

VARIAÇÃO GENÉTICA E ENDOCRUZAMENTO EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE QUATRO RAÇAS CANINAS COM BASE NA ANÁLISE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES



GENETIC VARIATION AND INBREEDING IN BRAZILIAN POPULATIONS OF FOUR DOG BREEDS BASED ON THE ANALYSIS OF MICROSATELLITE MARKERS

Grattapaglia, D^{1,2}, Fagundes, RM², Soares, CN¹, Guimarães, CS¹, Diener, PSA¹, Ribeiro, MAN¹, Gusmão, CX³.

¹GENOMAX™-Heréditas Tecnologia em Análise de DNA, SHIN Centro de Atividades 02 Lote 19, Lago Norte, 70505-000 -Brasília, DF; ²Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília SGAN 916 módulo B, 70790-160 Brasília DF; ³Applied Biosystems do Brasil, Av. do Café 277 Torre B 10º andar 04311-000 São Paulo SP.

RESUMO

Diversas raças caninas no mundo tem apresentando um crescimento expressivo no número de animais registrados. Este crescimento demográfico tem sido acompanhado por um aumento na ocorrência de várias patologias que antes apresentavam casuística mais modesta. Vários fatores podem estar contribuindo para este aumento na ocorrência de patologias, mas certamente o componente genético relacionado ao incremento da endogamia é o mais determinante, agravado pelo problema da desorganização do sistema de registro genético e fraudes na declaração de parentesco. O foco central deste projeto foi a investigação dos padrões de variação genética e endogamia nas populações de algumas das principais raças caninas no Distrito Federal. Foram coletadas amostras de sangue de 375 animais ao acaso, evitando parentes de primeiro grau, pertencentes a quatro raças caninas que vem apresentando crescimento significativo no número de registros e uma incidência crescente de problemas genéticos. As amostras de DNA dos animais foram analisadas com dez locos microssatélites recomendados pela ISAG (International Society of Animal Genetics) para tipagem canina em um sistema multiplex. Bancos de dados de frequências alélicas para cada raça foram gerados. Embora alguns alelos raça-específicos tenham sido observados, as diferenças significativas entre raças foram quanto às distribuições relativas das frequências alélicas. Os coeficientes de endocruzamento (f) multiloco foram significativamente maiores que zero (IC a 95% por "bootstrap") para Cocker Spaniel ($f=0,06$), Poodle ($f=0,095$) e Pastor Alemão ($f=0,089$), mas não para Rottweiler ($f=-0,017$). Para a população de Rottweiler a diversidade alélica e heterozigosidades foram significativamente menores do que para as demais raças. Embora um menor número de animais tenha sido utilizado para Rottweiler, este resultado sugere uma base genética mais estreita para esta raça mas não um efeito fundador uma vez que f não foi significativamente diferente de zero. Este resultado pode ser explicado pelo fato do interesse nesta raça ser mais recente coincidindo com uma intensa importação de animais de diversos países na formação dos plantéis nacionais. Uma diferenciação genética significativa entre as raças foi verificada ($F_{st}=0,145$ entre as quatro raças) sendo que Cocker e Poodle são as raças geneticamente mais próximas ($F_{st}=0,06$ Dist. Nei = 0,199) enquanto Rottweiler é a raça geneticamente mais distinta ($F_{st}=0,28$ em relação a Pastor Alemão). Este padrão de forte diferenciação indica um passado de isolamento genético, e intensa seleção artificial. O sistema multiplex de 10 locos mostrou-se altamente informativo para a resolução de investigação de vínculo genético bem como para o estabelecimento de um sistema de gerenciamento e controle dos níveis de endocruzamento em programas de reprodução por "linebreeding" e introdução de novos animais em programas de "linecrossing".

INTRODUÇÃO

O endocruzamento (cruzamento entre indivíduos com grau de parentesco maior do que a média dos indivíduos da população de origem) é um conceito chave na fundamentação das atividades relacionadas à reprodução de animais de companhia, e no manejo de populações de zoológicos e espécies em extinção. Em populações cativas, submetidas a processos controlados de cruzamento e seleção direcional, o endocruzamento resulta de estratégias de melhoramento envolvendo acasalamentos entre indivíduos aparentados. Em cães, tipicamente são utilizados métodos envolvendo cruzamentos entre indivíduos aparentados ("linebreeding") com o objetivo de "fechar" linhagens de sangue e com isso manter características fenotípicas desejáveis.

