo freqüências maiores que 0,01, na raça correspondente. Portanto, quatro alelos da raça Mangalarga ( $D^{adl}$ ,  $D^{bc}$ ,  $D^{del}$  e  $D^{dfkl}$ ) e cinco da raça Mangalarga Marchador ( $D^{adl}$ ,  $D^{bc}$ ,  $D^{delo}$ ,  $D^{dfkl}$ ,  $D^{dgh}$ ) apresentaram freqüência maior ou igual a 0,1. Os cinco alelos mais freqüentes da raça Mangalarga Marchador representam 84,53% da variabilidade do sistema D e os quatro alelos mais freqüentes da raça Mangalarga representam 72,18% da variabilidade desse sistema.

Os fenogrupos  $D^{cg}$  e  $D^{dkl}$  têm freqüência maior que 0,01, nas duas raças. O fenogrupos  $D^{cegi}$  é raro (menor que 0,01) em ambas as raças, enquanto que  $D^{cfigk}$  é raro na raça Mangalarga, mas tem freqüência maior que 0,01, na raça Mangalarga Marchador

O fenogrupos  $D^{dekl}$  não foi encontrado na amostra da raça Mangalarga. Na raça Mangalarga Marchador, ele deve ser também bastante raro, pois, na amostra estudada, apareceu com freqüência de 0,006. O mesmo pode ser dito sobre o fenogrupos  $D^{dl}$ , não encontrado na amostra da raça Mangalarga Marchador, e que também pode ser considerado raro em Mangalarga, uma vez que foi detectado com freqüência de 0,006.

Bowling & Williams (1991), estudando, entre outras raças, animais Mangalarga (n=120) e Mangalarga Marchador (n=79), encontraram o alelo  $D^{bc}$ , como o mais freqüente em ambas as raças. O alelo  $D^{dfkl}$  teve freqüência igual a 0,17, na raça Mangalarga, e 0,12, na Mangalarga Marchador, estando de acordo com os valores encontrados no presente estudo, o qual foi igual a 0,168, em ambas as raças.

---

O fenogrupa  $D^{\text{delo}}$  aparece em alta frequência nas raças Crioulo da Argentina (0,59) (Bowling & Williams 1991), em Berbere (0,20) (Ouragh et al., 1994b) e Crioulo do Uruguai (0,34) (Kelly et al., 2002).

Bowling e Williams (1991), descreveram seis alelos ( $D^{\text{adl}}$   $D^{\text{bc}}$   $D^{\text{cg}}$   $D^{\text{delo}}$   $D^{\text{dgh}}$   $D^{\text{dkl}}$ ) que estão presentes em 26 raças estudadas, entre elas, Andaluz, Mangalarga e Mangalarga Marchador. Três dos alelos mais frequentes observados no presente trabalho se encontram entre esses seis fenogrupos. Já o alelo  $D^{\text{del}}$ , que não está presente entre os seis mais frequentes, no trabalho de Bowling & Williams, aparece com frequência maior apenas na raça Mangalarga (0,17), estando de acordo com os dados do presente trabalho, onde esse alelo aparece com frequência igual a (0,18).

O fenogrupa  $D^{\text{cfgk}}$  é considerado específico das raças Berbere e Pura Raça Espanhola e de raças derivadas dessas, como Paso Fino. A frequência desse alelo, nessas raças, foi reportada por vários autores, sendo menor do que 0,01, na raça Berbere (Ouragh et al., 1994b), 0.053, na Pura Raça Espanhola (cf. Kelly, 1999) e 0.005, na raça Paso Fino (Bowling & Clark, 1985). No presente estudo, esse fenogrupa está presente, em baixa frequência, na raça Mangalarga Marchador (0,017) e, como variante mais rara, na raça Mangalarga (0,001).

O fenogrupa  $D^{\text{dekl}}$  também é considerado característico de cavalos Berbere, onde foi encontrado com frequência igual a 0,01 (Ouragh et al., 1994b). Bowling & Williams (1991) encontraram esse alelo em 9 das 26 raças estudadas, em todas com frequência menor do que 0,05. Entre elas, estão as raças Crioulo Argentino (0,03), Crioulo Chileno (0,03) e Paso Fino (0,01). Kelly (2002) também reportou a existência desse alelo em cavalos Crioulos do Uruguai, com frequência igual a 0.018. No presente trabalho, esse alelo foi encontrado apenas na raça Mangalarga Marchador, com frequência igual a 0,006. Na raça Mangalarga, foi considerado ausente. Além de não ter sido identificado na amostra estudada, também não foi identificado em outros 1500 animais Mangalarga, tipados anteriormente pelo Laboratório

---

de Imunogenética. Esse fenogrupa também está ausente nas raças Puro Sangue Inglês e Árabe (Bowling & Williams, 1991; Bowling & Clark, 1985).

#### **4.4 Frequências Alélicas dos Sistemas de Polimorfismos Bioquímicos**

As frequências alélicas dos sistemas de polimorfismos bioquímicos estão mostradas na Tabela 10.

