

RAÇA EQUINA GARRANA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA por MARCADORES MOLECULARES

2020

Realizado por:

M^a Inês Carolino, Sofia Ferreira e Nuno Carolino

Relatório Técnico

Introdução

A diversidade genética dos animais domésticos é uma componente importante da biodiversidade e uma área de grande interesse da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). O padrão atual de diversidade dos Recursos Genéticos Animais (RGA), é o resultado de uma longa história de processos de domesticação, migrações e trocas comerciais entre continentes, seleção artificial, mutações e deriva genética, e sobretudo para as raças autóctones, o resultado da adaptação local.

Portugal tem atualmente 50 raças autóctones oficialmente reconhecidas nas espécies pecuárias, maioritariamente em risco de extinção, que fazem parte integrante do património histórico e cultural do País, onde desempenham um papel importante na fixação das populações e no equilíbrio ecológico, com diferentes manifestações de carácter gastronómico, social, cultural. Este património genético acarreta responsabilidades na implementação de programas de conservação e utilização sustentável dos RGA, visando a sua salvaguarda e uma necessária atenção à gestão da diversidade intra-racial.

A raça equina Garrana é uma das quatro raças equinas autóctones, com solar na região Noroeste de Portugal, principalmente nos distritos de Viana do Castelo e de Braga, embora existam alguns animais dispersos por todo o País. A Associação de Criadores de Equinos de Raça Garrana (ACERG) foi constituída em 1995, com sede em Vieira do Minho e é a entidade gestora do Livro Genealógico da raça.

O Garrano é um equídeo de pequena estatura (altura máxima ao garrote de 1.35 metros), de cor exclusivamente castanha e perfil reto ou côncavo, com a particularidade de ainda existir nos dias de hoje em estado semi-selvagem nas Serras do Gerês e da Cabreira. São muito apreciados pela sua resistência, perfeitamente adaptado ao meio natural onde é criado, chegando a constituir grandes manadas em baldios, onde se mantêm em liberdade, sendo normalmente, conduzidos e capturados, com recurso a cercos, através dos quais se separam as crias das mães e procede-se à identificação dos mesmos (Carolino *et al.*, 2016).

Em 2014, a raça Garrana foi considerada como em risco de extinção - Grau B - risco intermédio, no âmbito do Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 e das Portarias n.º 55/2015 e nº 268/2015 que estabelecem, respetivamente, os regimes de aplicação dos Apoio 7.8.1 «Manutenção de raças autóctones em risco» e do Apoio 7.8.3, «Conservação e melhoramento de recursos genéticos animais».

Em 2016, o efetivo reprodutor era constituído por cerca de 2200 fêmeas adultas e 210 machos, distribuídos por cerca de 534 criadores mantendo a classificação quanto ao risco de extinção Grau B.

Os estudos de genética molecular 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 importância de uma população, numa perspetiva de conservação, podendo identificar atributos genéticos únicos ou a evidência de isolamento genético atual ou no passado e a sua importância cultural ou histórica.

Para a caracterização genética através de marcadores moleculares, a FAO (2011) recomenda a utilização de marcadores genéticos neutros, nomeadamente microssatélites. Os microssatélites, são pequenas sequências repetidas (1 a 6 nucleótidos) no ADN, que existem em abundância e distribuídas de forma aleatória por todo o genoma. Podem

apresentar grande polimorfismo e são de fácil identificação, permitindo diferenciar os indivíduos de determinada população, e as variações intra e entre grupos de animais.

Metodologia

A caracterização genética por marcadores moleculares da raça Garrana foi realizada na Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos - Polo de Investigação da Fonte Boa, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., a partir da informação do perfil genético em 17 microssatélites de 50 animais, machos e fêmeas, da raça Garrana, com números de identificação do laboratório de 108790 a 108839, pertencentes à guia 4953 (anexo 2)

A ISAG (*International Society for Animal Genetics*) recomenda que para a análise de caracterização genética se utilize a informação de animais de acordo com os seguintes critérios:

- O mesmo número de machos e fêmeas de vários criadores, o mais representativo da raça possível.
- Um número de amostras representativo, mas no mínimo 30
- Não devem ser amostrados mais de 10% de animais de um mesmo criador.
- Tanto quanto possível, não utilizar animais com avós comuns.
- De preferência, utilizar dados de animais das diferentes regiões onde a raça é utilizada.

