



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SNP C.-22G>A NO GENE
DA MELANOFILINA RESPONSÁVEL PELA DILUIÇÃO
DE COR EM CÃES**

SILVANA MARQUES CARAMALAC

CAMPO GRANDE, MS
2019

SILVANA MARQUES CARAMALAC

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SNP C.-22G>A NO GENE
DA MELANOFILINA RESPONSÁVEL PELA DILUIÇÃO
DE COR EM CÃES**

*Frequency of mutation SNP c.22G>A in the gene of melanofiline responsible for
dilution of color in dogs*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de concentração: clínica médica, cirúrgica, anestesia e diagnóstico de doenças em animais de estimação e produção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Isa Poci Palumbo.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos.

CAMPO GRANDE, MS
2019

Banca Examinadora

**Profª. Drª. Mariana Isa Poci Palumbo
(Presidente)**

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Profª. Drª. Veronica Jorge Babo-Terra

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado presente todos os dias da minha vida e ter permitido a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Mariana Isa Poci Palumbo, pela oportunidade, apoio, incentivo, orientação e amizade, que foram fundamentais ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Alberto do Nascimento Ramos, pela paciência, ensinamentos e disponibilidade em todos os momentos de dificuldade.

Ao Prof. Valter Joost Van Onselen, por toda ajuda, incentivo e sugestões.

À minha família, por todo apoio e palavras de conforto, em especial a minha irmã Simone Marques Caramalac, que tornou esta caminhada muito mais prazerosa.

Às alunas de iniciação científica Ana Carolina Cavenagui e Maria Julia Hipolito, pela amizade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Gustavo Gomes de Oliveira, pelo companheirismo e amparo ao longo da minha vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório Juliane Francielle Tutija, Zelina dos Santos Freire, Herbert Cleveland e Rodrigo Leite Soares, pela ajuda, apoio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que, por meio da concessão da bolsa, permitiu que eu me dedicasse exclusivamente a realização do mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”
Roberto Shinyashiki*

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO 1.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivos gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2.....	20
Folha de título.....	21
Frequência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanofilina responsável pela diluição de cor em cães.....	22
Resumo.....	22
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e métodos.....	24
Resultados.....	25
Discussão.....	29
Conclusão.....	31
Referências bibliográficas	31
ANEXOS.....	35
Declaração de livre consentimento.....	35
Aprovação comitê de ética de uso de animais.....	36
Normas para publicação – Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	38

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Frequência genotípica dos animais homozigotos dominantes (DD), heterozigotos (Dd) e homozigotos recessivos (dd) e frequência gênica dos alelos “D” e “d” do gene da melanofilina nas três raças analisadas.....	28
Tabela 2. Frequência observada e esperada* em três raças caninas dos genótipos para a mutação SNP c.-22G>A do gene <i>MLPH</i>	29

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Representação gráfica da PCR-RFLP para identificação do SNP c.-22 G>A no gene <i>MLPH</i> . Na primeira coluna está representado marcador molecular (50-500 pb). Na segunda coluna observar a formação de bandas de 249 pb, 43 pb e 20 pb (homozigotos recessivos); na terceira coluna a formação de bandas de 237 pb, 43 pb, 20 pb e 12 pb (homozigotos dominantes); na quarta coluna a formação de bandas de 249 pb, 237 pb, 43 pb, 20 pb e 12 pb (heterozigotos).....	26
Figura 2. Genotipagem do PCR-RFLP para mutação SNP c.-22G>A no gene <i>MLPH</i> . Na presença da mutação em homozigose recessiva (dd) forma-se uma banda de 249 pb, em heterozigose há a formação de duas bandas (249 pb e 237 pb) (A) enquanto que na ausência da mutação (DD) há a formação de fragmentos de 237 pb (B, C, D, E, F).....	27
Figura 3. Dois cães da raça dachshund com alopecia generalizada e mutação SNP c.-22G>A no gene <i>MLPH</i> em homozigose.....	28

RESUMO

CARAMALAC, S.M. Frequência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanofilina responsável pela diluição de cor em cães. 2019. 42p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

1 A alopecia por diluição de cor (ADC) consiste em uma dermatopatia observada
2 exclusivamente em cães com fenótipo de pelagem diluída. A diluição de cor
3 ocorre devido ao SNP c.-22G>A no gene da melanofilina. Entretanto, pelo fato
4 desta mutação ser recessiva, não se sabe apenas observando o fenótipo qual
5 sua frequência na população. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma
6 técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo no Comprimento de
7 Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) que permita a identificação desta mutação
8 e determinar sua frequência na população de cães das raças dachshund,
9 pinscher miniatura e yorkshire. Realizou-se a PCR-RFLP em 40 dachshunds, 40
10 pinschers e 40 yorkshires e a frequência gênica do alelo mutado foi igual a 0,1;
11 0,1 e 0,075 respectivamente. De todos os 120 animais analisados, dois
12 apresentaram mutação em ambos os alelos, confirmando o diagnóstico clínico
13 de ADC. Não houve diferença estatística entre as três raças analisadas (valor-p
14 = 0,2521). Além disso, verificou-se que as frequências gênica e genotípica das
15 populações pinscher e yorkshire estão em equilíbrio de Hardy-Weimberg, não
16 sendo o mesmo observado para a raça dachshund. A padronização de uma
17 técnica molecular mais simples e acessível para o reconhecimento do SNP c.-
18 22G>A no gene *MLPH* permite que seja possível a identificação dos cães
19 portadores desta mutação e assim sejam excluídos da reprodução, de modo a
20 evitar o nascimento de animais diluídos e conseqüentemente ADC. Além disso,
21 verificou-se que esta mutação está presente nas três raças analisadas, sendo
22 dois cães da raça dachshund estudados com fenótipo e genótipo de ADC.

23

24 **Palavras-chave:** dachshund, frequência gênica, PCR-RFLP, pinscher miniatura,
25 yorkshire.

26

ABSTRACT

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Color dilution alopecia (ADC) consists of a dermatopathy observed exclusively in dogs with diluted coat phenotype. Color dilution occurs due to SNP c.-22G> A in the melanophilin gene. However, because this mutation is recessive, it is not known only by observing the phenotype of its frequency in the population. Thus, the objective of this work was to standardize a Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP) polymorphism technique to identify this mutation and to determine its frequency in the dachshund, miniature pinscher and yorkshire. PCR-RFLP was performed on 40 dachshunds, 40 pinschers and 40 yorkshires and the gene frequency of the mutated allele was 0.1; 0.1 and 0.075 respectively. Of all the 120 animals analyzed, two presented mutation in both alleles, confirming the clinical diagnosis of ADC. There was no statistical difference between the three races analyzed (p-value = 0.2521). In addition, it was found that the genotypic and genotypic frequencies of the pinscher and yorkshire populations are in Hardy-Weimberg equilibrium, and not the same for the dachshund breed. The standardization of a simpler and more accessible molecular technique for the recognition of SNP c.-22G>A in the MLPH gene makes it possible to identify dogs carrying this mutation and thus excluded from reproduction in order to avoid the birth of animals diluted and consequently ADC. In addition, it was verified that this mutation is present in the three analyzed races, being two dachshund dogs studied with phenotype and ADC genotype.

Keywords: dachshund, gene frequency, PCR-RFLP, miniature pinscher, yorkshire.