No sistema da albumina, foram detectados os alelos  $A1^A$  e  $A1^B$  (Figura 13). Observou-se uma distribuição diferente entre as duas raças nas frequências dos alelos dos sistemas da albumina. O alelo  $A1^A$  aparece com maior frequência na raça Mangalarga (0,71), ao contrário da raça Mangalarga Marchador, onde o alelo  $A1^B$  é o mais frequente (0,52).

Com relação ao alelo  $A1^I$ , pode-se supor que esse alelo não ocorreu nas amostras estudadas ou ocorreu com frequência muito baixa, tal que a sua não-detecção não distorceu os dados de distribuição genotípica, estando as duas populações estudadas em equilíbrio genético para o sistema da albumina.

No sistema PGD (Figura 14) o alelo mais frequente em ambas as raças foi  $PGD^F$ , com valor maior do que 0,95. O alelo  $PGD^D$  esteve ausente na raça Mangalarga, aparecendo em baixa frequência na raça Mangalarga Marchador (0,014). Bowling & Clark (1985) e Kelly (1999) observaram que o alelo  $PGD^D$  aparece com frequência igual ou menor a 0,006 nas raças Quarto de Milha, Árabe e Paso Fino, e estando ausente nas raças Paso Peruano, Morgan Horse, Standardbred e Crioulo do Uruguai.

A  
B

**FIGURA 13:** Gel de amido para revelação das variantes (A e B) do sistema da albumina.

**FIGURA 14:** Gel de penetrose para revelação das variantes (F e S) do sistema 6- PGD. O alelo PGD<sup>D</sup> não aparece nesse gel.

F  
S

**TABELA 10.** Frequências alélicas dos sistemas de polimorfismos bioquímicos nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga.

Alelos	MM	ML	Alelos	MM	ML
Al <sup>A</sup>	0.479	0.710	Hb <sup>A</sup> <sub>1</sub>	0.004	0.010
Al <sup>B</sup>	0.521	0.290	Hb <sup>A</sup> <sub>2</sub>	0.100	0.427
Es <sup>F</sup>	0.331	0.043	Hb <sup>B</sup> <sub>1</sub>	0.581	0.319
Es <sup>I</sup>	0.667	0.950	Hb <sup>B</sup> <sub>2</sub>	0.315	0.243
Es <sup>S</sup>	0.002	0.007	Tf <sup>D</sup>	0.627	0.574
PGD <sup>F</sup>	0.956	0.982	Tf <sup>F</sup> <sup>1</sup>	0.002	0.024
PGD <sup>D</sup>	0.014	0.000	Tf <sup>F</sup> <sup>2</sup>	0.168	0.197
PGD <sup>S</sup>	0.030	0.018	Tf <sup>H</sup>	0.014	0.003
Gc <sup>F</sup>	0.965	0.990	Tf <sup>J</sup>	0.004	0.001
Gc <sup>S</sup>	0.035	0.009	Tf <sup>M</sup>	0.000	0.000
A1B <sup>K</sup>	0.956	0.991	Tf <sup>O</sup>	0.034	0.014
A1B <sup>S</sup>	0.044	0.009	Tf <sup>R</sup>	0.150	0.187
A1B <sup>F</sup>	0.000	0.000			

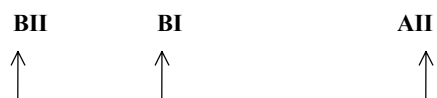
O sistema Gc e A1B (Figura 15) foram pouco polimórficos em ambas as raças, sendo os alelos Gc<sup>F</sup> e A1B<sup>K</sup>, os mais freqüentes. Os valores de 0,96 e 0,99, encontrados, respectivamente, nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga, para esses dois alelos, coincidem com os resultados reportados por Kelly (1999), que comparando nove raças eqüinas não observou diferenças nas freqüências dos alelos desses sistemas.

No sistema A1B verificou-se a ausência do alelo A1B<sup>F</sup>, sendo essa distribuição similar a encontrada em outras raças, tais como Cavalos Crioulos do Uruguai, Árabe e Berbere (Kelly, 1999).

O sistema da transferrina (Figura 15) é um dos mais polimórficos. Das oito variantes detectadas pelos dois sistemas eletroforéticos empregados sete foram observadas nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga. Os alelos mais freqüentes foram: Tf<sup>D</sup> (0,630 e 0,573), Tf<sup>F2</sup> (0,166 e 0,197) e Tf<sup>R</sup> (0,150 e 0,188), respectivamente.



**FIGURA 15:** Gel de Poliacrilamida (PAGE) para revelação das variantes dos sistemas Al, Gc, Es, A1B e Tf. O sistema da Al fica localizado acima do sistema Gc.



**FIGURA 16:** Gel de poliacrilamida para revelação das variantes (AI, AII, BI e BII) dos sistemas da Hb. O alelo Hb<sup>AI</sup> não aparece nesse gel.



**FIGURA 17:** Gel de amido para revelação das variantes (F, I e S) do sistema da esterase. O alelo Es<sup>S</sup> não aparece no gel.



---

O alelo Tf<sup>M</sup> esteve ausente em ambas as raças, também não sendo encontrado em animais Puro Sangue Inglês, Árabe, Standardbred, Quarto de Milha, Paso Fino, Paso Peruano (Bowling e Clark, 1985) e em cavalos Crioulos do Uruguai (Kelly, et. al., 2002).