A extração de ADN de cada amostra foi realizada de acordo com o tipo de tecido (sangue ou pêlo), normalmente através de dois métodos. O método de extração salina ("High Salt Method" – Montgomery & Sise, 1990) ou através de um Kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit), de acordo com o método recomendado pelo fabricante, no Laboratório de Genética Molecular de Alter (INIAV).

Para a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram utilizados marcadores genéticos que permitem a amplificação de 17 microssatélites (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425) em multiplex (anexo 1), que incluem o painel recomendado pela ISAG para testes de paternidade em equinos. Em todas as reações são utilizados controlos positivo e negativo, para garantir a correta interpretação dos resultados.

A análise dos fragmentos amplificados de cada amostra foi realizada por electroforese capilar, em sequenciador automático *ABI-3130*, e os resultados interpretados pelo *software GeneMapper®* associado ao respetivo equipamento.

O perfil genético de cada animal, para o painel dos 17 microssatélites considerado, é apresentado sob a forma numérica, com um par de valores para cada microssatélite que reflete os alelos herdados, já que cada indivíduo recebe um alelo da mãe e outro do pai.

Os resultados foram exportados para uma base de dados (Excel), e preparados para a análise estatística posterior, com o *software* adequado para o efeito.

Foram utilizados os *software* ML_RELATE (2006) e GenePop (versão 4.2.), e calculados diversos parâmetros da variabilidade intrapopulacional, de forma a caracterizar a população considerada, avaliar a diversidade genética e avaliar a utilidade dos microssatélites usados para estudos posteriores.

Foram calculados os seguintes indicadores: número médio de alelos por locus (NA), frequências alélicas, heterozigotia média esperada (He) e observada (Ho), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Probabilidade de Exclusão de cada locus (PEL) e a Probabilidade de Exclusão Combinada (PEC), desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), estatísticas F de Wright (Weir e Cockerham (1984) e coeficiente de parentesco (r) entre pares de indivíduos.

Do painel de loci analisados, o locus LEX 3 foi excluído para a maioria dos cálculos dos indicadores, uma vez que este marcador está ligado ao cromossoma-X, o que significa que está em homozigotia nos machos, causando desvios significativos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e elevadas diferenças entre os valores da heterozigotia esperada e observada.

Resultados

Os resultados dos 17 microssatélites analisados mostraram que todos os marcadores são polimórficos para os animais amostrados. O quadro 1 apresenta os valores encontrados para o número de alelos por *locus* (NA), heterozigotia média esperada (He) e observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), e a estatísticas de F de Wright (F_{IS}) (Weir e Cockerham, 1984).

Quadro 1 - Número de alelos (Na), heterozigotia média esperada (He) e observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de desvios ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) e *F* de *Wright* (F_{IS}) (Weir e Cockerham, 1984) por *locus*.

Locus	Na	Ho	He	PIC	EHW	F_{IS}
HMS3	8	0,53	0,70	0,652	***	0,239
HMS7	7	0,78	0,80	0,766	NS	0,034
HTG4	6	0,53	0,55	0,522	NS	0,038
HTG10	9	0,82	0,80	0,842	NS	-0,024
VHL20	11	0,80	0,86	0,837	NS	0,078
ASB2	8	0,71	0,82	0,786	NS	0,131
AHT4	9	0,76	0,78	0,740	NS	0,031
AHT5	8	0,74	0,77	0,728	NS	0,038
HMS6	6	0,71	0,69	0,654	NS	-0,023
HTG6	8	0,78	0,80	0,770	NS	0,036
HTG7	5	0,43	0,41	0,383	NS	-0,040
HMS2	8	0,92	0,81	0,773	NS	-0,136
ASB17	14	0,96	0,86	0,857	NS	-0,118
LEX3	9	0,33	0,86	0,854	***	0,623
HMS1	6	0,69	0,72	0,684	NS	0,037
CA425	8	0,78	0,73	0,673	NS	-0,067
ASB23	10	0,82	0,86	0,834	NS	0,052