CAPÍTULO 1

61

62

63 1. INTRODUÇÃO

64

65 A pelagem constitui um importante atributo racial para os animais,
66 incluindo os cães, em que determinada coloração ou característica (textura,
67 pigmentação, comprimento) dos pelos pode ser decisiva para a perda do padrão
68 da raça e conseqüente perda de valor monetário e possibilidade de doenças
69 concomitantes. Alguns animais apresentam a pelagem diluída em cor, fenótipo
70 este presente devido a um distúrbio autossômico recessivo responsável pela
71 distribuição irregular da melanina nos pelos, levando à pelagem azul
72 (consequência da diluição da pelagem preta) e Isabella (diluição da pelagem
73 chocolate) (Miller, 1990; Beco et al., 1996; Philipp et al., 2005). Ao longo do
74 crescimento, alguns desses animais apresentam alopecia progressiva dos pelos
75 diluídos, sendo tal desordem denominada alopecia por diluição de cor (ADC)
76 (Miller, 1990; Philipp et al., 2005).

77 A prática do acasalamento consanguíneo faz com que distúrbios
78 hereditários recessivos se tornem mais frequentes. Animais podem portar o alelo
79 da diluição de cor (d) no gene da melanofilina (*MLPH*) e não apresentarem o
80 fenótipo diluído, entretanto, o cruzamento entre estes indivíduos portadores do
81 alelo recessivo (d) podem resultar no desenvolvimento de animais com diluição
82 de pelagem (genótipo dd). Alguns destes animais homozigotos recessivos
83 podem desenvolver ADC e, por se tratar de uma alopecia tardia, faz com que
84 eles sejam assintomáticos ao nascimento, apresentando apenas a pelagem
85 diluída (Miller, 1990). Estes cães, ao longo de seu desenvolvimento, começam a
86 apresentar alopecia nas regiões de pelagem diluída, podendo esta ser
87 generalizada (Miller, 1990; Beco et al., 1996).

88 Por se tratar de uma doença incomum, muitos clínicos veterinários
89 desconhecem a ADC e preconizam diversos tratamentos com antifúngicos,
90 antibióticos e até reposição hormonal, uma vez que se assemelha muito com
91 perda de pelo de origem endócrina, principalmente com o hipotireoidismo. O
92 insucesso destes tratamentos pode também resultar em muitas despesas

93 desnecessárias ao proprietário e oferecer riscos à saúde do animal (Perego et
94 al., 2009).

95 A ADC é uma desordem que pode ser evitada por práticas de restrição na
96 reprodução (Miller, 1990). Para o adequado aconselhamento é importante a
97 realização de estudos que identifiquem a presença do alelo “d” responsável pela
98 diluição de cor nos cães e que determinem a frequência desta mutação na
99 população canina. Também é necessário o desenvolvimento de técnicas
100 moleculares de baixo custo para a identificação dos animais portadores deste
101 alelo recessivo da diluição (d), podendo ser realizado antes da comercialização
102 de animais, protegendo os proprietários da aquisição de um cão que possa
103 desenvolver ADC. Além disso, estes testes moleculares podem ser utilizados
104 como critério para o acasalamento destes animais pelos criadores e ser
105 empregados na rotina dos médicos veterinários, permitindo, assim, a
106 erradicação da ADC nesta espécie.

107

108

109 **2. OBJETIVOS**

110

111 **2.1. Objetivo geral**

112

113 Determinar a frequência da mutação SNP c.-22G>A no gene da
114 melanofilina em cães das raças dachshund, pinscher miniatura e yorkshire no
115 município de Campo Grande, MS.

116

117 **2.2 Objetivos específicos**

118

119 Os objetivos específicos deste projeto são:

- 120 • Padronizar e validar uma reação de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da
121 Polimerase – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
122 para identificação da mutação SNP c.-22G>A;
- 123 • Determinar as frequências genotípica e gênica do gene melanofilina em
124 populações de cães das raças dachshund, pinscher miniatura e yorkshire
125 provenientes de Campo Grande, MS;

- 126 • Verificar se há associação entres as frequências do alelo “d” e as raças
127 estudadas.

128

129 3. REVISÃO DE LITERATURA

130

131 A genética molecular da pigmentação é altamente complexa e envolve a
132 ação coordenada de muitos genes (Ishida et al., 2006). A pigmentação do pelo
133 se dá pela deposição de melanina sintetizada pelo melanócito. O mecanismo de
134 formação acontece no interior dos melanossomos, onde a enzima tirosinase é
135 responsável pela oxidação da tirosina em DOPA (1,3,4-dihidroxifenilalanina),
136 sendo esta, então, transformada em melanina (Kierszenbaum, 2012).
137 Posteriormente, graças a cinesina e dineína, ocorre o transporte dos
138 melanossomos ao longo dos microtúbulos. A miosina VA, que se liga ao
139 melanossomo RAB27A pela melanofilina, captura os melanossomos que
140 atingem a periferia da célula e os prendem ao citoesqueleto da actina (Barral &
141 Seabra, 2004). O defeito em uma destas três proteínas (miosina VA, melanofilina
142 e RAB27A) resulta em falha no transporte da melanina, com consequente
143 formação de grânulos alargados e de distribuição irregular ao longo do pelo,
144 diminuindo a quantidade de absorção de luz de modo a formar um fenótipo em
145 que a cor da pelagem é diluída (Ishida et al., 2006).

146 O gene melanofilina (*MLPH*) codifica uma proteína expressa
147 principalmente no melanócito que é essencial para a formação do complexo
148 miosina VA, melanofilina e RAB27A. A mutação deste gene é responsável pela
149 diluição da pelagem, afetando tanto a eumelanina como a feomelanina (Demars
150 et al., 2018), já identificada em caninos (Philipp et al., 2005), felinos (Ishida et al.,
151 2006), bovinos (Li et al., 2016), galinha (Vaez et al., 2008), codorna (Bed’hom et
152 al., 2012), vison-americano (Cirera et al., 2013) e coelhos (Demars et al., 2018).
153 Em cães, sabe-se que o Polimorfismo de Único Nucleotídeo (SNP) c.-22G>A no
154 exon 1 (Drögemüller et al., 2007) e c.705G>C no exon 7 (Bauer et al., 2018) no
155 gene *MLPH* são responsáveis pelo fenótipo diluído.

156 A pelagem diluída é herdada como um traço autossômico recessivo
157 (Drögemüller et al., 2007; Welle et al., 2009). Desse modo, na presença da
158 mutação em homozigose, o cão com o pelo originalmente preto ou chocolate,

159 apresenta o fenótipo azul (também denominada cinza) e creme (Isabella),
160 respectivamente (Beco et al., 1996). Entretanto, aqueles que forem portadores
161 da mutação em heterozigose, são fenotipicamente normais, sendo estes
162 impossíveis de serem identificados sem a realização de exames genéticos. Em
163 humanos, a mutação no gene da melanofilina é responsável pela Síndrome de
164 Griscelli III, que é caracterizada por diluição do pigmento do cabelo e da pele,
165 sem entretanto ser acompanhado por alterações neurológicas ou de imunidade
166 (Ménasché et al., 2003; Demars et al., 2018).

167 Alopecia por diluição de cor (ADC) consiste em uma doença de pele
168 estritamente relacionada com a pelagem diluída, e conseqüentemente com a
169 mutação do gene *MLPH*. Anteriormente conhecida como Síndrome do
170 Doberman Cinza, Alopecia Congênita e Doença do Cão Cinza, tal desordem
171 caracteriza-se pela perda progressiva de pelos das áreas de pigmento diluído,
172 que em alguns casos é acompanhada por foliculite recorrente (Phillip et al.,
173 2005). Apresenta elevada prevalência em Doberman Pinscher (93%) (Miller,
174 1991), mas também é descrita em Yorkshire Terrier, Pinscher miniatura, Great
175 Dane, Whippet, Irish Setter, Greyhound italiano, Saluki, Chow Chow, Dachshund,
176 Silky Terrier, Boston Terrier, Newfoundland, Bernese Mountain, Shetland
177 Sheepdog, Schipperke, Chihuahua e Poodle (Roperto et al., 1995; Beco et al.,
178 1996; Ferreira et al., 2007; Cerundolo, 2013), entretanto, pode acometer
179 qualquer cão de pelagem diluída (Kim et al., 2005), incluindo cães mestiços
180 (Lopes et al., 2017). Trata-se de uma displasia folicular ligada a cor da pelagem
181 (também denominada displasia cutânea neuroectodermal congênita) que pode
182 ter apresentação difusa (no caso da ADC) ou restrita a pelagem preta, sendo
183 esta denominada Displasia Folicular dos Pelos Pretos (DFPP) (Ferreira et al.,
184 2007). Segundo von Bomhard et al. (2006), um defeito no transporte do
185 melanossomo dentro do melanócito com interrupção da unidade pigmentada é
186 proposto como parte integrante do mecanismo patogênico para DFPP.