O alelo Tf<sup>f</sup> foi detectado em ambas as raças, com frequência menor que 0,005. Esse alelo é considerado um marcador genético específico da raça Pura Raça Espanhola com frequência igual a 0,066, e de raças relacionadas, como Paso Fino e Cavalo Crioulo da Argentina (De Andrés Cara & Kaminski, 1987, Kaminski & De Andrés, 1986), não sendo detectado em cavalos Berbere (Ouragh et al., 1994b). Bowling & Clark (1985) encontraram o alelo Tf<sup>f</sup> na raça Paso Fino com frequência igual a 0,011. Kelly (2002) observou-o no Cavalo Crioulo do Uruguai, com frequência também igual a 0,011. Sendo as raças Puro Sangue Espanhol, Paso Fino e Cavalo Crioulo do Uruguai, derivadas de raças da península ibérica, assim como o Mangalarga e o Mangalarga Marchador, a ocorrência do alelo Tf<sup>f</sup> nas raças estudadas permite supor que tenha ocorrido conservação do substrato gênico originado do cavalo Ibérico ancestral, limitando a influência de outras raças.

Em cavalos Crioulos do Uruguai, os alelos mais frequentes encontrados foram: Tf<sup>D</sup> (0,511) Tf<sup>F2</sup> (0,262) e Tf<sup>O</sup> (0,133), sendo esses os mais frequentes também nas raças Paso Fino e Paso Peruano (Kelly, 2002; Bowling & Clark, 1985). De Andrés Cara et al. (1986) observaram que o alelo Tf<sup>F2</sup> foi a única variante do alelo Tf<sup>F</sup> que aparece na raça Andaluz, sendo altamente predominante em cavalos Árabes. O fenogruppo Tf<sup>F1</sup> apareceu com frequências iguais a 0,002 e 0,024 nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga, respectivamente, tendo sido observado também em baixa frequência em cavalos Crioulos do Uruguai (0,036) (Kelly, 2002). Em cavalos Puro Sangue Inglês e Quarto de Milha esse mesmo alelo apareceu com frequência significativa igual a 0,310 e 0,185, respectivamente (Bowling e Clark, 1985).

---

No sistema da hemoglobina (Figura 16), os alelos mais freqüentes, em ambas as raças, foram Hb<sup>A</sup><sub>2</sub> (0,430), no Mangalarga e Hb<sup>B</sup><sub>1</sub> (0,581) no Mangalarga Marchador, sendo este, também o mais freqüente em cavalos Crioulos do Uruguai (0,553), Pura Raça Espanhola (0,773), Árabe (0,565) e Cartujano (0,915) (Kelly, 1999; Bowling & Clark, 1985).

O sistema da esterase (Figura 17) apresentou três alelos, sendo, em ambas as raças, Es<sup>I</sup> o mais freqüente, seguido pelo alelo Es<sup>F</sup>. Essa distribuição está de acordo com a distribuição encontrada por Kelly, (1999) e Bowling e Clark, (1985), em cavalo Crioulo do Uruguai, Crioulo da Argentina, Puro Sangue Inglês, Árabe, Quarto de Milha, Paso Fino e Paso Peruano.

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 11), calculado para os sistemas de polimorfismos bioquímicos, demonstrou que a população Mangalarga encontra-se em equilíbrio genético para todos sistemas, o mesmo ocorrendo para a raça Mangalarga Marchador com relação aos sistemas Al, PGD, Gc e Hb. Essa última raça, entretanto, apresentou um desvio significativo, ao nível de 5%, para os sistemas A1B, Es e Tf. Ouragh et al. (1994b) reportaram que as populações estudadas, das raças Árabe, Berbere e cruzas Árabe-Berbere encontravam-se em equilíbrio para os sistemas Al, Tf e PGD, nada indicando sobre outros seis sistemas analisados. Esse desvio pode ser discutido por algumas possíveis causas. Uma delas seria o fato da população não apresentar todas as condições necessárias para a aplicação da lei de Hardy-Weinberg, tais como ausência de seleção e cruzamento ao acaso.

No caso dos sistemas da Es e Tf, o desequilíbrio na raça Mangalarga Marchador também poderia ser explicado pela presença do alelo nulo reportado por Bell et al. (1995) e Schimid et al. (1990), que estaria ocorrendo nessa raça e não foi detectado pela técnica usada. Cothran et al. (1998), estudando todos os sistemas examinados no presente trabalho mais os sistemas glucose fosfato isomerase (GPI), fosfoglucomutase (PGM) e inibidor de protease (Pi), observaram desvio significativo apenas no sistema da Es.

As diferenças entre as duas raças estudadas podem refletir mais diretamente uma divergência que teria ocorrido entre as duas populações devido à seleção artificial diferente que foi praticada sobre elas, embora a raça Mangalarga tenha sofrido introdução de material genético de uma variedade maior de raças eqüinas, enquanto o Mangalarga Marchador sofreu cruzamentos com uma diversidade menor de raças. Uma suposição é que a raça Mangalarga Marchador ainda não está estabilizada, tendo ocorrido, ainda recentemente, introgressão de alelos de outras raças, o que tem um paralelo na data de fechamento dos livros de registro genealógico, o que, para a raça Magalarga ocorreu em 1943 e para a raça Mangalarga Marchador, ocorreu em 1966, para machos e, em 1984, para fêmeas.