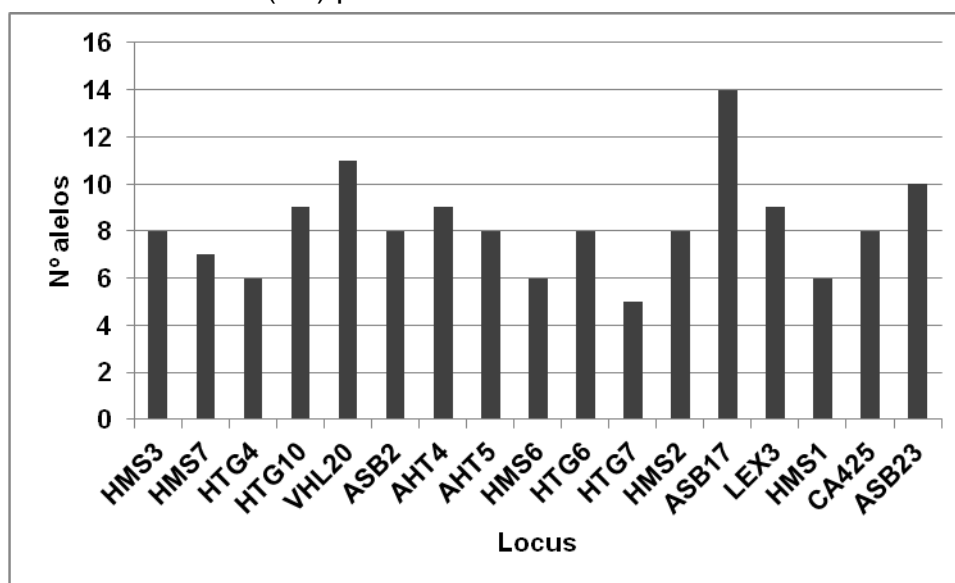
Nota: Desvios ao equilíbrio *Hardy-Weinberg* (NS: desvio não significativo; **: desvio significativo ($P < 0,05$); F_{IS} : Calculado segundo Weir & Cockerham (1984)

A diversidade genética também pode ser definida como a variedade de alelos e genótipos presentes numa população e isso poderá refletir as diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre os indivíduos e a população (Frankham *et al.*, 2008).

A diversidade alélica é também importante numa perspetiva de longo prazo, e pode ser relevante em programas de conservação, uma vez que a resposta à seleção é influenciada pela variabilidade genética que pode ser determinada pelo número inicial de alelos (Hill & Rabash, 1986). Um grande número de alelos constitui uma fonte de variação e a possibilidade de uma seleção mais eficaz.

O locus mais polimórfico foi o microsatélite ASB17 (14 alelos) e o menos polimórfico o HTG7 (5 alelos) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Número de alelos (Na) por locus

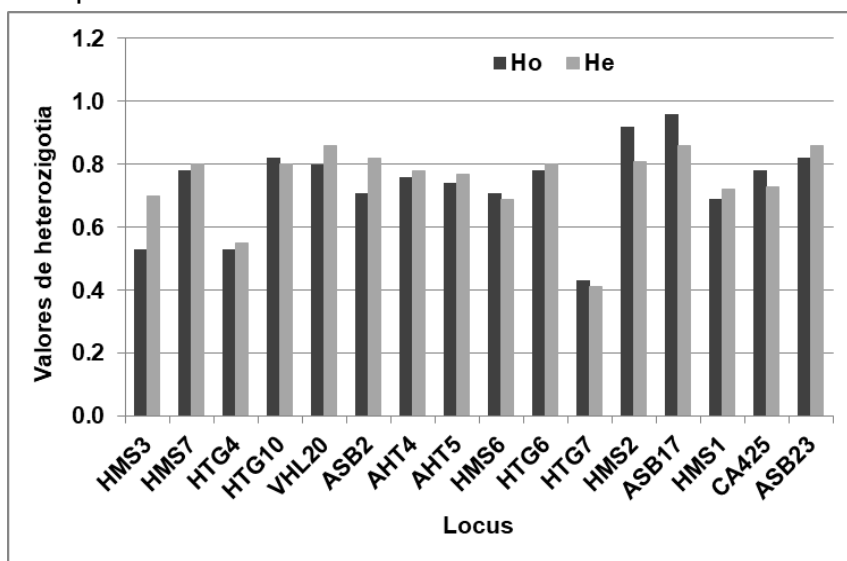


Um indivíduo que tem 2 alelos diferentes num dado locus diz-se que é heterozigoto nesse locus. Se a população tem 2 ou mais alelos nesse locus, e a frequência do alelo mais comum não é maior que 95%, a população diz-se polimórfica nesse locus. A Heterozigotia observada (H_o) reflete a proporção de indivíduos heterozigóticos observados nesse locus. A Heterozigotia esperada (H_e) representa a probabilidade de dois alelos serem diferentes, tirados ao acaso numa população, se esta estivesse em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo calculada a partir das frequências alélicas num dado locus (Nei, 1975). Um marcador é considerado altamente polimórfico quando apresenta heterozigotia maior que 70% (Caballero *et al.*, 2010).

