RAÇA EQUINA GARRANA

Genotipagem para características de interesse/ indesejáveis

2023

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Raça equina Garrana

Genotipagem para características de interesse/ indesejáveis 2023

Inês Carolino e Nuno Carolino

Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
Polo de Investigação da Fonte Boa
Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém
PORTUGAL

Telm:(+351) 964112424
E- mail: ines.carolino@iniav.pt

Sofia Ferreira

Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
Laboratório de Genética Molecular de Alter
Coudelaria de Alter 7440-152 Alter do Chão - PORTUGAL
Tel: (+351) 245610070/2 - Fax: (+351) 245610071

Débora Seixas

Instituto Superior de Agronomia
Tapada da Ajuda
1349-017 Lisboa, Portugal

Carolino I., Seixas D., Ferreira S. e Carolino N. (2023). Raça equina Garrana - Genotipagem para características de interesse/indesejáveis 2023. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Estação Zootécnica Nacional - Fonte Boa, Portugal.

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Introdução

A gestão da diversidade genética de raças locais, particularmente as de populações muito reduzidas ou em risco de erosão genética, é de extrema importante para a preservação das mesmas, pelo que os programas de conservação e de melhoramento genético destas raças devem focar-se nesta função (FAO, 2015).

Durante muitos anos, os objetivos de melhoramento dos animais de produção foram direcionados, principalmente, para as caraterísticas produtivas de importância económica na Produção Animal. Esta seleção teve um impacto negativo na aptidão genética dos animais para outras caraterísticas, nomeadamente em caraterísticas funcionais como a longevidade, a saúde e a reprodução dos animais (FAO, 2015).

Ao selecionar uma caraterística, pode-se desencadear uma resposta benéfica na outra caraterística com esta correlacionada, se a correlação genética entre duas caraterísticas for positiva ou desejável. Contudo, em caraterísticas em que se verifique uma correlação genética negativa, ao selecionar-se para uma caraterística verifica-se, consequentemente, uma resposta indesejável na outra caraterística correlacionada. A diminuição da variabilidade genética e o aumento da consanguinidade, normalmente mais frequente em raças com efetivos reduzidos, provoca a redução da capacidade de resposta das populações às alterações do meio e, consequentemente, a população corre um maior risco de extinção.

Ao longo dos anos, a utilização de marcadores moleculares tem sido cada vez mais recorrente nos estudos de caraterização da variabilidade genética de populações, tornando-se também uma ferramenta promissora em estudos de associação com caraterísticas de interesse (desejáveis ou indesejáveis), contribuindo para a definição de prioridades em programas de conservação e melhoramento genético das raças. No entanto, ainda são desconhecidos muitos dos genes que conferem, por exemplo, resistência a doenças, a endo e ectoparasitas, ao calor, a uma melhor conversão alimentar e maior eficiência reprodutiva, apesar de se conhecer a sequência completa do genoma de algumas espécies de animais de produção (Rocha *et al.*, 2017).

A raça equina Garrana foi classificada como em risco de extinção/Grau A nas Portarias 55/2015 e 268/2015 que regulamentam, respetivamente, a aplicação dos apoios 7.8.1 «Manutenção de raças autóctones em risco» e 7.8.3, «Conservação e melhoramento de recursos genéticos animais» do Programa de Desenvolvimento Rural do Continente (PDR2020) e, em 2022, no âmbito do Plano Estratégico da Politica Agrícola Comum em Portugal (PEPAC Portugal), no Eixo C -

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Desenvolvimento Rural apoio C.1.1.4 - Manutenção de Raças Autóctones como “Rara”. Ou seja, a raça Garrana tem sido sucessivamente classificada como em risco elevado de extinção (Carolino *et al.*, 2022).

Os equinos da raça Garrana são considerados animais rústicos e bastante resistentes. No entanto por diversos fatores, apresentam uma taxa de mortalidade elevada, nomeadamente de animais mais debilitados, associada à proliferação de ectoparasitas, devido ao aumento da temperatura ambiental, a invernos rigorosos e a secas prolongadas (Marta-Costa *et al.*, 2021).