**TABELA 11.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os sete sistemas eletroforéticos nas raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Sistemas	MM		ML	
	$\chi^2$	Probabilidade	$\chi^2$	Probabilidade
Al	0.33	0.5<P<0.7	0.19	0.5<P<0.7
Tf	49.28	P<<0.001*	26.31	0.3<P<0.5
Es	23.7	P<0.001*	2.98	0.3<P<0.5
PGD	3.21	0.3<P<0.5	0.23	0.95<P<0.98
A1B	6.44	0.01<P<0.02*	0.06	0.8<P<0.9
Gc	0.83	0.3<P<0.5	0.08	0.7<P<0.8
Hb	6.58	0.3<P<0.5	8.26	0.2<P<0.3

\*  $\chi^2$  significativo ao nível de 0,05.

#### 4.5 Heterozigosidade

A heterozigosidade foi calculada com base na variabilidade exibida pelos sete sistemas de polimorfismos bioquímicos e pelos sistemas de grupos sanguíneos C, D, K, P e U. A Tabela 12 mostra a heterozigosidade para cada sistema e a heterozigosidade média.

A raça Mangalarga Marchador apresentou uma maior variabilidade genética intrapopulacional, com um índice de heterozigosidade média igual a 0,36 comparado com o valor de 0,29, da raça Mangalarga. Os sistemas que apresentaram maiores índices de

heteroziguidade em ambas as raças foram, D, U, Tf, Hb, e Al. A enzima Es apresentou alto índice na raça Mangalarga Marchador (0,45) e baixo na raça Mangalarga (0,10).

**TABELA 12:** Heteroziguidade esperada nos sistemas de polimorfismos bioquímicos e sistemas C, D, K e U nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga.

Sistemas	Al	Tf	Es	PGD	A1B	Gc	Hb	C	D	K	P	U	Média
MM	0.50	0.55	0.45	0.08	0.08	0.07	0.55	0.46	0.84	0.00	0.29	0.50	0.36
ML	0.41	0.60	0.10	0.04	0.02	0.02	0.65	0.20	0.84	0.01	0.13	0.48	0.29

O teste de  $\chi^2$ , por tabela de contingência, comparando as diferenças entre o número de heterozigotos e o de homozigotos, para cada um dos sistemas de polimorfismos bioquímicos nas duas raças, apresentou uma diferença significativa.

Vale ressaltar que esses valores podem estar sub-estimados, pelo fato dos grupos sanguíneos não serem codominantes.

A raça Mangalarga Marchador apresentou maior variabilidade que a raça Mangalarga, confirmando o fato da primeira ser a raça de origem e a segunda a derivada.

As raças Mangalarga Marchador e Mangalarga apresentaram valores esperados (0,36 e 0,29, respectivamente) de heteroziguidade média, se comparados com as médias de outras raças, tais como Campolina (0,41), Crioulo Brasileiro (0,42), Mangalarga Marchador (0,41) e Mangalarga (0,33) (Cothran et al., 1998); Crioulo do Uruguai (0,50), Quarto de Milha (0,51), Pura Raça Espanhola (0,48) e Puro Sangue Inglês (0,42) (Kelly, 1999). Esses valores estão próximos aos valores de heteroziguidade média das raças eqüinas domésticas, que variam de 0,295 a 0,443 (Bowling, 1994).

Os valores negativos do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) (Tabela 13) demonstram que há um excesso de heterozigotos observados na raça Mangalarga Marchador em quase todos os sistemas, com exceção dos sistemas da Al, PGD e A1B. Valores negativos também

foram observados por Kelly et al. (2002), em cavalos Crioulos do Uruguai (-0,015). Os valores positivos do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) mostraram que há um déficit de heterozigotos na maioria dos sistemas na raça Mangalarga, com exceção dos sistemas da Al e Hb que apresentaram excesso de heterozigotos.

Os valores de  $F_{IS}$  demonstraram ausência de endocruzamento em ambas as raças.

**TABELA 13:** Coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), índice de fixação ( $F_{ST}$ ) e probabilidade (P) para os sistemas de polimorfismos bioquímicos nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga

Locos	MM		ML		$F_{ST}$	P
	$F_{IS}$	P	$F_{IS}$	P		
Al	0.009	0.432	-0.008	0.579	0.104	0.001
Tf	-0.017	0.768	0.049	0.075	0.004	0.001
Es	-0.089	0.993	0.062	0.075	0.307	0.001
PGD	0.000	0.621	0.126	0.032	0.005	0.023
A1B	0.094	0.036	-0.009	1.000	0.022	0.001
Gc	-0.038	1.000	-0.008	1.000	0.015	0.001
Hb	-0.021	0.746	-0.035	0.850	0.130	0.001
Média	-0.023	0.946	0.007	0.329	0.117	0.001

O índice de fixação ( $F_{ST}$ ), aplicado em todos os sistemas de polimorfismos bioquímicos revelou que 11,8% da variabilidade genética entre as populações é devida a diferenças entre elas, e que os 88,2% restantes se devem a diferenças entre os indivíduos.