187 A ADC não ocorre em todos os animais com pelagem diluída, mas esta
188 característica fenotípica consiste no fator predisponente para ocorrência da
189 displasia folicular ligada a cor da pelagem, de modo que segundo a teoria de
190 Miller (1990), o gene *MLPH* mutado esteja relacionado com a transmissão
191 genética da ADC. Entretanto, apesar de ser um fator predisponente, não são
192 todos os cães com fenótipo diluído que irão desenvolver ADC. Estudo realizado

193 por Welle et al. (2009) verificou que cerca de 25% dos cães de pelo cinza
194 mostraram sinais clínicos de ADC, enquanto os outros não desenvolveram
195 alopecia.

196 O mecanismo patogênico da ADC não está totalmente esclarecido. Sabe-
197 se que tal distúrbio não se manifesta ao nascimento (Kim et al., 2005), sendo as
198 anormalidades no pelo e lenta alopecia progressiva desenvolvidas ao longo de
199 seu crescimento, entre 3 e 12 meses de idade (Welle et al., 2009). Os cães
200 apresentam alopecia, descamação, pelos secos e quebradiços (Ferreira et al.,
201 2007). A alopecia comumente inicia-se na região dorsal do tronco, progredindo
202 para a cabeça, cauda e membros, podendo variar de acordo com a raça
203 acometida. O animal apresenta prurido apenas se acometido por infecção
204 bacteriana (Kim et al., 2005), o qual diminui com antibioticoterapia, mas não
205 resulta na melhora da cobertura pilosa (Perego et al., 2009).

206 A distribuição irregular da melanina no pelo diluído faz com que o pelo se
207 torne mais suscetível a quebras, de modo que esta pode ser a explicação do
208 desenvolvimento de alopecia em alguns animais com pelagem diluída
209 (Mecklenburg et al., 2009). Não se sabe ao certo por que ocorre a interrupção
210 do ciclo folicular, com a permanência na fase telógena (repouso). Uma
211 explicação seria que, nos animais diluídos, a liberação da melanina do interior
212 do melanócito levaria a exposição de fatores citotóxicos às células da matriz, que
213 não afetaria o cão na sua fase inicial de vida, mas com o avanço na idade mais
214 células seriam danificadas, de modo a afetar a maioria, se não todas as células
215 de matriz, havendo crescimento folicular mínimo nestes animais (Miller, 1990;
216 Mecklenburg et al., 2009). Welle et al. (2009) verificaram que os cães com ADC
217 apresentam aglomerados de melanina na epiderme, diferentemente dos animais
218 que tem a pelagem diluída mas não a alopecia.

219 Dermatopatias que resultam em alopecia devem ser consideradas, como
220 hipotireoidismo, hiperadrenocorticismismo e demodicidose generalizada. Todavia, a
221 presença da pelagem diluída e o curso característico da doença ajuda na
222 realização do diagnóstico. O diagnóstico definitivo da ADC é realizado por meio
223 da análise microscópica do pelo ou biópsia da pele, observando-se folículos
224 pilosos atrofiados ou displásicos, com áreas preenchidas com grandes grânulos
225 de melanina (Ferreira et al., 2007). O desenvolvimento de pelos displásicos está
226 diretamente ligado a mudança da arquitetura da região bulbar, em que a

227 formação de grandes aglomerados de melanina em melanócitos separa o centro
228 germinal da matriz do pelo (von Bomhard et al., 2006). A presença de
229 aglomerados de melanina na epiderme é um forte indicador para ADC ou DFPP
230 (Welle et al., 2009).

231 Não há tratamento específico ou curativo para ADC (Perego et al., 2009).
232 Os animais acometidos não respondem a nenhum tratamento antifúngico,
233 antibacteriano e suplementação com hormônios tireoidianos ou melatonina. O
234 tratamento é limitado ao controle da descamação e prurido com uso de
235 shampoos e tratamentos tópicos (Kim et al., 2005). O prognóstico é bom, mas é
236 preferível evitar a criação de animais afetados (Perego et al., 2009). Pelo fato
237 desta desordem ser de origem genética, é possível realizar a identificação dos
238 animais portadores desta mutação e retirá-los da reprodução, de modo a diminuir
239 o nascimento de cães predispostos ao desenvolvimento de ADC.

240

241

242 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

243

244 BARRAL, D.C.; SEABRA, M.C. The melanosome as a
245 model to study organelle motility in mammals. **Pigment Cell Research**, v. 17,
246 p. 111–118, 2004.

247 BAUER, A.; KEHL, A.; JAGANNATHAN, V.; LEEB, T. A novel MLPH variant in
248 dogs with coat colour dilution. **Animal Genetics**, v.49, n.1, p.94-97, 2018.

249 BECO, L.; FONTAINE, J.; GROSS, T. L.; CHARLIER, G. Colour dilution alopecia
250 in seven Dachshunds. A clinical study and the hereditary, microscopical and
251 ultrastructural aspect of the disease. **Veterinary Dermatology**, v. 7, n. 2, p.
252 91–97, 1996.

253 BED'HOM, B.; VAEZ, M.; COVILLE, J.L. et al. The lavender plumage colour in
254 Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of MLPH
255 that is related to differences in growth, feed consumption and body
256 temperature. **BMC Genomics**, n.13, p.1-12, 2012.

257 CERUNDOLO, R. Diagnostic approach to canine symmetrical alopecia.

258 **Companion Animal**, v. 18, n. 2, p. 63–68, 2013.

259 CIRERA, S.; MARKAKIS, M.N.; CHRISTENSEN, K.; ANISTOROAEI, R. New
260 insights into the melanophilin (MLPH) gene controlling coat color phenotypes
261 in American mink. **Gene**, n.527, 48-54, 2013.

262 DEMARS, J.; IANNUCELLI, N.; UTZERI, V.J.; AUVINET, G.; RIQUET, J.;
263 FONTANESI, L.; ALLAIN, D. News insights into the melanophilin (MLPH)
264 gene affecting coat color dilution in rabbits. **Genes**, v. 9, n.430;
265 doi:10.3390/genes9090430, 2018.

266 DRÖGEMÜLLER, C.; PHILIPP, U.; HAASE, B.; GÜNZEL-APEL, A. R.; LEEB, T.
267 A noncoding melanophilin gene (MLPH) SNP at the splice donor of exon 1
268 represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs.
269 **Journal of Heredity**, v. 98, n. 5, p. 468–473, 2007.

270 FERREIRA R. R.; MACHADO, M. L. S.; AGUIAR, J; SPANAMBERG, A.;
271 BIANCHI, S. B.; OLIVEIRA, E. C.; DRIEMEIER, D. Displasias foliculares
272 ligadas à cor da pelagem em cães: displasia folicular dos pêlos pretos e
273 alopecia por diluição da cor. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p.119-124,
274 2007.