A depressão por endogamia tem sido vastamente documentada em animais domésticos. Considera-se que o desempenho quanto a características reprodutivas e viabilidade diminui cerca de 1% da média para cada 1% de aumento no coeficiente de endocruzamento, embora esses valores sejam altamente questionáveis (Nicholas 1996). As taxas de depressão por endogamia observadas em características de adaptação, juntamente com o aumento da frequência de defeitos genéticos e anormalidades dão, portanto, significado ao fracasso da maioria das tentativas de criar linhagens altamente endocruzadas de animais domésticos (linhas de sangue fechadas) (Ubbink et al. 1992).

Embora o conceito do controle do endocruzamento seja, em geral, conhecido, a grande maioria dos criadores de cães realizam a seleção de seus padreadores e matrizes baseando-se exclusivamente em um conjunto de características fenotípicas em levar em consideração informações de pedigree e ancestralidade de forma a monitorar o nível de endocruzamento. Na realidade muitas vezes essas informações não são disponíveis ou são até mesmo ignoradas. Somado a isso existe o problema da desorganização do sistema de registro genético de animais e fraudes na declaração da paternidade e/ou maternidade.

A possibilidade de realizar uma análise genética detalhada com marcadores moleculares dos indivíduos utilizados em programas de seleção e recombinação de cães, seria muito útil para identificar parentescos incertos ou desconhecidos de animais a serem utilizados em esquemas de acasalamentos dentro de linhas "linebreeding" bem como para selecionar animais em programas de cruzamento entre linhas ("linecrossing"). Para isso torna-se necessário inicialmente otimizar sistemas robustos de tipagem molecular bem como construir bancos de dados de frequências alélicas para as raças a serem contempladas. Alguns poucos estudos de análise genética com marcadores microssatélites tem sido realizados no mundo com raças caninas (Zajc e Sampson 1999; Altet et al. 2001), muitas vezes voltados para o entendimento da origem de raças locais (Roy et al. 1994; Morera et al. 1999; Koskinen e Bredbacka 2000; Kim et al. 2001). No Brasil a utilização de exames de DNA em cães é muito recente e nenhum trabalho tem sido publicado sobre a caracterização da estrutura genética das populações locais das principais raças de cães de companhia.

OBJETIVOS

1. Implementação e otimização de um sistema de identificação genética de cães utilizando marcadores moleculares baseados em seqüências de microssatélites em sistemas multiplex com detecção fluorescente.
2. Construção de um banco de dados de frequências alélicas para os locos utilizados na identificação individual de cães para quatro das principais raças criadas no Distrito Federal e avaliação do desempenho forense para identificação individual e determinação de vínculo genético.
3. Quantificação do coeficiente de endocruzamento existente nas populações de quatro raças caninas que vem apresentando crescimento no número de indivíduos registrados e aumento na incidência de patologias.
4. Teste do sistema em exames de paternidade e maternidade.

Tabela 1. Estatísticas descritivas para os dez locos nas quatro raças estudadas. Ho Heterozigosidade observada; He Heterozigosidade esperada; f coeficiente de endocruzamento; HWE p valor p para teste exato da aderência ao equilíbrio de Hardy Weinberg. O coeficiente de endocruzamento multiloco foi testado via "bootstrapping" pela geração de um intervalo de confiança a 95%.

COCKER (n=98)						
Loco	Nº alelos	Ho	He	f	HWE p	
PEZ1	6	0,693390	0,614583	0,114184	0,260625	
FHC2054	9	0,800209	0,775510	0,031020	0,048438	
FHC2010	5	0,712315	0,625000	0,123144	0,021562	
PEZ5	6	0,667860	0,659794	0,012139	0,058750	
PEZ20	5	0,715966	0,641304	0,104794	0,345938	
PEZ12	8	0,751387	0,765306	-0,018622	0,079375	
PEZ3	19	0,879445	0,831325	0,055031	0,014687	
PEZ6	7	0,783145	0,753086	0,038613	0,744687	
PEZ8	9	0,764194	0,723404	0,053648	0,006250	
FHC2079	4	0,480272	0,418367	0,129474	0,119375	
Média	7,7	0,724818	0,680768	0,061087		

* I.C. 95% 0,032318 a 0,089851

POODLE (n=140)						
Loco	Nº alelos	Ho	He	f	HWE p	
PEZ1	8	0,784867	0,696000	0,113631	0,000937	
FHC2054	12	0,846165	0,791667	0,064659	0,057188	
FHC2010	5	0,636569	0,603774	0,051752	0,480312	
PEZ5	7	0,669255	0,593496	0,113610	0,005313	
PEZ20	8	0,651454	0,532787	0,182772	0,000000	
PEZ12	9	0,796956	0,795276	0,002117	0,826875	
PEZ3	18	0,902467	0,728571	0,193814	0,000000	
PEZ6	10	0,820989	0,718750	0,125396	0,047500	
PEZ8	7	0,768711	0,733585	-0,006370	0,064687	
FHC2079	5	0,687570	0,612403	0,109702	0,084062	
Média	8,9	0,756500	0,684631	0,095387		