#### 4.6 Heterogeneidade

O teste de qui-quadrado de heterogeneidade, em cada sistema de polimorfismo bioquímico, apresentou um desvio não significativo entre as populações das raças Mangalarga e Mangalarga Marchador, mostrando que as duas amostras são homogêneas. Os valores de qui-quadrado para cada sistema estão na Tabela 14.

**TABELA 14.** Valores do teste de homogeneidade para os sete sistemas eletroforéticos nas raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Sistemas	H	Probabilidade
Al	0.20	0.5<P<0.7
Tf	24.98	0.2<P<0.3
Es	7.22	0.05<P<0.10
PGD	0.52	0.90<P<0.95
A1B	0.51	0.3<P<0.5
Gc	0.08	0.7<P<0.8
Hb	4.47	0.5<P<0.7

#### 4.7 Probabilidade de Exclusão (PE)

A eficácia de um loco para testes de parentesco depende do número de alelos, de suas frequências e da possibilidade dos genótipos serem determinados diretamente através de seus fenótipos (cf. Bowling & Clark, 1985). Os locos mais informativos entre os estudados no presente trabalho em ambas as raças foram aqueles que apresentaram mais de quatro alelos com frequências apreciáveis. Esses locos foram os sistemas D, Hb e Tf, os quais apresentaram valores de probabilidade de exclusão igual a 0,44, 0,28 e 0,32, respectivamente, na raça Mangalarga Marchador e 0,45, 0,37 e 0,35, respectivamente, no Mangalarga.

Bowling & Williams, 1991, observaram valores de PE para o sistema D igual a 0,67 para Andaluz, 0,70 para Berbere, 0,70 para Mangalarga, 0,69 para Mangalarga Marchador, 0,44 para Crioulo Argentino e 0,75 para Paso Fino. Os grupos sanguíneos C e K apresentaram os menores valores de probabilidade de exclusão. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Bowling & Clark, 1985, que estudando 20 locos, em 7 raças de cavalos, encontraram valores muito próximos dos encontrados no presente trabalho para os locos aqui estudados (albumina variando de 13% a 19%, Gc de 2% a 15%, sistema D de 46% a 59%).

A probabilidade de exclusão total, calculada para os sistemas de polimorfismos bioquímicos e os grupos sanguíneos C, D, K, P e U foi baixa se comparada com outras raças sendo de 86,52% para raça Mangalarga e de 86,94% para a raça Mangalarga Marchador (Tabela 15). Bernoco (1996) considerando cinco sistemas de grupos sanguíneos e mais quatro

sistemas de variantes protéicas calculou a PE (Probabilidade de Exclusão de falso parentesco) para as raças Apaloosa, Árabe, Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês, encontrando respectivamente, 97,4%, 94,4 %, 98,2 % e 91,5 %. (cf. Oliveira & Kuabara 2001). Bowling & Clark (1985) estudando as raças Puro Sangue Inglês, Árabe, Standardbred, Quarto de Milha, Paso Fino e Paso Peruano encontraram valores de PE iguais a 96%, 97%, 98%, 99%, >98% e >98% respectivamente. Ouragh et al. (1994b), reportou o valor de 98,6% de PE em cavalos Berbere, considerando um número maior de locos os quais incluíam o sistema inibidor de protease (Pi), que é altamente polimórfico.

**TABELA 15:** Probabilidade de Exclusão total e de cada sistema (em %) das raças MM e ML.

Sistemas	Al	Tf	Es	PGD	A1B	Gc	Hb	C	D	K	P	U	Total
MM	18,80	32,40	17,50	4,10	3,90	3,20	28,30	1,01	43,74	0,00	0,16	3,52	86,94
ML	16,40	35,00	4,60	1,70	9,00	9,00	36,90	0,01	44,61	0,43	0,07	1,66	86,52

#### 4.8 Identidade Genética

O cálculo da identidade genética (I) para os locos de polimorfismos bioquímicos e para os sistemas de grupos sanguíneos C, D, K, P e U revelou que a semelhança entre as duas populações é de 95,94%. Em cada loco os valores de I variaram de 77,8% a 100% (Tabela 16).

**TABELA 16:** Identidade genética de Nei entre as populações ML e MM para sete sistemas eletroforéticos e três sistemas de grupos sanguíneos (C, D, K, P e U).

Sistemas	Al	Tf	Es	PGD	A1B	Gc	Hb	C	D	K	P	U	Total
Identid. De Nei	0.91	0.99	0.91	1.00	0.99	0.99	0.78	0.93	0.79	1.00	1.00	0.97	0.96

Cothran et al. (1998), comparando populações de cavalo Pantaneiro com outras raças equinas, entre elas Mangalarga Marchador e Mangalarga, observou que essas duas raças

---

também apresentam proximidade genética com raças como Campolina, Pantaneiro, Crioulo Brasileiro, Crioulo Argentino e Crioulo Chileno, tendo o cavalo Pantaneiro mais proximidade com a raça Mangalarga e o Campolina com o Mangalarga Marchador.