275 ISHIDA, Y.; DAVID, V. A.; EIZIRIK, E.; SCHÄFFER, A. A.; NEELAM, B. A.;
276 ROELKE, M. E.; HANNAH, S.S.; O'BRIEN, S.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.
277 A homozygous single-base deletion in MLPH causes the dilute coat color
278 phenotype in the domestic cat. **Genomics**, v. 88, n. 6, p. 698–705, 2006.

279 KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. Histologia e biologia celular. 3 ed. Elsevier
280 Brasil, 688 p. 2012.

281 KIM, J. H.; KANG, K. I.; SOHN, H. J.; WOO, G. H.; JEAN, Y. H.; HWANG, E. K.
282 Color-dilution alopecia in dogs. **Journal of veterinary science**, v. 6, p. 259-
283 261, 2005.

284 LI, W.; SARTELET, A.; TAMMA, N.; COPPIETERS, W.; GEORGES, M.;
285 CHARLIE, R.C. Reverse genetic screen for loss-of-function
286 mutationsuncovers a frameshifting deletion in the melanophilin

287 geneaccountable for a distinctive coat color in Belgian Blue cattle. **Anima**, v.
288 47, p.110-113, 2016.

289 LOPES, N. L.; PEIXOTO, A.P.; PISANI, R.B. et al. Alopecia por diluição da cor:
290 relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 198-
291 202, 2017.

292 MECKLENBURG, L.; LINEK, M.; TOBIN, D.J. (Ed.). Hair loss disorders in
293 domestic animals. John Wiley & Sons, 288 p. 2009.

294 MENASCHE, G.; HO, C.H.; SANAL, O.; FELDMANN, J.; TEZCAN, I.; ERSOY,
295 F.; HOUDUSSE, A.; FISCHER, A.; BASILE, G.S. Griscelli syndrome
296 restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect. (GS3) or a
297 MYO5A F-exon deletion (GS1). **The Journal of clinical investigation**, v.
298 112, p.450–456, 2003.

299 MILLER, W. H. Colour Dilution Alopecia in Doberman Pinschers with Blue or
300 Fawn Coat Colours: A Study on the Incidence and Histopathology of this
301 Disorder. **Veterinary Dermatology**, v. 1, n. 3, p. 113–122, 1990.

302 MILLER W.H. Alopecia associated with coat color dilution in two Yorkshire
303 terriers, one saluki, and one mixed-breed dog. **Journal of the American**
304 **Animal Hospital Association**, v.27, p.39-43, 1991.

305 PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; ROCCABIANCA, P.; SPADA, E. Color dilution
306 alopecia in a blue Doberman pinscher crossbreed. **The Canadian**
307 **Veterinary Journal**, v. 50, p. 511-514, 2009.

308 PHILIPP, U.; QUIGNON, P.; SCOTT, A.; ANDRÉ, C.; BREEN, M.; LEEB, T.
309 Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat
310 color in dogs. **BMC Genetics**, v. 6, p. 1–15, 2005.

311 ROPERTO, F.; CERUNDOLO, R.; RESTUCCI, B.; VINCENSI, M. R.;
312 CAPRARIIS, D. D.; VICO, G. D.; MAIOLINO, P. Colour Dilution Alopecia
313 (CDA) in Ten Yorkshire Terriers, **Veterinary Dermatology**, v.6, n.4, p.171-
314 178 1995.

315 VAEZ, M.; FOLLETT, S.A.; BED'HOM, B.; GOURICHON, D.; TIXIER-BOICHARD, M.;
316 BURKE, T. A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender
317 plumage colour dilution phenotype in the chicken. **BMC Genetics**, v.9, n.7, 2008.

318 von BOMHARD, W.; MAULDIN, E. A.; SCHMUTZ, S. M.; LEEB, T.; CASAL, M.
319 L. Black hair follicular dysplasia in Large Munsterlander dogs: clinical,
320 histological and ultrastructural features. **Veterinary Dermatology**, v. 17, p.
321 182–188, 2006.

322 WELLE, M.; PHILIPP, U.; RÜFENACHT, S.; ROOSJE, P.; SCHARFENSTEIN,
323 M.; SCHÜTZ, E.; BRENIG, B.; LINEK, M.; MECKLENBURG, L.; GREY, P.;
324 DRÖGEMÜLLER, M.; HAASE, B.; LEEB, T.; DRÖGEMÜLLER, C. MLPH
325 genotype - melanin phenotype correlation in dilute dogs. **Journal of**
326 **Heredity**, v.100, S75-S79, 2009.

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

CAPÍTULO 2

343

344

Artigo formatado conforme normas para publicação no

345

periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e

346

Zootecnia

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362 **Frequência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanofilina responsável pela**
363 **diluição de cor em cães**

364 **Frequency of mutation SNP c.22G>A in the gene of melanofiline responsible for**
365 **dilution of color in dogs**
366

367 Silvana Marques Caramalac¹, Carlos Alberto do Nascimento Ramos², Mariana Isa Poci
368 Palumbo³

369 ¹Mestranda do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de
370 Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) – Universidade Federal de Mato Grosso do
371 Sul

372 ²Professor adjunto de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária e
373 Zootecnia (FAMEZ) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

374 ³Professora adjunta de Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais da Faculdade
375 de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) – Universidade Federal de Mato Grosso
376 do Sul

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387 **Frequência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanofilina responsável pela**
388 **diluição de cor em cães**

389 **Frequency of mutation SNPc.22G>A in the gene of melanofilin responsible for**
390 **dilution of color in dogs**

391

392 **Resumo:** A alopecia por diluição de cor consiste em uma dermatopatia caracterizada por
393 queda de pelo tardia, que acomete exclusivamente regiões com pelagem diluída. Este
394 fenótipo mais claro dos pelames ocorre devido a mutação em um dos genes responsáveis
395 pela produção de proteínas que transportam os grânulos de melanina ao longo do folículo
396 piloso. Sabe-se que o SNP c.-22G>A no gene da melanofilina é responsável pelo fenótipo
397 diluído em cães. Entretanto, por sua característica autossômica recessiva, não se sabe a
398 frequência desta mutação na população desta espécie. Assim, o presente estudo teve como
399 objetivo padronizar uma nova técnica de PCR-RFLP para identificação desta mutação e
400 determinar sua frequência em uma população de cães das raças dachshund, yorkshire e
401 pinscher miniatura. Foi realizada a análise genética de 40 cães de cada uma das raças, em
402 que se obteve frequência gênica do alelo mutado de 0,1; 0,1 e 0,0875 em dachshund,
403 yorkshire e pinscher miniatura, respectivamente. Verificou-se também que,
404 estatisticamente, a frequência genotípica entre as três raças são iguais (valor-p = 0,2521)
405 e as raças yorkshire e pinscher estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, diferentemente
406 do observado na raça dachshund.

407 **Palavas-chave:** dachshund, frequência gênica, PCR-RFLP, pinscher miniatura,
408 yorkshire.

409

410 **Abstract:** Color dilution alopecia consists of a dermatopathy characterized by late hair
411 loss, which affects exclusively regions with diluted coat. This lighter pellic phenotype
412 occurs due to mutation in one of the genes responsible for the production of proteins
413 carrying the melanin granules along the hair follicle. It is known that the SNP c.-22G> A
414 in the melanofilin gene is responsible for the phenotype diluted in dogs. However, due to
415 its autosomal recessive characteristic, the frequency of this mutation in the population of
416 this species is unknown. Thus, the present study aimed to standardize a new PCR-RFLP
417 technique to identify this mutation and to determine its frequency in a population of dogs
418 of the dachshund, yorkshire and miniature pinscher breeds. Genetic analysis of 40 dogs

419 of each breed was carried out, in which the mutated allele of 0.1 gene frequency was
420 obtained; 0.1 and 0.0875 in dachshund, yorkshire and miniature pinscher, respectively.
421 The genotypic frequency between the three races was also statistically the same (p-value
422 = 0.2521) and the yorkshire and pinscher breeds were in Hardy-Weinberg equilibrium,
423 differently from the dachshund breed.