Em análise global, os valores de H_o por locus revelaram elevado grau de heterozigotia, com valores superiores a 0,70 em quase todos os marcadores analisados, com exceção dos microsatélites HTG7, HTG4 e HMS3 com valores mais baixos, respetivamente de 0,43, 0,53 e 0,53.

A H_o variou entre 0,43 e 0,96, com valores em alguns marcadores acima do valor da H_e . Em todos os locus, a H_e apresentou valores superiores a 50%, indicando elevada variabilidade genética dos marcadores analisados.

Gráfico 2 – Ho e He por locus



Os microssatélites com valores de Ho mais baixos do que os valores de He, indicam desvios de acasalamento aleatório, que pode ter diversas causas, tais como, o isolamento de alguns núcleos de reprodutores ou a utilização preferencial de alguns reprodutores face a outros.

Os resultados do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Quadro 1), mostram que dos 17 marcadores testados, apenas 1 (HMS3) não se encontra em equilíbrio nesta população, para $p < 0,05$.

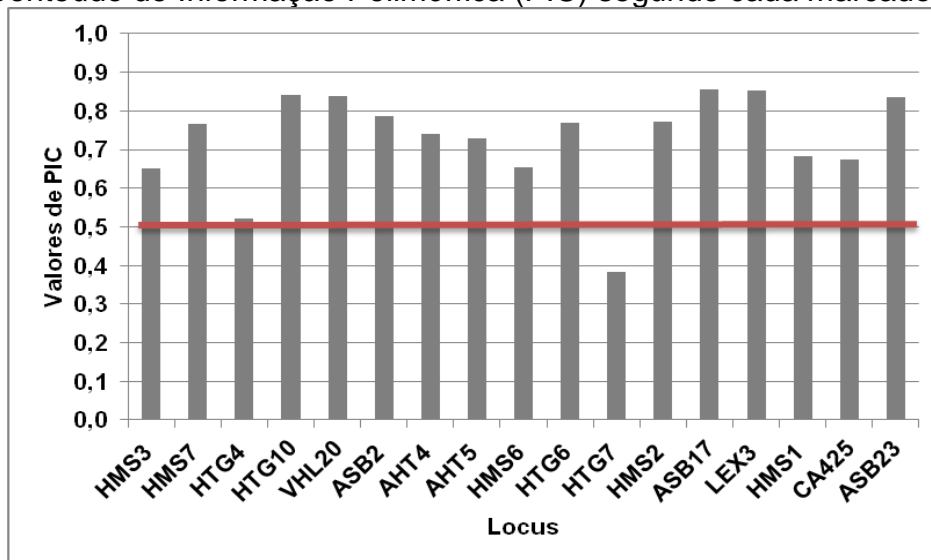
A qualidade dos marcadores pode ser avaliada pelo respetivo Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). O PIC determina o grau de polimorfismo de cada locus e é calculado com base nas frequências alélicas, de acordo com a equação de Botstein *et al.*, (1980)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

em que n corresponde ao número de alelos diferentes para cada locus e p_i e p_j são as frequências alélicas para os alelos i e j , respetivamente.

Valores de PIC superiores a 0,50 indicam que o microssatélite é muito informativo, entre 0,25 e 0,50 são considerados medianamente informativos e inferiores a 0,25 pouco informativos Botstein *et al.*, (1980).