* I.C. 95% 0,056860 a 0,133664

PASTOR ALEMÃO (n=100)						
Loco	Nº alelos	Ho	He	f	HWE p	
PEZ1	6	0,393651	0,389474	0,010667	0,143437	
FHC2054	9	0,753612	0,702128	0,068659	0,059062	
FHC2010	4	0,591646	0,549451	0,071686	0,032188	
PEZ5	4	0,257143	0,263158	-0,023519	0,773438	
PEZ20	5	0,490503	0,433333	0,117131	0,320625	
PEZ12	9	0,417164	0,387755	0,070834	0,344687	
PEZ3	14	0,680790	0,544304	0,105481	0,074375	
PEZ6	11	0,836180	0,671053	0,198533	0,000937	
PEZ8	8	0,747743	0,728261	0,026194	0,209375	
FHC2079	6	0,423705	0,357143	0,157777	0,008125	
Média	7,6	0,551942	0,502606	0,089828		

** I.C. 95% 0,049812 a 0,130192

ROTTWEILER (n=47)						
Loco	Nº alelos	Ho	He	f	p	
PEZ1	5	0,648299	0,536585	0,174097	0,433125	
FHC2054	4	0,211289	0,256410	-0,216974	1,000000	
FHC2010	3	0,568070	0,657895	-0,160602	0,677500	
PEZ5	2	0,292405	0,250000	0,146608	0,322813	
PEZ20	2	0,195483	0,216212	-0,107692	1,000000	
PEZ12	7	0,666001	0,628676	-0,196546	0,030625	
PEZ3	10	0,698795	0,761905	-0,091514	0,032188	
PEZ6	8	0,580773	0,588235	-0,013047	0,311563	
PEZ8	4	0,647353	0,564103	0,130073	0,624062	
FHC2079	4	0,694132	0,666667	0,040000	0,930937	
Média	4,9	0,520260	0,529289	-0,017555	n.s.	

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de animais: Foram amostrados, aleatoriamente, 385 animais assim distribuídos: 98 da raça Cocker, 140 da raça Poodle, 100 da raça Pastor Alemão e 47 da raça Rottweiler. Os animais para o estudo foram disponibilizados através de uma chamada de voluntários a partir de listagens de clientes de clínicas veterinárias particulares do DF bem como via anúncio em jornal de grande circulação. Não foi tomada nenhuma medida específica para minimizar parentesco entre os animais ou evitar tendenciosidades demográficas a não ser o cuidado de não coletar animais sabidamente parentes em primeiro grau (ex. pais e filhos, irmãos).

Coleta de amostra e extração de DNA: Foram coletadas amostras de sangue periférico em EDTA ou esfregadas da mucosa bucal dos animais amostrados e o DNA extraído utilizando protocolos padrão para os dois tipos de amostras.

Análise genética com microssatélites: As amostras de DNA foram analisadas com um total de 10 locos microssatélites mapeados no genoma canino sendo nove tetranucleotídeos e um dinucleotídeo (PEZ3) recomendados internacionalmente pela ISAG (International Society of Animal Genetics) para a determinação de perfis genéticos e exames de vínculo genético de cães. Estes locos são organizados em um sistema multiplex comercial de uma única PCR e única pista de gel com marcação fluorescente denominado "Stockmark Canine I" (Applied Biosystems Inc.) : PEZ1, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12, PEZ20, FHC2010, FHC2054 e FHC2079. Os produtos da PCR foram resolvidos em gels desnaturantes em sequenciador automático de DNA ABI Prism 377XL e os dados analisados utilizando o software GeneScan e Genotyper. A declaração dos genótipos foi feita automaticamente utilizando uma "macro" específica do Genotyper desenvolvida no nosso laboratório.

Análises estatísticas: Estatísticas descritivas, testes de equilíbrio de HW e de equilíbrio de ligação, estimativas de distâncias genéticas (Nei 1978), testes exatos de Fisher para equilíbrio de HW e de equilíbrio de ligação gamética e diferenciação entre as raças (F_{st}) foram realizados com o software Genetic Data Analysis (GDA) (Lewis e Zaykin 2000). O desempenho forense da bateria de locos para identificação individual e determinação de paternidade foi avaliado pela estimativa da Probabilidade de Exclusão de paternidade e Probabilidade de Identidade (Weir 1996).