424 **Keywords:** dachshund, gene frequency, PCR-RFLP, miniature pinscher, yorkshire

425

426

Introdução

427

428 A distribuição da melanina ao longo do pelo ocorre graças à participação de três
429 proteínas, codificadas pelos genes *RAB27A*, *MYO5A* e *MLPH* (Ishida et al., 2006; Hume
430 et al., 2007). Mutações nestes genes são responsáveis pelo arranjo irregular dos grânulos
431 de melanina, que resulta no desenvolvimento da pelagem diluída. Assim, animais de
432 pelagem originalmente preta apresentam pelos de coloração acinzentada (também
433 denominada azul), enquanto aqueles de pelagem chocolate apresentam fenótipo creme
434 (Isabella) (Beco et al., 1996).

435

436 A diluição da cor de pelagem é encontrada em muitas espécies de mamíferos e
437 aves (Bauer et al., 2018), sendo identificada a mutação no gene *MLPH* em cão
438 (Drögemüller et al., 2007; Bauer et al., 2018), coelho (Demars et al., 2018), gato (Ishida
439 et al., 2006), galinha (Vaez et al., 2008), codorna (Bed'hom et al., 2012), vison-americano
440 (Cirera et al., 2013) e bovino (Li et al., 2016).

441

442 Sabe-se que cães com pelagem diluída tem predisposição ao desenvolvimento de
443 alopecia por diluição de cor (ADC), que consiste em uma desordem dermatológica
444 caracterizada pela queda de pelos tardia, acometendo exclusivamente a pelagem diluída
445 (Miller, 1990). A ADC é descrita, sobretudo, em dobermann pinscher (Miller, 1990),
446 entretanto, o acometimento de outras raças já foi relatado, como em dachshund (Beco et
447 al., 1996), yorkshire (Roperto et al., 1995), saluki (Miller, 1991), cane corso (Negoiță &
448 Negoiță, 2017) e mestiço (Lopes et al., 2017).

449

450 Em cães, a substituição do nucleotídeo guanina por adenosina no códon -22 (SNP
451 c.-22G>A) no éxon 1 no gene *MLPH* é responsável pela diluição da cor dos pelos
452 (Drögemüller et al., 2007), devendo estar presente em ambos os alelos, uma vez que
453 apresenta característica autossômica recessiva. Assim, a partir do conhecimento do local
454 de mutação é possível identificar os animais fenotipicamente normais (não diluídos), mas
455 que são portadores desta mutação. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi

453 padronizar uma técnica de PCR-RFLP para identificação dos cães que tem o SNP c.-
454 22G>A no gene da melanofilina e determinar sua frequência na população de cães das
455 raças dachshund, pinscher miniatura e yorkshire.

456

457

Material e métodos

458

459 Para o estudo da mutação do gene *MLPH* foi realizada a formação de três grupos
460 amostrais, cada um composto por 40 cães, sendo este número determinado com base no
461 número mínimo necessário para realização de estudo epidemiológico. As raças
462 analisadas foram dachshund, pinscher miniatura e yorkshire. Os animais foram
463 considerados das respectivas raças por atenderem aos padrões mínimos determinados pela
464 Confederação Brasileira de Cinofilia, filiada à Fédération Cynologique Internationale. As
465 amostras foram obtidas a partir da rotina de atendimento de um hospital veterinário.

466

467 Para uso das amostras biológicas dos animais os proprietários assinaram o Termo
468 de Livre Consentimento Esclarecido. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e
469 Uso de Animais (CEUA) da UFMS (protocolo nº 822/2016).

470

471 A análise genética dos animais deste estudo foi realizada a partir de amostras de
472 sangue venoso, coletado por venopunção jugular. No momento da coleta, os cães foram
473 registrados quanto às características fenotípicas da raça e quanto a presença de alopecia.
474 As amostras de sangue coletadas foram armazenadas em tubos com EDTA e congeladas
475 em freezer a -20°C para posterior análise molecular.

476

477 A extração de DNA foi realizada com o protocolo preconizado por Araújo et al.
478 (2009) a partir de 350 µL de sangue. Após a extração, as amostras de DNA foram
479 submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizadas em transiluminador UV
480 e sistema de documentação Gel Doc (Bio-Rad) para avaliação da qualidade das amostras
481 extraídas.

482

483 Para reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *MLPH* foram utilizados
484 *primers* anteriormente descritos por Drögemüller et al. (2007), sendo eles específicos para
485 a amplificação de todo o exon 1 do gene *MLPH*. O *primer* senso *MLPH_157395_F* (5
486 'CCTTCCTTCCCCTGTAGGAC 3') e o *primer* antisenso *MLPH_157706_R* (5
'GCCTAAAATGAGCTCCCTGA 3') amplificam um fragmento de 312 pares de bases
(pb). Cada PCR foi preparada em um volume final de 25 µl, contendo 10 µM de cada
primer (senso e antisenso), 100 µg de DNA, 12.5µl de GoTaq® Green Master Mix
(Promega) e água *nuclease-free* em quantidade suficiente para completar o volume final

487 da reação. As reações foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo a
488 95°C por 4 min; 35 ciclos a 95°C por 30 seg, 60°C por 20 seg, e 72°C por 20 seg; e 1 ciclo
489 a 72°C durante 3 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em
490 transiluminador UV e sistema de documentação Gel Doc após eletroforese em gel de
491 agarose 2%.

492 Para a padronização do PCR-RFLP, duas sequencias de DNA do fragmento
493 delimitado pelos *primers*, sendo uma de um cão não portador e uma proveniente de um
494 cão com a mutação, foram submetidas a análise de restrição *in silico* com o auxílio do
495 programa Codon Code Aligner. A enzima de restrição MspI, que gerou diferentes padrões
496 de restrição nos animais portadores e não portadores com o menor número de fragmentos,
497 foi selecionada. Para a realização da PCR-RFLP os fragmentos amplificados foram
498 submetidos à digestão com enzima MspI, e o resultado foi revelado por eletroforese em
499 gel de agarose a 3%. Os resultados da PCR-RFLP foram comparados com os observados
500 no sequenciamento de oito amostras de DNA no estudo.

501 Para o sequenciamento, os fragmentos amplificados foram purificados e
502 sequenciados em ambas as direções pelo método de Sanger et al. (1977). As reações
503 foram purificadas com o reagente Clean Sweep PCR (Applied Biosystems) de acordo com
504 as recomendações do fabricante. Em seguida, os eletroferogramas foram analisados com
505 o auxílio do programa Bioedit (Hall, 1999) e as sequencias consenso geradas para
506 posterior busca por homologia no GenBank-NCBI.

507 A avaliação da eficácia da PCR-RFLP foi realizada pelo coeficiente Kappa. As
508 frequências genotípica e gênica obtidas dos alelos das respectivas raças foram avaliadas
509 pela análise de frequência relativa. Para verificar se houve diferença estatística entre as
510 raças foi empregado o teste de Qui-quadrado de aderência com determinação do valor-p
511 Exato por amostragem de Monte Carlo (n=100000) no programa SAS v9 ® (2002)
512 segundo McDonald (2014), e para determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi
513 realizado o teste exato de Haldane. Os resultados estatísticos foram considerados
514 significativos quando valor-p <0,05.