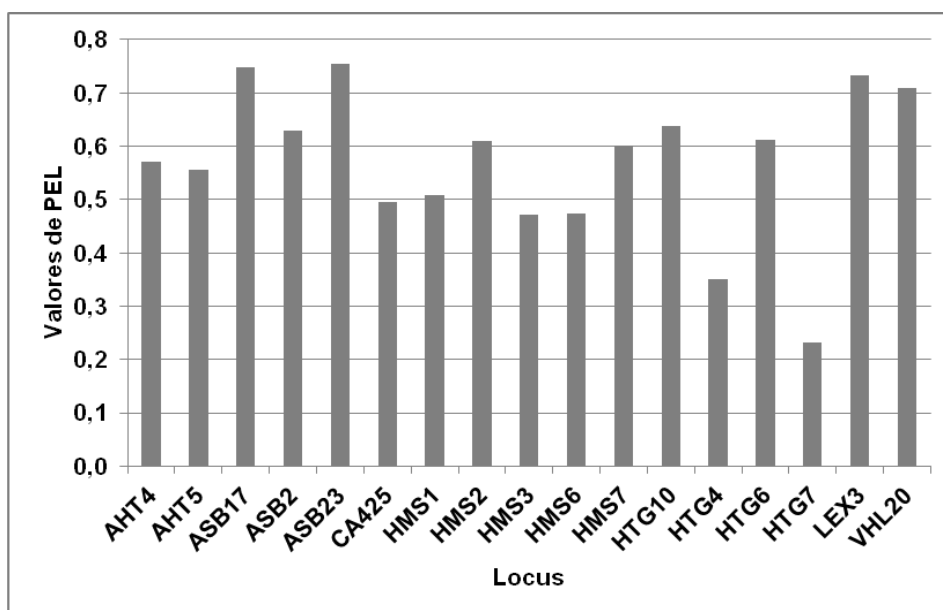
Gráfico 3 - Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) segundo cada marcador



Na escala de Botstein *et al.*, (1980), os 17 microssatélites (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425) são todos considerados muito informativos.

O painel de microssatélites utilizado neste trabalho também é o recomendado pela ISAG para o uso nos testes de paternidade em equinos. Através dos valores de PIC é possível determinar o valor da Probabilidade de Exclusão de cada locus (PEL) (Gráfico 4) e a Probabilidade de Exclusão Combinada (PEC) do conjunto dos 17 microssatélites, para efeitos de exclusão de paternidade, quando os dois progenitores são conhecidos.

Gráfico 4 - Probabilidade de Exclusão de cada Locus (PEL)



Dos 17 microssatélites considerados apenas os marcadores HTG4, HMS3, HMS6 e HTG7 apresentaram valores de PEL abaixo dos 0.5.

Os testes de paternidade são de natureza probabilística, baseando-se no princípio da exclusão genética, possibilitando demonstrar que um determinado animal não pode ser progenitor do filho em questão. É causa de exclusão de paternidade, quando os alelos correspondentes a um determinado marcador molecular não são compartilhados entre descendente-progenitor, e neste caso o painel dos 17 microssatélites exclui com uma precisão de 99,99% (PEC).

Para este relatório e tendo em conta que só estamos a avaliar a variação genética intra-raça apenas se calcula os valores de F_{IS} . O F_{IS} ou coeficiente de consanguinidade traduz a redução de heterozigotia de um indivíduo devido à inexistência de acasalamentos aleatórios na sua subpopulação, refletindo o desvio do EHW dentro da subpopulação.

O F_{IS} depende do tamanho efetivo da população, considerando que quanto menor for a população, em gerações anteriores, maior o número de ancestrais comuns e maior o F_{IS} (Weir e Cockerham, 1984). O parâmetro F_{IS} , apresenta valores entre -1 e 1. O valor 0 indica que a população se encontra em EHW, valores negativos indicam excesso de heterozigóticos e positivos deficiência de heterozigóticos (consanguinidade ou sub estrutura da população) em relação ao esperado EHW.

Valores de F_{IS} elevados e positivos indicam excesso de homozigotos e pelo contrário valores mais pequenos indicam uma elevada heterozigotia em relação ao esperado EHW.

Os valores de F_{IS} variaram de -0.136 no locus HMS2 a 0,239 no locus HMS3. Os coeficientes F_{IS} com valores negativos, sugerem a ocorrência de acasalamento entre indivíduos não aparentados.

Seis marcadores (ASB17, HTG7, CA425, HMS2, HTG10, e HMS6) revelaram valores negativos e outros seis (HMS7, HTG4, AHT4, AHT5, AHT6 e HMS1) inferiores a 5%, indicativo de excesso de heterozigotos e de populações pouco consanguíneas. Contudo em dois marcadores (HMS3 e ASB2) observaram-se valores de F_{IS} superiores a 10%, o que pode indicar algum excesso de homozigotos dentro da população estudada, elevado nível de consanguinidade, amostragem deficiente ou marcadores inapropriados o que não parece ser o caso, dados os valores observados para os restantes indicadores determinados. De um modo geral, os valores obtidos indicam que não há um défice de heterozigóticos e que a população mantém níveis baixos de consanguinidade.