As técnicas moleculares podem permitir identificar o genótipo dos animais em idades muito jovens e contribuir para o aumento da precisão de seleção, pelo que constituem um auxiliar cada vez mais promissor nos programas de melhoramento genético, nomeadamente no caso da raça Garrana.

Neste sentido, o Laboratório de Genética Molecular do INIAV - Polo de Investigação da Fonte Boa, com o objetivo de associar diferentes regiões do ADN dos equinos com algumas características de interesse (desejáveis/indesejáveis) em cavalos, efetuou análises de 5 SNP’s (*single nucleotide polymorphism*) em 5 genes, conforme apresentados na Tabela 1. Assim, foram genotipados os ADN’s de 113 equinos (identificação em anexo) da raça Garrana para os referidos SNP’s.

Tabela 1 – Identificação dos SNP’s analisados

Gene	Public Reference	Cromossoma	Alelo Referência	Alelo Alternativo
B3GALNT2	P519HYDROCEPHALUS	1	C	T
CA / MUTYH	P802CA	2	G	A
PRKDC	P704SCID	9	TCTCAAAT	-
SLC5A3	P839FIS	26	C	T
SERPINB11	P899HWSD	8	-	C

Os 5 genes apresentados na Tabela 1, foram associados, por diversos autores, a patologias a nível cerebral (B3GALNT2 e CA / MUTYH), a imunodeficiências (PRKDC e SLC5A3) e a patologias que afetam a constituição do casco (SERPINB11) dos cavalos.

No âmbito das patologias a nível cerebral, foram estudados 2 SNP: P519HYDROCEPHALUS e P802CA. O SNP P519HYDROCEPHALUS está presente no exão 12 do gene B3GALNT2 (beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2), no cromossoma 1 e distingue-se pela substituição de um nucleótido C por um T, tendo como consequência a doença Hidrocefalia Congénita (Hydrocephalus) (Ducro *et al.*, 2015; Kolb *et al.*, 2019). Esta alteração de nucleótido no gene provoca a acumulação

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

de líquido cefalorraquidiano do cérebro, seguindo-se de um aumento acentuado do volume da cavidade craniana (Kolb *et al.*, 2019). Os animais da raça Garrana presente neste estudo, apresentaram todos o genótipo C/C, não existindo equinos portadores do alelo alternativo (T), pelo que não existe o risco de perdas de animais causadas por Hidrocefalia associadas à mutação descrita.

O SNP P802CA é caraterizado pela substituição do nucleótido G por A, no exão 4 do gene MUTYH (MutY Homolog) no cromossoma 2, associada à Abiotrofia Cerebelar Equina (Cerebellar abiotrophy (CA)) (Scott *et al.*, 2017), uma doença neurodegenerativa hereditária caraterizada pela morte de neurónios de Purkinje no cerebelo de poldros, provocando defeitos neurológicos como tremores da cabeça, falta de equilíbrio (ataxia) e incapacidade de se erguer de uma posição reclinada. Nenhum dos equinos da raça Garrana estudados é portador do alelo associado à doença, visto que são todos homozigóticos G/G.

Para a associação a imunodeficiências foram analisados 2 SNP: P704SCID e P839FIS.

O SNP P704SCID carateriza-se pela deleção de 5 pb (TCTCA) no gene PRKDC (Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptidequinase), com associação à carência de linfócitos B e T funcionais, com consequente diminuição da resposta imunitária dos equinos, aumentando a suscetibilidade a agentes infeciosos (Tarr *et al.*, 2014), associada à doença de Imunodeficiência Combinada Grave (Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID)).

A maior percentagem da mortalidade associada a esta doença, ocorre aos 5 meses de idade dos poldros, mesmo com cuidados veterinários intensivos (Ela *et al.*, 2018). A população Garrana analisada neste estudo não é portadora do genótipo associado à referida doença.