515

516

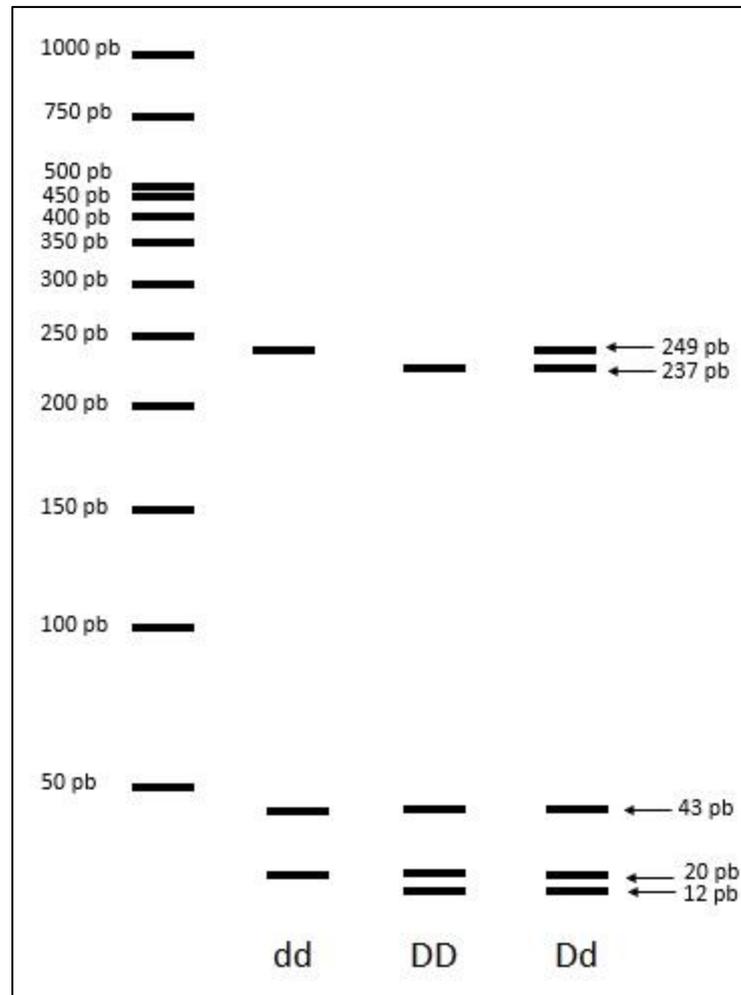
Resultados

517

518 A partir de amostras de sangue total foi possível a identificação dos cães que
519 apresentavam mutação SNP c.-22G>A no gene *MLPH* responsável pelo fenótipo diluído
520 por meio da técnica de PCR-RFLP. Com a análise *in silico*, foi verificado que a utilização

521 da enzima de restrição *MspI* permitiu a identificação dos animais homozigotos
522 dominantes, recessivos e heterozigotos a partir da formação de fragmentos de diferentes
523 tamanhos (Figura 1).

524



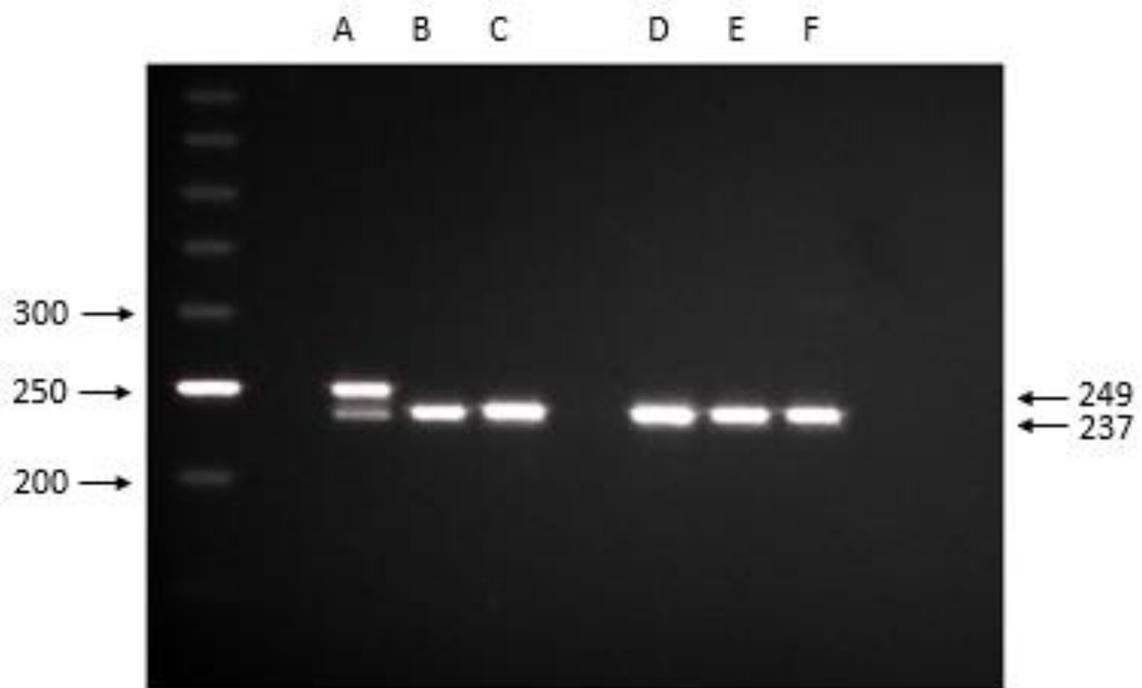
525

526 **Figura 1.** Representação gráfica da PCR-RFLP para identificação do SNP c.-22 G>A no
527 gene *MLPH*. Na primeira coluna está representado marcador molecular (50-500 pb). Na
528 segunda coluna observar a formação de bandas de 249 pb, 43 pb e 20 pb (homozigotos
529 recessivos); na terceira coluna a formação de bandas de 237 pb, 43 pb, 20 pb e 12 pb
530 (homozigotos dominantes); na quarta coluna a formação de bandas de 249 pb, 237 pb, 43
531 pb, 20 pb e 12 pb (heterozigotos).

532

533 Verificou-se que com a observação apenas dos fragmentos maiores já seria
534 possível a distinção dos animais com a mutação genética analisada, de modo que a análise
535 foi realizada como representado na Figura 2.

536



537

538 **Figura 2.** Genotipagem do PCR-RFLP para mutação SNP c.-22G>A no gene *MLPH*. Na
 539 presença da mutação em homozigose recessiva (dd) forma-se uma banda de 249 pb, em
 540 heterozigose há a formação de duas bandas (249 pb e 237 pb) (A) enquanto que na ausência
 541 da mutação (DD) há a formação de fragmentos de 237 pb (B, C, D, E, F).

542

543 Em oito amostras também foram realizadas análises moleculares do gene *MLPH*
 544 pela técnica de sequenciamento, sendo o número utilizado suficiente para comparação
 545 dos resultados com aqueles obtidos pelo método de PCR-RFLP. O coeficiente de Kappa
 546 evidenciou concordância total entre as duas técnicas ($K=+1$) de modo que permite a
 547 validação desta técnica de PCR para identificação dos animais com a mutação genética
 548 analisada.

549 A PCR-RFLP foi realizada em 40 animais de cada raça analisada. A frequência
 550 da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanofilina dos 120 cães analisados está
 551 representada na tabela 1.

552

553

554

555

556

557

558 **Tabela 1.** Frequência genotípica dos animais homocigotos dominantes (DD),
 559 heterocigotos (Dd) e homocigotos recessivos (dd) e frequência gênica dos alelos “D” e
 560 “d” do gene da melanofilina nas três raças analisadas.

Raças	Nº de animais testados	Frequência genotípica			Frequência gênica	
		DD	Dd	dd	D	d
Dachshund	40	0,85	0,1	0,05	0,9	0,1
Pinscher	40	0,8	0,2	0	0,9	0,1
Yorkshire	40	0,825	0,175	0	0,9125	0,0875
TOTAL	120	0,833	0,15	0,05	0,9042	0,0958

561

562 No momento da coleta de sangue, cinco cães apresentavam alopecia (4 dachshund
 563 e 1 pinscher), entretanto, destes apenas dois cães da raça dachshund (Figura 3)
 564 apresentava mutação em ambos os alelos, sendo estes os únicos com características
 565 fenotípica e genotípica de ADC.