Exames de paternidade e maternidade: O sistema multiplex foi utilizado para a realização de alguns exames de paternidade e maternidade em trio e duo (somente filhote e suposto padreador) para demonstrar a utilidade do sistema de identificação.

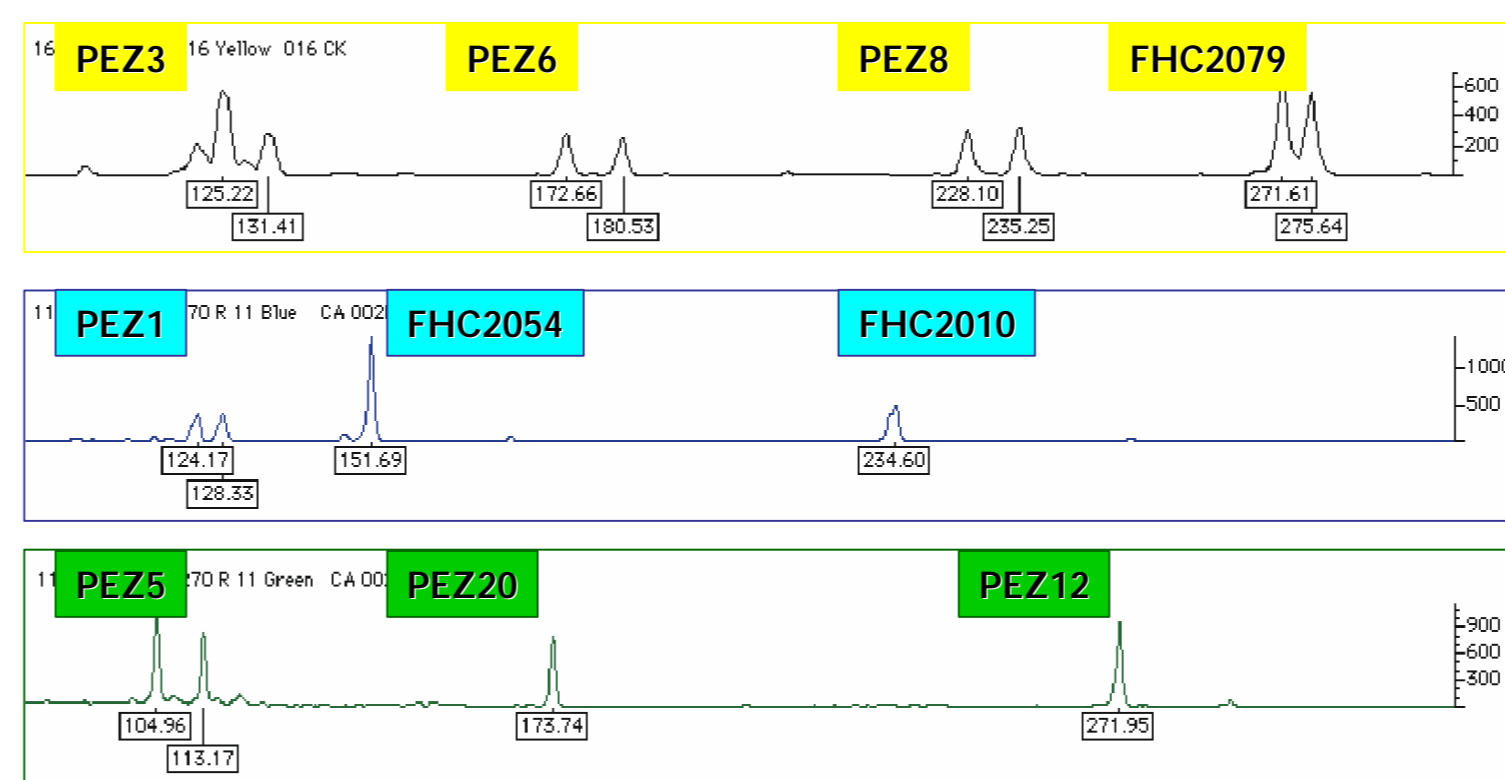


Figura 1. Eletroferograma dos dez locos utilizados no sistema multiplex Stockmark Canine I (ABI) para análise genética de cães. Os alelos são declarados em pares de bases com precisão de duas casas decimais e depois exportados automaticamente para uma planilha após tratamento com uma macro no software Genotyper.