O SNP P839FIS está associado ao Foal immunodeficiency syndrome (FIS), que se carateriza pelos poldros portadores desta doença terem níveis reduzidos de anticorpos, o que incapacita o desenvolvimento de uma resposta imunitária. Os poldros com FIS apresentam sinais clínicos normais no nascimento, e após 4 a 6 semanas de vida, aparecem sinais de infeção (diarreia, pneumonia) e de anemia progressiva severa, levando à morte do poldro (Fox-Clipsham *et al.*, 2011). Este marcador genético corresponde à alteração do nucleótido C por T, situado no gene SLC5A3 (Solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3), que atua como resposta ao stress osmótico e na prevenção da desidratação, causada pelo aumento da pressão osmótica no ambiente extracelular (Fox-Clipsham *et al.*, 2011). Nenhum dos equinos da população Garrana

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

estudada revelou ser portador do alelo mutante T, pelo que ao apresentarem o genótipo C/C, não têm predisposição genética para manifestarem o FIS.

Associado à Doença da Separação da Parede do Casco (Hoof Wall Separation Disease (HWSD)), caraterizada pela separação e quebra da parede dorsal do casco, foi analisado o SNP P899HWSD, localizado no exão 5, do gene SERPINB11 (Serpin Family B Member 11), no cromossoma 8. Este marcador genético é definido pela inserção de um nucleótido C, causando a formação de um codão STOP prematuro (Finno *et al.*, 2015).
Os poldros portadores do genótipo suscetível não têm capacidade de suportarem o seu peso, apresentando estados de inflamação crónica do casco, nomeadamente laminite. Os equinos da raça Garrana analisados neste trabalho possuem todos o genótipo sem inserção do nucleótido C neste SNP, pelo que não têm predisposição genética para manifestarem a HWSD.

Conclusão

Todos os animais da raça Garrana analisados são homozigotos para o genótipo dito selvagem ou de referência nos 5 SNP's estudados. O facto de todos os animais serem homozigoticos é uma vantagem, tendo em consideração que, não são portadores de alelos mutantes associados a certas patologias a nível cerebral, a imunodeficiências e a patologias que afetam a constituição do casco dos cavalos. Desta forma, para além dos animais genotipados não poderem vir a manifestar qualquer destas doenças, também não as poderão transmitir à descendência.
Os estudos de genética molecular podem fornecem medidas objetivas da diversidade entre e intra raças, independentemente do grau de organização dos Livros Genealógicos e do nível de conhecimento das genealogias, permitindo avaliar a população numa perspetiva de conservação, valorização e melhoramento genético. Adicionalmente, estes estudos são particularmente úteis em populações com efetivos mais reduzidos, ao permitirem identificar precocemente indivíduos portadores ou afetados por mutações genéticas indesejáveis, evitando gastos desnecessários na recria de futuros reprodutores ou, mais tarde, impedindo que determinados reprodutores possam vir a transmitir características indesejáveis à descendência.
A preservação da variabilidade genética das raças autóctones é um desafio da sociedade atual (DGAV & INIAV, 2013) e está enquadrada na Iniciativas "Territórios sustentáveis" da Terra Futura. A gestão eficiente e sustentável dos recursos naturais, designadamente da biodiversidade e dos ecossistemas é uma prioridade Nacional.

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Bibliografia

Ducro, B. J., Schurink, A., Bastiaansen, J. W., Boegheim, I. J., van Steenbeek, F. G., Vos-Loohuis, M., Nijman, I. J., Monroe, G. R., Hellinga, I., Dibbits, B. W., Back, W., & Leegwater, P. A. (2015). A nonsense mutation in B3GALNT2 is concordant with hydrocephalus in Friesian horses. *BMC genomics*, 16(1), 1-9.

Ela, N. A. A., Khalid, A., Ahmed, H. A., & Brooks, S. A. (2018). Molecular detection of severe combined immunodeficiency disorder in Arabian horses in Egypt. *Journal of equine veterinary science*, 68, 55-58.

FAO (2015). The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B.D. Scherf & D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. Food and Agriculture Organization.

Finno, C. J., Stevens, C., Young, A., Affolter, V., Joshi, N. A., Ramsay, S., & Bannasch, D. L. (2015). SERPINB11 frameshift variant associated with novel hoof specific phenotype in Connemara ponies. *PLoS genetics*, 11(4), e1005122.