O valor médio do coeficiente de parentesco (r) entre pares de indivíduos permite determinar a relação genética de indivíduos com antepassados desconhecidos. As estimativas do coeficiente de parentesco são amplamente utilizadas para minimizar endogamia (acasalamento entre indivíduos aparentados) em programas destinados a manter diversidade genética em espécies ameaçadas de extinção. A relação genética entre indivíduos é matematicamente representada como a probabilidade de dois indivíduos compartilharem respetivamente, zero, um ou dois alelos de cada marcador testado por descendência, calculado através do programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006). O software ML-RELATE calcula as estimativas de parentesco através da estimativa de máxima verossimilhança. Os valores do coeficiente de parentesco entre indivíduos varia entre 0 e 1, sendo que os valores próximos de zero indicam que os indivíduos não se relacionam, 0.25 são consistentes com um nível de meio-irmão, e valores cerca de 0,5 a relação esperada será de irmãos completos ou de paternidade/filiação.

Neste trabalho, o valor médio do coeficiente de parentesco (r) entre pares de indivíduos foi de 0,087 indicando que em média os animais não são aparentados ao nível de meio-irmão, pelo que se conclui que a amostragem seguiu as recomendações da ISAG.

Conclusões

Gama e Carolino (2002) indicam que, numa perspetiva de manutenção da variabilidade genética de uma raça a longo prazo, numa determinada zona geográfica, a variabilidade intra-racial é muito mais importante que a variabilidade inter-racial. Pelo que, torna-se mais importante conhecer a variabilidade genética intra-racial, e evitar a erosão da variabilidade dentro de cada raça, assegurando a conservação de recursos genéticos únicos, que podem ser usados de uma forma sustentada e estar à disposição dos produtores (FAO, 2005).

Em função dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que os 17 microssatélites analisados são polimórficos e com capacidade para identificar a variabilidade e a diversidade genética em equinos da raça Garrana.

A população é geneticamente heterogénea, ou seja os indivíduos que a compõem apresentam entre si diferenças. Esta heterogeneidade pode indicar a existência de indivíduos de origens diferentes, havendo alguns que se mantêm isolados dos restantes sem fluxo de genes entre eles, muito provavelmente devido à particularidade de alguns animais se manterem em estado semi-selvagem nas Serras do Gerês e da Cabreira.

O elevado número de marcadores em equilíbrio de HW associado aos valores de F_{IS} indicam que não haverá níveis de consanguinidade preocupantes nesta população. No entanto, tal como sugerido por Carolino *et al.* (2016) deverá haver uma preocupação em promover estratégias de delineamento de acasalamentos com o objetivo de minimizar o parentesco entre reprodutores e, conseqüentemente, da consanguinidade dos animais a nascer, bem como evitar a sobre utilização de reprodutores, de forma a evitar uma desequilibrada contribuição genética. A diversidade genética é essencial para que os organismos se adaptem às mudanças das condições ambientais.

Bibliografia

- Botstein D, White RL, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genetics*. 1980; 32: 314-331.
- Caballero, A.; Rodríguez-Ramilo, S. T.; Ávila, V.; Fernández, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics*, Dordrecht, v. 11, p. 409 – 419, 2010.
- Carolino, N, I. Carolino, S. Lopes, J. Leite e M. Silveira. 2016. Raça equina Garrana - Caracterização genética por análise demográfica.
- David A. Tallmon, Ally Koyuk, Gordon Luikart and Mark A. Beaumont, 2008. COMPUTER PROGRAMS - ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Journal compilation* © 2007 Blackwell Publishing Ltd
- FAO (2005). Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of small populations at risk (Rome. Italy, FAO).
- FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. No. 9. Rome. <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>
- Frankham, R. (2008), Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17: 325–333. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03399.x
- Gama, L. e N. Carolino. 2002. Demographic analysis of the Alentejana breed of cattle. *Proc. of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 33:665-668, .
- Kalinowski ST, AP Wagner, ML Taper. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- Makvandi-Nejad S, Hoffman GE, Allen JJ, Chu E, Gu E, Chandler A. M., Loredó A.I., Bellone R.R., Mezey J.G., Brooks S.A. and Sutter N.B. 2012. Four Loci explain 83% of size variation in the horse. *PLoS One* 7: e39929. doi:10.1371/journal.pone.0039929
- Milligan BG. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163: 1153-1167.
- Montgomery, G.W. & Sise, J.A. 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33:437-441.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590. ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation
- Raymond M. & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J. Heredity*, 86:248-249.
- Robertson, A. & Hill, W. G., 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.
- Wagner AP, S Creel, ST Kalinowski. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*.1-10.
- Walsh, P.S., N. Fildes, A. Louie and R. Higuchi. 1991. Report of the blind trial of the Cetus AmpliType HLA DQ α DNA amplification and typing kit. *J. Forensic Sci*.
- Weir, B.S. e Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