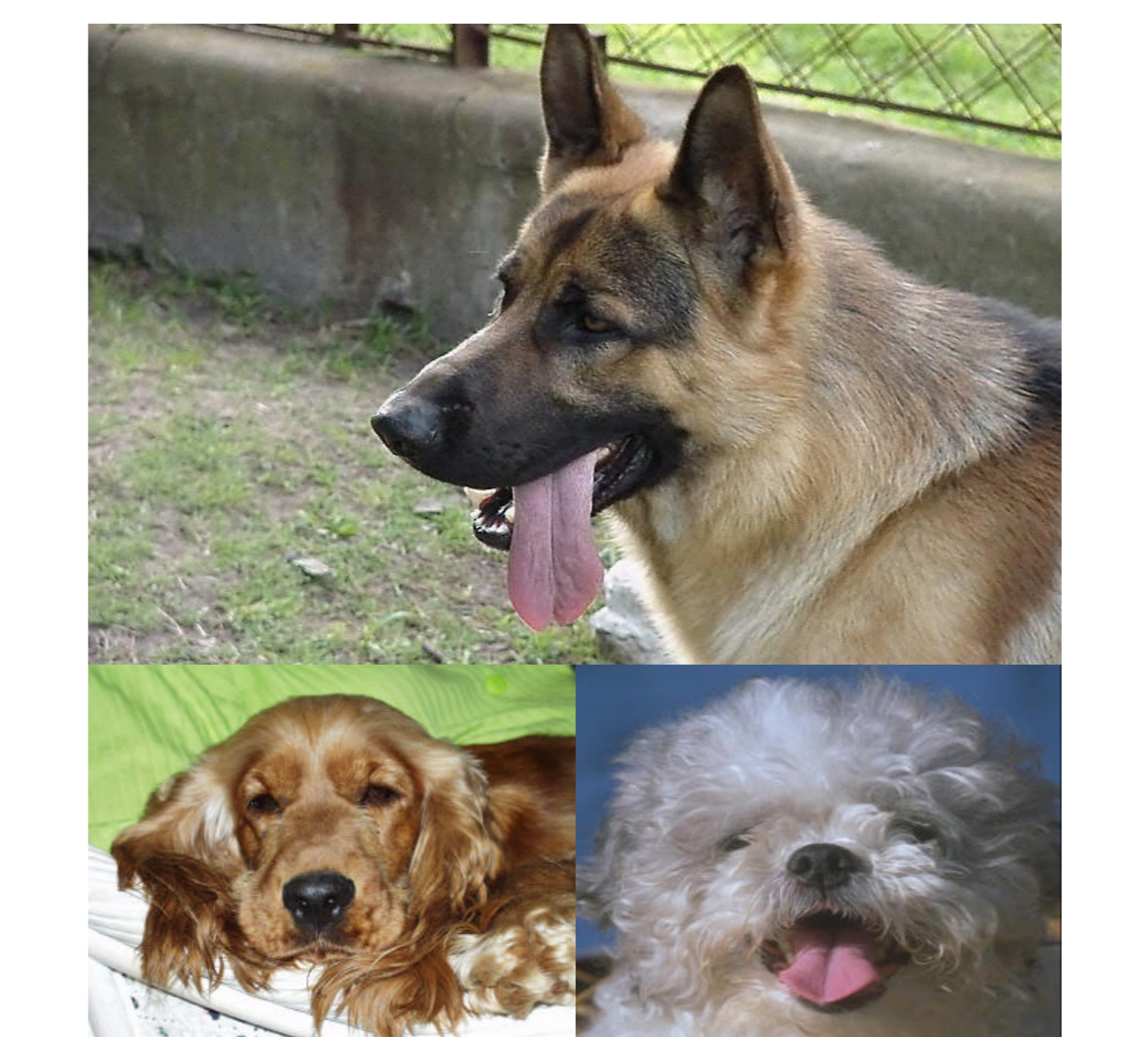


Tabela 2. Estimativas de similaridade genética de Nei (Nei 1978) acima da diagonal em verde, e de distância de Nei abaixo da diagonal em vermelho entre as quatro raças caninas.

	Cocker	Poodle	Pastor Alemão	Rottweiler
Cocker	-	0,819	0,757	0,540
Poodle	0,199	0	0,706422	0,558
Pastor Alemão	0,278	0,347	0	0,546
Rottweiler	0,616	0,582	0,605	0

Tabela 3. Estimativas de diferenciação genética entre populações (F_{st}) acima da diagonal, e intervalo de confiança a 95% via bootstrapping sobre as estimativas, abaixo da diagonal. Todas as estimativas foram significativamente maiores do que zero.