Os locos da Hemoglobina e do sistema D podem ser considerados diagnósticos pelo fato de apresentarem menor semelhança genética, o que sugere uma maior investigação desses dados.



---

## 5. CONCLUSÕES

Uma grande quantidade de polimorfismo genético pode ser observada nas raças Mangalarga Marchador e Mangalarga. Essa variabilidade pode ser vista nos sistemas de grupos sanguíneos e de polimorfismos bioquímicos, investigados no presente trabalho.

A comparação entre as duas raças mostrou que existem diferenças estatisticamente significativas entre elas, quanto a algumas das características estudadas. Entretanto, para a maioria dos sistemas as duas raças apresentaram muitas semelhanças entre si.

A raça Mangalarga Marchador apresentou maior variabilidade genética intrapopulacional, embora a variabilidade interpopulacional tenha permanecido constante. Essa variabilidade confirmou o fato desta ser a raça de origem, tendo o Mangalarga como raça derivada.

Pelos dados obtidos, podemos supor que a presença de marcadores genéticos específicos da raça Andaluz ( $Tf^d$  e  $D^{cfe^k}$ ) nas raças estudadas, demonstra a influência dessa raça na formação dos cavalos Mangalarga e Mangalarga Marchador. As similaridades com as raças Berberes, que teve influência sobre as raças da península ibérica, através da existência do fenogruppo  $D^{dekl}$ , também pode sugerir a influência dessa raça na formação do cavalo Mangalarga Marchador.

O resultado do teste de identidade genética sugeriu que os locos da Hemoglobina e do sistema D podem ser considerados diagnósticos, demonstrando a necessidade de uma maior investigação desses dados.

Concluiu-se, portanto, que os dados genéticos aqui obtidos mostraram que as duas populações apresentam uma conservação na maioria das características genéticas herdadas dos ancestrais comuns, o que corrobora a suposição de que elas sejam semelhantes entre si devido a essa origem comum, apesar dos diferentes cruzamentos ocorridos desde suas formações.

Quanto aos marcadores genéticos estudados, os mais informativos para os testes de parentesco, foram aqueles que apresentaram mais de quatro alelos com frequências apreciáveis. Esses locos foram os sistemas D, Hb e Tf. Os valores de probabilidade de exclusão desses três locos representam 72,7% dos 86,94% da raça Mangalarga Marchador e 77,28% dos 86,52% da raça Mangalarga.

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANONYMOUS. Meeting of the Horse Research Section at the 14th ISABR Conference. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 5: 196-197, 1974.

AGAR N.S.; BOARD P.G. Red Blood cells of domestic mammals. **Ed. N.S. Agar and P.G. Board.** Amsterdam, 1983.

AYRES M., AYRES JR. M., AYRES D.L., et al. **BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade Civil Mamirauá (Belém); CNPq (Brasília), 2000.

BEIGUELMAN B. **Genética Médica-Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** EDART (São Paulo), 489p., 1981.

BELL K.; POLLITT C.C.; PATTERSON S. D. Subdivision of equine Tf into H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>. **Animal Genetics** 19:177-183, 1988.

BELL K., ARTHUR H.; BREEN M. Mutation in the equine plasma transferrin and esterase systems. **Animal Genetics** 26:407-411, 1995.

BENGTSSON S.; SANDBERG K. A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. **Animal Blood. Groups and Biochemical Genetics** 4: 83-87, 1973.

**BORTONI R.F.** O Mangalarga Marchador e os outros cavalos de sela no Brasil.

**Grupo Rotal Ltda (sem ano da publicação), 187 p.**

BOWLING A.T.; CLARK, R.S. Expansion of the P blood group system of the horse. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 16: 145-148, 1985.

BOWLING A.T. Genetic linkage between loci for red cell alloantigen (U) and serum protease inhibitor (PI) in the horse. **Animal Genetics** 17:217-233, 1986.

---

BOWLING A.T.; SCOTT A.M., FLINY J.; CLEGG J.B. Novel alpha haemoglobin haplotypes in horses. **Animal Genetics** 19:87-101, 1988.

BOWLING A.T.; WILLIAMS M.J. Expansion of D system of horse red cell alloantigens. **Animal Genetics** 22: 361-367, 1991.

BOWLING A.T. Population genetics of Basin feral horses. **Animal Genetics** Supl. 25:67-74, 1994.

BOWLING A.T.; RUVINSKY A. **Genetic Aspects of Domestication, Breeds and Their Origins. in The genetics of the Horse.** Edited by A. T. BOWLING & A. RUVINSKY. **CABI Publishing**, 527 p., 2000.

BRAEND M. Estimation of gene frequencies in the B system of cattle. **Immunogenet. Lett.**, 43-48, 1963.

BRAEND M.; STORMONT C. Studies on hemoglobin and transferrin types of horses. **Nord. Vet. Med.** 16:31-37, 1964.

BRAEND M, EFREMOV G, FAGERHOL MK, HARTMANN O. Albumin and transferrin variants in norwegians. **Hereditas** 53(1):137-42, 1965.

BREWER G. J. **An introduction to isozyme techniques.** New York, Academic Press. 186p., 1970.

BROWN T.A. **Genetics a molecular approach.** Second Edition. Chapman & Hall, London, 1992.