ANEXO 1

Locus	Cromossoma	Acesso Genebank	Intervalo Alelos (bp)
HMS07	1	X74636	165-183
ASB17	2	X93531	91-109
ASB23	3	X93537	176-212
HMS06	4	X74635	153-169
HTG07	4	AF169291	120-130
AHT05	8	Y07732	130-146
HMS03	9	X74632	150-170
HTG04	9	AF169165	127-141
HMS02	10	X74631	218-238
ASB02	15	X93516	222-254
HMS01	15	X74630	170-186
HTG06	15	AF169167	84-106
HTG10	21	AF169294	93-113
AHT04	24	Y07733	148-164
CA425	28	U67406	237-247
VHL20	30	X75970	86-106
LEX3	X	AF075607	142-164

ANEXO 2

Identificação dos animais segundo o número de laboratório

Nº Lab	Nome	Nº LG	Sexo	Data de Nasc.
108790	MACACA	M13	F	2016-07-01
108791	MEDUSA	M15	F	2016-05-01
108792	MOBIDA	M17	F	2016-05-01
108793	MITINHA	M176	F	2016-03-20
108794	MIRANDA	M179	F	2016-04-21
108795	MINI	M18	F	2016-05-15
108796	MEDINA	M180	F	2016-04-17
108797	MANDALA	M20	F	2016-06-06
108798	MAÇA	M214	F	2016-04-14
108799	MAFARRICA	M215	F	2016-04-22
108800	MIMOSA	M232	F	2016-03-28
108801	MARIANA	M256	F	2016-08-21
108802	MIA	M269	F	2016-04-21
108803	MALAGUETA	M272	F	2016-03-10
108804	MICAS	M273	F	2016-07-01
108805	MOÇA	M348	F	2016-04-01
108806	MORENA	M312	F	2016-08-05
108807	MINHOTA	M323	F	2016-05-01
108808	MULATA	M331	F	2016-08-30
108809	MENINA	M332	F	2016-08-10
108810	MATRACA	M335	F	2016-07-06
108811	MACHADINHA	M337	F	2016-06-07
108812	MARAVILHA	M339	F	2016-03-02
108813	MIMI	M34	F	2016-05-18
108814	MICOLADA	M340	F	2016-02-28

Continuação

Nº Lab	Nome	Nº LG	Sexo	Data de Nasc.
108815	JOLY	J89	M	2014-04-07
108816	LAZARO	L2	M	2015-07-26
108817	LAIO	L207	M	2015-04-15
108818	LAMA	L318	M	2015-04-26
108819	LUCAS	L33	M	2015-05-10
108820	LACRAU	L377	M	2015-04-05
108821	LITTLE STORM	L436	M	2015-10-05
108822	LANFRAU	L463	M	2015-03-10
108823	LUAR	L5	M	2015-04-13
108824	LUDICO	L568	M	2015-04-27
108825	LICOR	L62	M	2015-07-15
108826	LAZORTA MEÃES	L667	M	2015-06-20
108827	L-CARRIÇO	L67	M	2015-04-01
108828	LIDIO	L690	M	2015-08-25
108829	LEAO	L694	M	2015-01-01
108830	LINCON	L98	M	2015-06-16
108831	MINHOTO	M1	M	2016-05-01
108832	MACDONALDS	M150	M	2016-04-22
108833	MOURO	M195	M	2016-04-26
108834	MUPO	M260	M	2016-05-01
108835	MILU	M268	M	2016-07-01
108836	MANTAS	M271	M	2016-03-01
108837	MARQUÊS DAS SEBES	M375	M	2016-06-09
108838	MÁRIO MEÃES	M7	M	2016-05-10
108839	MAJOR	M83	M	2016-07-20