Fox-Clipsham, L. Y., Carter, S. D., Goodhead, I., Hall, N., Knottenbelt, D. C., May, P. D. F., Ollier, W. E., & Swinburne, J. E. (2011). Identification of a mutation associated with fatal Foal Immunodeficiency Syndrome in the Fell and Dales pony. *PLoS genetics*, 7(7), e1002133.

Kolb, D. S., & Klein, C. (2019). Congenital hydrocephalus in a Belgian draft horse associated with a nonsense mutation in B3GALNT2. *The Canadian Veterinary Journal*, 60(2), 197.

Marta-Costa, A. A., Pinto, R. & Torres-Manso, F. (2021). O Garrano como fator de sustentabilidade de territórios de rede natura 2000. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 59(1), e238887.

Rocha, C. H. R, da Silveira Neto, O. J., Taveira, R. Z., Pires, L. C., da Silva, W. E. S., Kassia, A., & de Mesquita, R. C. (2017). Seleção Genómica Aplicada no Melhoramento Genético. XI SEZUS Semana Académica do Curso de Zootécnica. Universidade Estadual de Goiás.

Scott, E. Y., Penedo, M. C. T., Murray, J. D., & Finno, C. J. (2017). Defining trends in global gene expression in Arabian horses with cerebellar abiotrophy. *The Cerebellum*, 16(2), 462-472.

Tarr, C. J., Thompson, P. N., Guthrie, A. J., & Harper, C. K. (2014). The carrier prevalence of severe combined immunodeficiency, lavender foal syndrome and cerebellar abiotrophy in A rabian horses in S outh A frica. *Equine veterinary journal*, 46(4), 512-514.

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Laboratório de Genética Molecular

Identificação dos animais genotipados

Amostra	NIN	NOME	SEXO	DATA_NASC
74653	257479	ISA	F	15/07/2013
74654	257472	IDALIA	F	30/05/2013
74655	260616	ILIANA	F	01/06/2013
74656	260750	IRINA	F	22/05/2013
74657	256067	IVANA	F	30/05/2013
74658	257280	IBA	F	21/07/2013
74659	258288	IGUANA	F	20/05/2013
74661	255374	IPICA	F	20/05/2013
74662	255370	IMPERIAL	F	30/05/2013
74663	256402	IPICA	F	11/06/2013
74664	256328	IZAURA	F	01/08/2013
74665	255358	IMARA	F	04/06/2013
74667	255344	ISOLDA	F	27/05/2013
74668	271096	IRINA	F	01/09/2013
74669	270405	IMAIA	F	01/06/2013
74670	255357	IERIA	F	02/06/2013
74671	255373	ISBELTA	F	31/05/2013
74672	256334	IARIS	F	31/05/2013
74673	259326	IDALIA	F	01/07/2013
74674	259261	IDALIA	F	14/08/2013
74675	259260	IDILIA	F	20/12/2013
74676	264705	I-HICAS	F	16/05/2013
74677	264595	I-HACATA	F	17/05/2013
74678	250822	HAXOS	M	30/05/2012
74679	250857	HAMIN	M	26/05/2012
74680	255977	HSILO	M	01/05/2012
74681	255123	HEPICO	M	15/04/2012
74682	248137	HOMERO	M	15/03/2012
74683	253064	HAJIO VICENTE	M	26/08/2012
74685	259841	HUGO	M	01/04/2012
74686	256474	HITLER	M	29/04/2012
74687	269929	HAQUO	M	01/04/2012
74688	251344	HILTO	M	30/04/2012
74689	250564	HIPO	M	10/03/2012
74690	250576	HALDO	M	01/06/2012
74691	253200	HILO SANCHO	M	01/03/2012
74692	250828	HÉLIO MEÃES	M	17/04/2012
74693	252163	HENO	M	17/03/2012
74694	296839	HORACIO	M	01/11/2012
74695	281256	HERCULES	M	05/05/2012