CARNEIRO E.; DUARTE J. S.; DIAS M. V. **A História do Cavalo Mangalarga Marchador.** Editora Nova Fronteira, 89 p., 1991.

CHOWDHARY BP, RAUDSEPP T. HSA4 and GGA4: remarkable conservation despite 300-Myr divergence. **Genomics**, 64(1):102-5, 2000.

CLEGG J.B. Horse haemoglobin polymorphism: evidence for two linked non-allelic alpha-chain genes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**;176(43):235-46, 1970.

GOODBOURN S.E.Y; BRAEND M. Genetics organization of the polymorphic equine  $\alpha$ -globin locus and sequence of the BII  $\alpha_1$  gene. **Nucleic Acids Research** 12, 7847-58, 1984.

COLLIN D.T. Canadian Belgian horse blood typing: occurrence of a null allele in the D blood group system. **Animal Genetics** 18 (Suppl 1): 129, 1987.

COTHRAN E.G., HENNEY P.J. ; KING J.A. Inheritance of the equine Tf F3 allele. **Animal Genetics** 22:187-190, 1991.

COTHRAN E. G.; LONG Y.G. A new phenogroup in the horse D system of red cell alloantigens found in the Caspian pony. **Animal Genetics** 25:49-50, 1994.

COTHRAN E.G.; SANTOS S.A.; MAZZA M.C.M.; et al. Genetics of the Pantaneiro horse of the Pantanal region of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Vol. 21 n<sup>o</sup>. 3, 1998.

DEL LAMA S.N. Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos. Ribeirão Preto, SP : USP. **Tese de Doutorado**. 207p., 1992.

EDWARDS E.H. **Eyewitness Handbooks – Horses**. Dorling Kindersley, 256 p., 1993.

EDWARDS E.H. **O grande livro do cavalo**. Livros & Livros, 240 p., 1994.

FERGUSON A. **Biochemical Systematics and Evolution**. London, Blackie, 194p.,1980.

FISHER R.A.; SCOTT A.M. Isoelectric focusing of horse serum esterase isozymes and detection of new phenotypes. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 9:207-213, 1978.

FRANCISCO M.R. Efeitos da fragmentação da Mata Atlântica sobre populações de aves verificados através de análises de microsátélites. São Carlos, SP: Ufscar. **Dissertação de Mestrado**. 78p., 2001.

FRANKS D. Horse blood groups and hemolytic disease of the newborn foal. **Annals of the New York Academy of Sciences** 97: 235-250, 1962.

GAHNE B. Studies on the inheritance of electrophoretic form of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses. **Genetics** 53:126-135, 1966.

---

GAHNE B., JUNETA R. K.; GROLMUS J. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. **Animal Blood Groups and biochemical Genetics** 8:127-137, 1977.

GAHNE B., SANDBERG K.; JUNEJA R. K. Horse hemoglobin phenotyping by agarose gel isoelectrifying focusing, evidence for a new recombinant haplotype. Abstract 17<sup>th</sup> International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism. **Animal Blood Groups Biochemical and Biochemical Genetics** 11 (Supl. 1) 35-36, 1980.

GEDDES C. **The concise book of the horse**. Arco Publishing Company, Inc., 166p., 1976.

GOUDET J. Fstat (vers.1.2). A computer program to calculate F-statistics. **J.Hered.** 86:485-486, 1995.

GOUDET J., RAYMOND M, DEMEEUS T. et al. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**. 144:1933-1940, 1996.

GROVES C.P.; RYDER O. A. **Systematics and Phylogeny of the Horse. in The Genetics of the Horse**. Edited by A. T. Bowling & A. Ruvinsky. CABI Publishing, 2000, 527 p.

HAMES B.D.; RICKWOOD D. **Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach**. Second Edition Oxford University Press, 1990.

JONES W.E.; BOGART R. **Genetics of the horse**. Caballus Publishers, 355 p. 1973.

JUNEJA A.K., GANHE B., SANDBERG K. Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. **Animal Blood. Groups and biochemical Genetics** 9:29-36, 1978.

KAKOI, H., GAWAHARA; MIURA N. Unusual D system inheritance in Anglo-Arab horse. **Animal Genetics** 26:53-54, 1995.

---

KELLY M.V. LUCÍA MSC. Análisis de Marcadores Genéticos en Caballos Criollos del Uruguay. Comparación com otras razas equinas. **Tesis de Doctoral**. Pedeciba Montevideo Uruguay, 1999.

KAMINSKI M. The biochemical evolution of the horse. **Comp Biochem Physiol B**. Review, 63(2):175-8, 1979.

KAMINSKI M.; DE ANDRÉS D.F. Electrophoretic markers of Andalusian Horses: comparison of Spanish and Lusitanian linages. **Comparative Biochemistry and Physiology** 83B, 575-588, 1986.

KUBY J. **Immunology**. W. H. Freeman and Company, 664 p., 1997.

LUSH I. E. The biochemical genetics of vertebrates except man. In: **Frontiers of Biology**, vol. 3 edited by A. Neuberger & E. L. Tatum, Amsterdam, North Holland Publishing Co., p. 39-58. 1966.