566



567

568 **Figura 3.** Dois cães da raça dachshund com alopecia generalizada e mutação SNP c.-
 569 22G>A no gene MLPH em homocigose.

570

571 Apesar da raça dachshund ter sido a única a ter apresentado animais homocigotos
 572 recessivos, não houve diferença estatística na frequência genotípica entre as três raças
 573 analisadas (valor-p = 0,2521). O resultado da análise de equilíbrio genético nas raças
 574 dachshund, pinscher e yorkshire está representado na tabela 2.

575

576

577

578

579

580 **Tabela 2.** Frequência observada e esperada* em três raças caninas dos genótipos para a
 581 mutação SNP c.-22G>A do gene *MLPH*.

Raças	Freq. observada			Freq. Esperada			Qui quadrado	Valor p
	DD	Dd	dd	DD	Dd	dd		
Dachshund	34	4	2	32,4	7,2	0,4	7,9012	0,0049
Pinscher	32	8	0	32,4	7,2	0,4	0,4938	0,4822
Yorkshire	33	7	0	33,3063	6,3875	0,3063	0,3678	0,5442
Total	99	19	2	98,1021	20,7958	1,1021	0,8949	0,3442

582 *De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weimberg

583

584 Verifica-se que, diferentemente das raças pinscher, yorkshire e da avaliação das
 585 três raças simultaneamente, a raça dachshund isoladamente não está em equilíbrio
 586 genético ($p > 0,05$).

587

588

Discussão

589

590 Na técnica de PCR-RFLP ocorre a amplificação do gene pela técnica de PCR e
 591 posterior digestão enzimática por endonucleases específicas (Ota *et al.*, 2007). Isso resulta
 592 na formação de fragmentos de diferentes tamanhos que, após a realização de eletroforese
 593 em gel, permite a identificação da presença ou ausência da mutação analisada (Ota *et al.*,
 594 2007; Rasmussen, 2013). Neste estudo, foi possível desenvolver uma metodologia
 595 baseada em PCR-RFLP para identificação do SNP c.-22G>A no gene da melanofina
 596 que é um fator predisponente a ADC em cães. Esta técnica consiste em um método
 597 simples, de baixo custo e preciso para identificação de SNPs (Ota *et al.*, 2007; Rasmussen,
 598 2013) em relação ao método de sequenciamento pelo método de Sanger *et al.* (1977)
 599 atualmente utilizado, além de ser uma técnica muito mais simples, prática e de menor
 600 custo. Assim, na presente pesquisa, quando a mutação estava presente em ambos os
 601 alelos, a enzima *MspI* utilizada formava 3 fragmentos (249 pb, 43 pb e 20 pb). Já nos cães
 602 em que a mutação não estava presente, os fragmentos eram de 237 pb, 43 pb, 20 pb e 12
 603 pb. Mesmo que a identificação de bandas menores seja mais difícil, é possível o
 604 reconhecimento da mutação apenas com observação dos fragmentos maiores de DNA
 605 formado. A possibilidade de interpretação a partir da eletroforese em gel de agarose torna
 606 esta técnica promissora para identificação dos animais portadores do gene da diluição de
 607 cor.

608

609

Pelo fato da queda de pelos inicialmente ocorrer em região dorsal e tronco, que
 evolui para alopecia simétrica bilateral (Miller, 1990; Beco *et al.*, 1996), muitas vezes a

610 ADC é confundida com doenças endócrinas (Miller, 1990; Roperto *et al.*, 1995).
611 Entretanto, doenças endócrinas ou outras doenças sistêmicas não afetam especificamente
612 uma cor de pelagem (Miller, 1990). No presente estudo, foram observados cinco cães
613 com alopecia no momento da coleta de amostra de sangue, entretanto apenas um
614 dachshund apresentava mutação em ambos os alelos, sendo este o único com
615 característica genética compatível com o desenvolvimento de ADC. Assim, outras causas
616 de alopecia devem ser investigadas. Bauer *et al.* (2018), entretanto, recentemente
617 descreveram uma variante da mutação do gene *MLPH* (c.705G>C) que também é
618 responsável pela diluição de cor de pelagem (d^2d^2) nas raças chow chows, sloughis e thai
619 ridgebacks. Assim, uma possibilidade é que estes animais tenham de fato o genótipo
620 diluído e conseqüentemente ADC, mas com uma mutação diferente da analisada no
621 presente estudo. Entretanto, ainda não há estudos que tenham analisado a mutação
622 c.705G>C no gene *MLPH* também é responsável pelo fenótipo diluído nas três raças
623 analisadas do presente estudo.

624 Segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, uma população que está em equilíbrio
625 genético mantém as frequências alélica e genotípica constantes ao longo das gerações,
626 desde que não sofram seleção, mutação ou migração (Guo & Thompson, 1992). Este
627 teorema desenvolvido por G.H. Hardy (matemático puro) e W. Weinberg (geneticista
628 humano) marcou o início da genética de populações (Mayo, 2008). A ausência de
629 equilíbrio de Hardy-Weinberg na raça dachshund, entretanto, sugere problemas na
630 genotipagem ou estrutura desta população, como devido a não possibilidade de
631 cruzamentos ao acaso (Wigginton *et al.*, 2005; Mayo, 2008).

632 Segundo Miller (1990), em uma ninhada em que há o nascimento de filhotes cinza
633 ou Isabella (ou creme), ambos os pais devem portar pelo menos um alelo recessivo “d”.
634 Pelo fato da diluição da pelagem, assim como a ADC, consistir em uma característica
635 herdada como um traço autossômico recessivo (Beco *et al.*, 1996; Philipp *et al.*, 2005), a
636 eliminação dos cães portadores desse alelo na reprodução é necessária para extinguir
637 ADC (Miller, 1990). O pelo consiste em um mecanismo de defesa inato, de maneira que
638 a ausência deste torna o animal mais susceptível aos agentes externos. Palumbo *et al.*
639 (2012) descreveram um cão com ADC que desenvolveu carcinoma de células escamosas
640 em toda região dorsal de tronco e cabeça. Assim, o teste molecular desenvolvido nesta
641 pesquisa pode ser indicado para evitar o cruzamento de animais portadores da mutação,
642 diminuindo o nascimento de animais predispostos ao desenvolvimento da ADC.

643 No presente estudo, apesar de ter sido identificado apenas 2 cães com o genótipo
644 diluído, a presença da mutação em heterozigose nas raças analisadas evidencia a
645 necessidade da identificação deste gene, a fim de direcionar cruzamentos.

646

647

Conclusão

648

649 A técnica de PCR-RFLP padronizada neste estudo foi eficiente na identificação
650 dos cães com a mutação SNP c.-22G>A do gene da melanofilina. A frequência gênica
651 do alelo mutado foi 0,1; 0,1 e 0,083 para dachshund, pinscher e yorkshire,
652 respectivamente. Não houve diferença para a ocorrência da mutação entre as três raças, e
653 destas, apenas a raça dachshund não está em equilíbrio genético.

654

655

Referências Bibliográficas

656

657 ARAÚJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; LUIZ, H.L. et al. (Ed). Avaliação de um protocolo de
658 extração de DNA genômico a partir de sangue total. Campo Grande: Embrapa Gado
659 de Corte, (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico 120), 2009. 5p.

660 BAUER, A.; KEHL, A.; JAGANNATHAN, V.; LEEB, T. A novel MLPH variant in
661 dogs with coat colour dilution. **Animal Genetics**, v.49, n.1, p.94-97, 2018.