	Cocker	Poodle	Pastor Alemão	Rottweiler
Cocker	-	0,06	0,13	0,21
Poodle	0,03 a 0,08	-	0,14	0,20
Pastor Alemão	0,08 a 0,18	0,09 a 0,19	-	0,28
Rottweiler	0,16 a 0,27	0,12 a 0,27	0,18 a 0,37	-

Tabela 4. Estimativas de parâmetros de desempenho forense para os dez locos microssatélites individualmente e combinados nas quatro raças. P. Exc. Probabilidade de exclusão de paternidade (probabilidade com a qual o loco em questão exclui da paternidade um indivíduo erroneamente apontado como pai de um filhote - quanto maior mais informativo o loco); P. Idem. Probabilidade de identidade (probabilidade de dois animais diferentes terem o mesmo genótipo ao loco devido ao acaso - quanto menor mais informativo o loco).

LOCO	COCKER	POODLE	PASTOR ALEMÃO	ROTTWEILER
PEZ1	P.Exc. 0,471	P.Idem. 0,147	P.Exc. 0,602	P.Idem. 0,078
FHC2054	P.Exc. 0,635	P.Idem. 0,064	P.Exc. 0,231	P.Idem. 0,392
FHC2010	P.Exc. 0,497	P.Idem. 0,128	P.Exc. 0,560	P.Idem. 0,097
PEZ5	P.Exc. 0,415	P.Idem. 0,181	P.Exc. 0,331	P.Idem. 0,255
PEZ20	P.Exc. 0,488	P.Idem. 0,134	P.Exc. 0,140	P.Idem. 0,566
PEZ12	P.Exc. 0,546	P.Idem. 0,104	P.Exc. 0,287	P.Idem. 0,306
PEZ3	P.Exc. 0,765	P.Idem. 0,026	P.Exc. 0,412	P.Idem. 0,187
PEZ6	P.Exc. 0,593	P.Idem. 0,082	P.Exc. 0,662	P.Idem. 0,084
PEZ8	P.Exc. 0,582	P.Idem. 0,085	P.Exc. 0,558	P.Idem. 0,097
FHC2079	P.Exc. 0,275	P.Idem. 0,319	P.Exc. 0,445	P.Idem. 0,162
Locos combinados	99,96%	1,75 x 10¹⁰	99,97%	3,14 x 10¹¹
			99,4%	1,94 x 10⁷
			98,3%	9,77 x 10⁷