MATTHEWS A.G. The nature of prealbumin "Esterases" of horses serum. **Animal Blood Groups and biochemical Genetics** 10:181-184, 1979.

MILLER W. J. Blood groups: why do they exist? **Bioscience** 26:557-562, 1976.

MORRIS J.G. **Físico-Química para Biólogos**. EDSP, São Paulo, 450p., 1972.

MORTARI N., 1990. Estudo dos tipos sanguíneos em bovinos selecionados para leite e para corte da raça Gir (*Bos indicus*) criada no Brasil. **Tese de Doutorado**. Campinas, SP. UNICAMP.

NEI M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist** 106: 283-292, 1972.

NIINI T.; STRATIL A.; CÍZOVÁ-SCHROFFELOVÁ D.; SANDBERG K. A partially deficient and atypical equine transferrin variant, TF N. **Animal Genetics** 28:233-234, 1997.

NOGAJ A., DUNIEC M.J., SLLOTA E., DUNIEC M. Three newly detected alloantigens in the U blood group system of horses. **Animal Genetics** 28:308-322, 1997.

---

OLIVEIRA A.C. Estudo de grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos em bovinos da raça canchim. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos, SP. UFSCar, 1996.

OLIVEIRA D. A. A.; KUABARA M.Y. **A Genealogia, sua Importância para o Melhoramento e para Produção Animal e os Métodos de Confirmação dos Pedigrees**. PEREIRA, J.C.C. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. Belo Horizonte. p.435-444, 2001.

OURAGH L.; JUNEJA R. K. A new allele in the horse Gc system. **24<sup>th</sup> Conference of ISAG**. B23 (Praga), 1994a.

OURAGH L.; MÉRIAUX, J.C.; BRAUN, J. P. Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Marocco. **Animal Genetics** 25: 45-47, 1994b.

RYDER O.A.; SPARKES R.S.; SPARKES M.C.; CLEGG J.B. Hemoglobin polymorphism in *Equus przewalskii* and *Equus caballus* analysed by isoelectric focusing. **Comparative Biochemistry and Physiology** 62B:305-308, 1979.

SALZANO F.M. **A Genética e a Lei (aplicações à medicina legal e à biologia social**. EDUSP - São Paulo, 151p., 1983.

SANDBERG K. A third allele in the horse albumin system. **Anim. Blood Grps biochem. Genet.** 3:207-210, 1972.

SANDBERG K. The D blood system of the horse. **Anim. Blood Grps biochem. Genet.** 4:193-205, 1973

SANDBERG K. Blood typing of horses: current status and application to identification problems. **Proc. of 1<sup>st</sup> World Congress of Genetics applied to Livestock Production**:253-265, 1974.

SANDBERG K. Studies on blood groups and genetic protein polymorphisms of the horse. **Swedish University of Agricultural Sciences**, report 38, 173 p., 1979.

---

SCHIMID D.O.; EK N.; BRAEND M. Further evidence for a silent allele in the transferrin locus of the horse. **Animal Genetics** 21: 423-426, 1990.

SCOTT RB. Rapid technic for preparation of hemoglobin solutions for electrophoresis. *Am J Clin Pathol*; 54(1):78-81, 1970.

SILVER C. **Guide to the horses of the world.** Treasure Press, 223 p., 1987.

SMITHIES O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem. J.** 61:629-641, 1955.

STARR C.; TAGGART R. **Biology – the unity of life.** Wadsworth Publishing Company, Inc., 921p., 1992.

STORMONT C. Linked genes, pseudoalleles and blood groups. **Am. Nat.** 89:105-116, 1955.

STORMONT C. Current status of blood groups in cattle. **Ann. New York Acad. Sci.** 97:251-268, 1962.

STORMONT C.; SUZUKI Y.; RHODE E. A. Genetic control of albumin phenotypes in horse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 114:673-675, 1963.

STORMONT C.; SUZUKI Y. Genetic systems of blood groups in horses. **Genetics** 50: 915-929, 1964.

STORMONT C.; SUZUKI Y.; RHODE E. A. Serology of horse blood groups. **Cornell Veterinarian** 54:439-452, 1964.

STORMONT C. The language of phenogroups. **Hematologia** 6:73-79, 1972.

STORMONT C. A survey of blood groups in several species of large animals used in medical research. **Research Animals in Medicine** 72-333 p. 505-513, 1973.

STRATIL A, TOMASEK V, BOBAK P, GLASNAK V. Heterogeneity of horse transferrin: the role of carbohydrate moiety. **Anim Blood Groups Biochem Genet.** 15(2):89-101, 1984

STRYER L. **Biochemistry** 4<sup>th</sup> ed., 1995.



SUZUKI Y. Studies on blood groups of horses. **Memoirs of the Tokyo University of Agriculture** 20:1-150, 1978.

WEIR B.S., COCKERHAM C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38:1258-1370, 1984.

WEIR B.S. **Genetic data analysis II**. Sinauer (Sunderland), 445p., 1996.

WEITKAMPS L. R; GUTTORMSEN S. A.; COSTELLO-LEARY P. Equine gene mapping: close linkage between the loci for soluble malic enzyme and Xk-Pa. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 13:279-284, 1982.