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

74696	251157	GAROTO	M	08/06/2011
74697	251066	GALA	M	01/06/2011
74698	244950	GAVE	M	22/04/2011
74699	244952	GANT	M	20/04/2011
74700	245520	GULIVER MEÃES	M	15/05/2011
74701	244446	GONÇALO MEÃES	M	30/05/2011
74702	261910	GAROTO	M	05/05/2011
75482	270410	JAZO	M	01/05/2014
75484	258641	ISOCO	M	01/08/2013
75485	255958	ICOS	M	06/05/2013
75486	270407	IZO	M	31/07/2013
75487	255997	IQIU	M	25/04/2013
75488	259258	IQUOLO	M	03/04/2013
75489	255377	IBIDO	M	23/05/2013
75491	240346	FADO	M	12/05/2010
75492	240350	FULO	M	15/04/2010
75493	249358	FOGUETE	M	01/03/2010
75494	258281	FERRADURA	M	16/05/2010
75495	241957	FELIZARDO	M	15/05/2010
75496	241971	FIDALGO	M	22/05/2010
75497	240163	FAUSTINO	M	07/05/2010
75498	244352	FIGO	M	20/05/2010
75499	239465	FAROL	M	15/05/2010
75500	242391	FUZETA	M	25/04/2010
75501	239046	FASCO	M	07/05/2010
75502	239641	FALCÃO	M	07/08/2010
75503	243685	FIGO SANCHO	M	26/04/2010
75504	239139	FORTUNA	M	20/05/2010
75505	240806	FALCAO	M	12/05/2010
75506	241963	FIGARRO	M	17/04/2010
75507	262263	JACIARA	F	20/05/2014
75508	261997	JACARTA	F	22/04/2014
75509	261998	JACA	F	22/04/2014
75510	269933	JURIMA	F	02/04/2014
75511	260788	JOANA	F	07/04/2014
75513	260792	JULIETA PENTIEIROS	F	03/04/2014
75514	261550	JAMARA	F	10/04/2014
75515	269601	JESSICA	F	04/04/2014
75516	269602	JAB	F	30/05/2014
75517	269604	JESSA	F	31/05/2014
75518	263969	JADE	F	01/07/2014
75520	264785	JABARDA	F	01/07/2014

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt

Laboratório de Genética Molecular

75521	274686	JULIETA	F	10/08/2014
75522	261913	JIPA	F	03/05/2014
75524	262358	JC	F	28/02/2014
75525	262357	JAZA	F	31/03/2014
75526	262673	JEITOSA	F	15/05/2014
75527	291666	JINA	F	02/08/2014
75528	275887	JUIZA	F	28/08/2014
75529	293225	JOAQUINA	F	01/06/2014
75530	259577	JANDIRA	F	02/04/2014
75531	270408	JAZA	F	10/04/2014
108798	291351	MAÇA	F	2016-04-14
108799	291352	MAFARRICA	F	2016-04-22
108800	295960	MIMOSA	F	2016-03-28
108802	306625	MIA	F	2016-04-21
108803	306300	MALAGUETA	F	2016-03-10
108812	290867	MARAVILHA	F	2016-03-02
108813	299790	MIMI	F	2016-05-18
108814	290865	MICOLADA	F	2016-02-28
108832	295400	MACDONALDS	M	2016-04-22
108833	297666	MOURO	M	2016-04-26
108834	290855	MUPO	M	2016-05-01
108835	301684	MILU	M	2016-07-01
108836	306299	MANTAS	M	2016-03-01
108837	297664	MARQUÊS DAS SEBES	M	2016-06-09
108838	289536	MÁRIO MEÃES	M	2016-05-10
108839	294287	MAJOR	M	2016-07-20
131562	215838	ZOR	M	20/04/2004
131563	219510	AMBAR	M	20/10/2005
131564	219709	ATICA	F	21/05/2005
131565	234155	DUNDA	F	12/05/2008
131566	237105	BIANCA	F	30/04/2006

Estação Zootécnica Nacional – INIAV Santarém
Quinta da Fonte Boa – 2005-424 Vale de Santarém – Portugal
Tel: (+ 351) 243 767 300
Website: www.iniav.pt