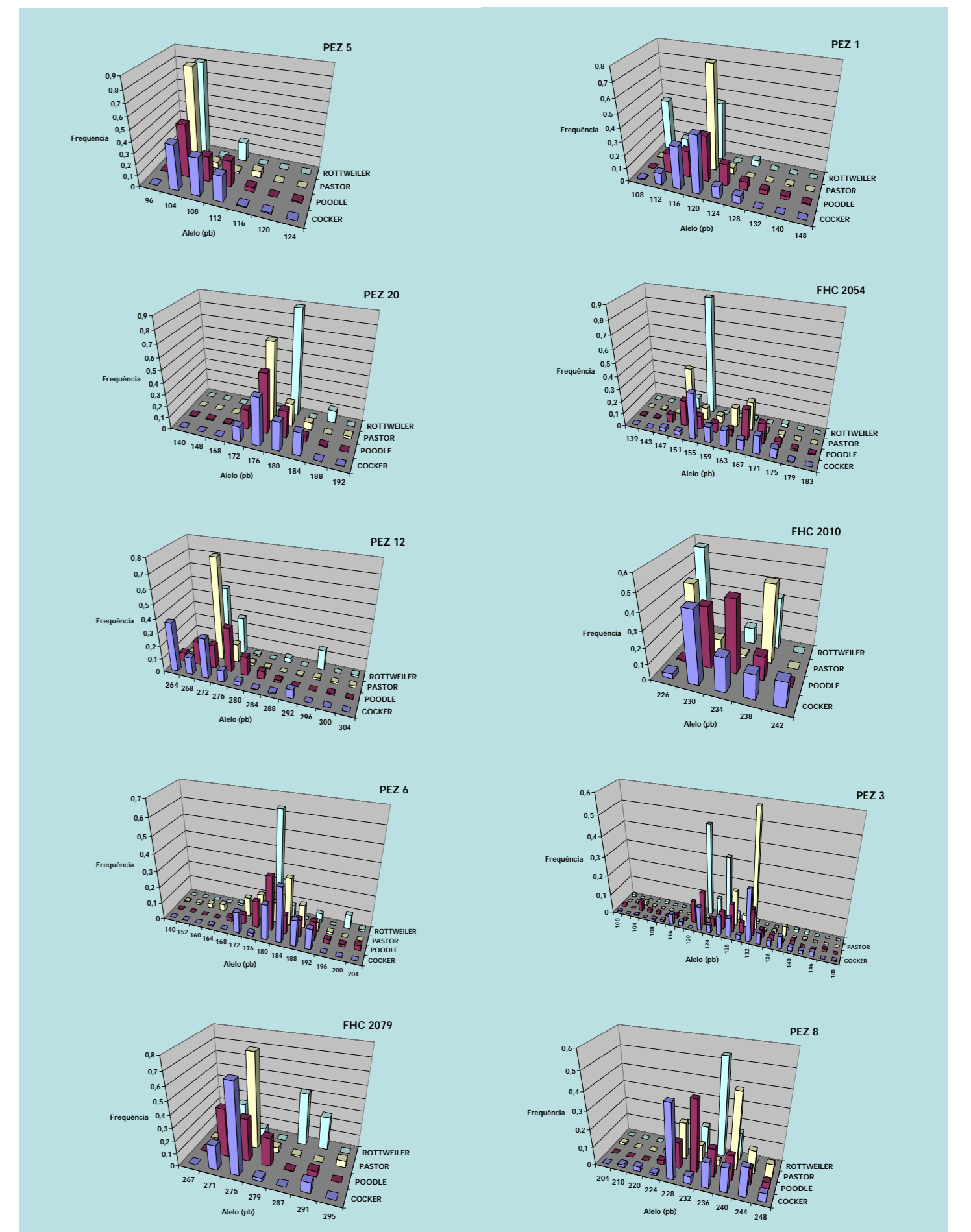


Figura 2. Histogramas de distribuição de frequências alélicas para os dez locos microssatélites nas quatro raças estudadas. Foi observada uma diferença significativa entre raças quanto às distribuições relativas das frequências alélicas para a maioria dos locos utilizando um teste exato de Fisher realizado com a função STRUCT do programa GenePop (Raymond e Rousset 1995) (dados não apresentados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema multiplex de dez locos demonstrou ser robusto para a geração de perfis genéticos individuais (Figura 1). Foi necessária a otimização do sistema do ponto de vista de concentração de primers, programa de PCR e principalmente quantidades de DNA derivadas dos dois tipos de material biológico coletado. O loco PEZ3, o único dinucleotídeo, demanda uma atenção especial na declaração dos genótipos seja manualmente bem como pelo macro, uma vez que os alelos diferem apenas em dois pares de bases. Por outro lado, conforme esperado, foi o loco com maior conteúdo de informação genética para determinação de individualidade e exames de vínculo genético. Entre os tetranucleotídeos, os locos FHC2054, PEZ6, PEZ8 e PEZ12 foram os de maior conteúdo informativo aliado, portanto, robustez na declaração de genótipos e elevado poder de exclusão de paternidade.

Bancos de dados de frequências alélicas para cada raça foram gerados (Figura 2). Embora alguns alelos raça-específicos tenham sido observados (ex. PEZ1 alelo 132 em Poodle; PEZ6 alelo 160 em Pastor Alemão) tipicamente as frequências destes alelos são menores do que 5%.

Índices de fixação (f) multiloco foram significativamente maiores que zero (IC a 95% por "bootstrap") para Cocker, Poodle e Pastor Alemão mas não para Rottweiler (Tabela 1). Para a população de Rottweiler a diversidade alélica e heterozigosidades foram significativamente menores do que para as demais raças. Embora um menor número de animais tenha sido utilizado, este resultado sugere uma base genética mais estreita para esta raça e não um efeito fundador uma vez que f não é significativamente diferente de zero. Este resultado pode ser explicado pelo fato do interesse nesta raça ser mais recente no país, coincidindo com uma intensa importação de animais de diversos países na formação dos plantéis nacionais.

Uma diferenciação genética significativa entre todas as raças foi verificada ($F_{st}=0,145$ para as quatro raças analisadas conjuntamente) sendo que Cocker e Poodle são geneticamente mais próximas (Dist. Nei = 0,199). A raça Pastor Alemão é mais próxima de Cocker e Poodle, enquanto Rottweiler é a raça geneticamente mais distinta das outras três (Tabelas 2 e 3).

O sistema multiplex de 10 locos Stockmark Canine I da ABI mostrou-se altamente informativo para a resolução de investigação de vínculo genético nas quatro raças. Para Cocker, Poodle e Pastor a análise dos dez locos alcança uma probabilidade de exclusão de paternidade a priori maior do que 99,9%. Para Rottweiler seriam necessários mais 2 a 4 locos para atingir o mesmo poder de exclusão (Tabela 4). Dois exames de paternidade são apresentados para ilustrar o sistema (Figura 3).

A análise genética com marcadores moleculares permite ainda a estimativa do grau de parentesco entre os cães mantidos em um plantel bem como entre padreadores e/ou matrizes de diferentes linhas, direcionando em base científica a escolha de animais para acasalamento de acordo com o objetivo do melhoramento genético do criador ("inbreeding", "linebreeding" ou "outbreeding"). Embora a análise destes marcadores microssatélites não visa e nem permite o mapeamento de genes responsáveis por doenças, a estimativa do grau de parentesco/distância genética, fornece uma informação útil para mitigar o risco de produzir ninhadas inadequadas em estratégias de geração de linhagens de sangue fechadas. Além disso, o exame de vínculo genético de cães abre a perspectiva de fornecer certificados de paternidade/maternidade de todos os animais gerados em um canil, agregando valor aos produtos.

Em conclusão, este trabalho representa uma contribuição importante para incrementar a organização da cinofilia não apenas no Distrito Federal mas em todo o país. A adoção deste sistema de análise genética poderá resultar em uma melhoria geral no plantel de animais, e potencialmente, em uma redução na casuística de doenças geneticamente transmissíveis.

EXCLUSÃO DE PATERNIDADE E MATERNIDADE NÃO EXCLUSÃO (incluindo) DE PATERNIDADE

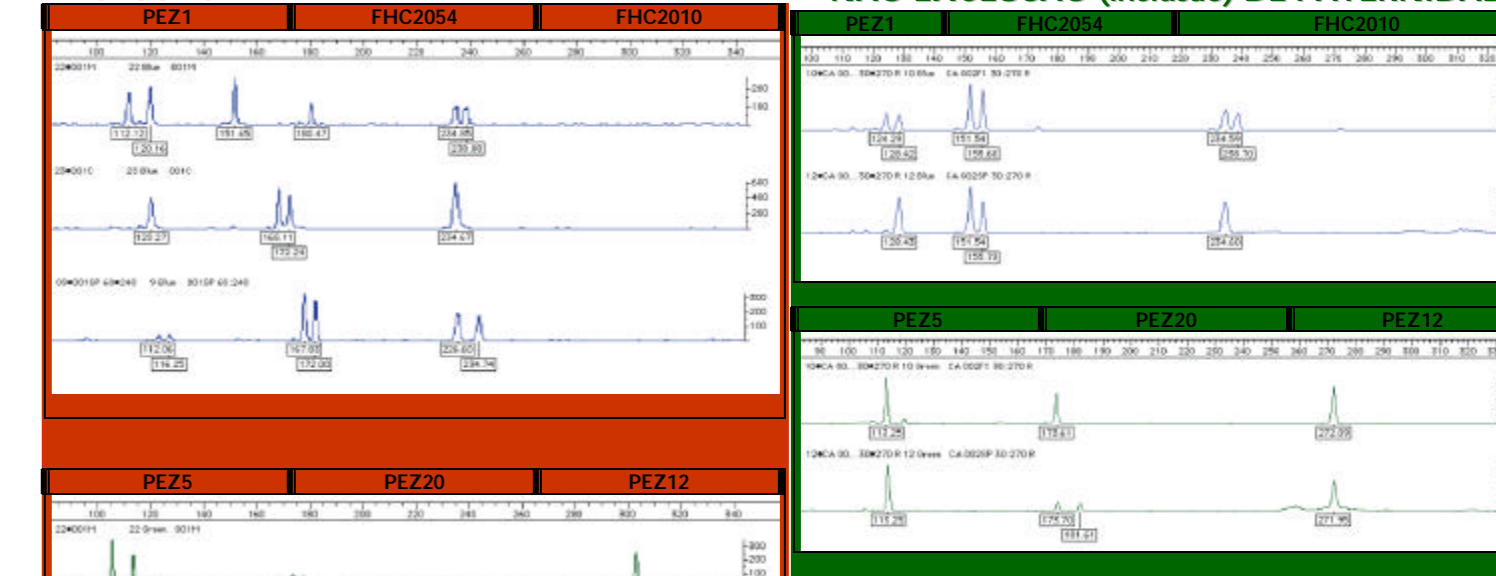


Figura 3. Resultados de exames de paternidade de um trio (pai(a) à esquerda) envolvendo um cão desaparecido, e um duo (pai(a) à direita) envolvendo um filhote e o suposto padreador. São apresentados os eletroferogramas nos quais podem ser identificadas as exclusões de paternidade e maternidade no caso do trio e os compartimentos alélicos entre filhote e padreador no caso do duo. No caso do duo são apresentados somente 6 dos 10 locos analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altet L