662 BECO, L.; FONTAINE, J.; GROSS, T. L.; CHARLIER, G. Colour dilution alopecia in
663 seven Dachshunds. A clinical study and the hereditary, microscopical and
664 ultrastructural aspect of the disease. **Veterinary Dermatology**, v. 7, n. 2, p. 91–97,
665 1996.

666 BED'HOM, B.; VAEZ, M.; COVILLE, J.L. et al. The lavender plumage colour in
667 Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of MLPH that is
668 related to differences in growth, feed consumption and body temperature. **BMC**
669 **Genomics**, n.13, p.1-12, 2012.

670 CIRERA, S.; MARKAKIS, M.N.; CHRISTENSEN, K.; ANISTOROAELI, R. New
671 insights into the melanophilin (MLPH) gene controlling coat color phenotypes in
672 American mink. **Gene**, n.527, 48-54, 2013.

673 DEMARS, J.; IANNUCELLI, N.; UTZERI, V.J. et al. New insights into the
674 melanophilin (MLPH) gene affecting coat color dilution in rabbits. **Genes**, v.9, n. 430,
675 p.1-12, 2018.

676 DRÖGEMÜLLER, C.; PHILIPP, U.; HAASE, B. et al. A noncoding melanophilin gene
677 (MLPH) SNP at the splice donor of exon 1 represents a candidate causal mutation for
678 coat color dilution in dogs. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 5, p. 468–473, 2007.

679 GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion
680 for multiplex alleles. *Biometrics*, v.48, n.2, p.361-372, 1992.

681 HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
682 program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v.41, p.95-98,
683 1999.

684 HUME, A.N.; USHAKOV, D.S.; TARAFDER, A.K. et al. Rab27a and MyoVa are the
685 primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes **Journal of**
686 **Cell Science**, v.120, p. 3111-3122, 2007.

687 ISHIDA, Y.; DAVID, V. A.; EIZIRIK, E. et al. A homozygous single-base deletion in
688 MLPH causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat. **Genomics**, v. 88, n.
689 6, p. 698–705, 2006.

690 LI, W.; SARTELET, A.; TAMMA, N.; COPPIETERS, W. et al. Reverse genetic screen
691 for loss-of-function mutations uncovers a frameshifting deletion in the melanophilin
692 geneaccountable for a distinctive coat color in Belgian Blue cattle. **Animal Genetics**,
693 n.47, p.110-113, 2016.

694 LOPES, N. L.; PEIXOTO, A.P.; PISANI, R.B. et al. Alopecia por diluição da cor: relato
695 de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 198-202, 2017.

696 MAYO, O. A century of Hardy-Weinberg Equilibrium. **Twin Research and Human**
697 **Genetics**, v.11, n.3, p.249-256, 2008.

698 McDONALD, J.H. Handbook of biological statistics. 3rd ed. Baltimore: Sarky House
699 Publication. 2014. 305p

700 MILLER, W.H. Colour Dilution Alopecia in Doberman Pinschers with Blue or Fawn
701 Coat Colours: A Study on the Incidence and Histopathology of this Disorder.
702 **Veterinary Dermatology**, v. 1, n. 3, p. 113–122, 1990.

703 MILLER W.H. Alopecia associated with coat color dilution in two Yorkshire terriers,
704 one saluki, and one mixed-breed dog. **Journal of the American Animal Hospital**
705 **Association**, v.27, p.39-43, 1991.

706 NEGOIȚĂ, C.; NEGOIȚĂ, V. Cutaneous phaeohyphomycosis in a dog with color
707 dilution alopecia-case report. **Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine**, v.
708 63, n. 2, p. 101-105, 2017.

709 OTA, M.; FUKUSHIMA, H.; KULSKI, J.K.; INOKO, H. Single nucleotide
710 polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length
711 polymorphism. **Nature Protocol**, v. 2, n. 11, p. 2857–2864, 2007.

712 PALUMBO, M.I.; FABRIS, V.E.; MACHADO, L.H.A. Carcinoma de células escamosas
713 em um cão com alopecia por diluição de cor. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 14,
714 p.507–512, 2012.

715 PHILIPP, U.; QUIGNON, P.; SCOTT, A. et al. Polymorphisms within the canine MLPH
716 gene are associated with dilute coat color in dogs. **BMC Genetics**, v. 6, p. 1–15, 2005.

717 RASMUSSEN, H.B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-
718 Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for
719 Genotyping and Genetic Fingerprinting. In: MAGDELDIN, S. (Ed). *Gel*
720 *Electrophoresis - Principles and Basics*. 2013. p.315-344.

721 ROPERTO, F.; CERUNDOLO, R.; RESTUCCI, B. et al. Colour Dilution Alopecia
722 (CDA) in Ten Yorkshire Terriers. **Veterinary Dermatology**, v.6, n.4, p.171-178 1995.

723 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating
724 inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-
725 5467, 1977.

726 VAEZ, M.; FOLLETT, S.A.; BED'HOM, B. et al. A single point-mutation within the
727 melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the
728 chicken. **BMC Genetics**, v.9, n.7, p.1-9, 2008.

729 WIGGINTON, E.W.; CULTER, D.J.; ABECASIS, G.R. A note on exact tests of Hardy-
730 Weimberg equilibrium. **The American Journal of Human Genetics**, v.76, n.5,
731 p.887-893, 2005.

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749 **DECLARAÇÃO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

750

751

752 DADOS DO ANIMAL

753

754 Nome: _____ Raça: _____ Sexo: _____

755 Prontuário: _____

756 Espécie: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

757

758

759 DADOS DO PROPRIETÁRIO

760

761 Nome: _____

762 Rg: _____

763 Cpf: _____

764 Tel: _____

765

766 Declaro, para os devidos fins, que estou ciente e autorizo a coleta
767 de sangue para realização de PCR para pesquisa relacionada à alopecia
768 por diluição de cor. Autorizo a realização de fotografia do meu animal e
769 concordo que os resultados obtidos sejam utilizados para publicações
770 científicas.

771

772

773 Data: _____

774

775

776 Assinatura do proprietário:

777

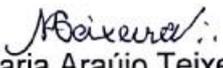
778 _____



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Ocorrência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanophilina responsável pela alopecia por diluição de cor em cães", Protocolo nº 822/2016 sob a responsabilidade de **Mariana Isa Poci Palumbo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, na 1ª reunião ordinária do dia 02/02/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	1º/03/2017 a 1º/03/2019
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> / Dachshund, Pinscher e Doberman
Números de Animais	60 60
Peso/Idade	2 meses a 8 anos / Variada
Sexo	Macho ou Fêmea
Origem (fornecedor)	Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 03 de fevereiro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CI nº 73/2018 - CEUA/CPER/COMIS

Campo Grande, 20 de setembro de 2018.

Da: Profª Drª Joice Stein – Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS

Para: Profª Drª Mariana Isa Poci Palumbo - FAMEZ

Via: Direta

Assunto: CI nº 56/2018 de 30/07/2018 a essa CEUA, solicitando a alteração de modelo animal no Protocolo 822/2016.

Prezada Pesquisadora:

A Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS informa a aprovação, na 8ª Reunião Ordinária do dia 18/09/2018 à sua solicitação de alteração de modelo animal (raça Doberman pela raça Yorkshire), Projeto de Pesquisa “Ocorrência da mutação SNP c.-22G>A no gene da melanophilina responsável pela alopecia por diluição de cor em cães” – Pesquisadora Responsável: Mariana Isa Poci Palumbo. (Processo 23104.008784/2016-27) – Protocolo 822/2016.

Sendo o que se apresenta para o momento.

Atenciosamente,

Joice Stein

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/UFMS



Documento assinado eletronicamente por **Joice Stein, Professor do Magisterio Superior**, em 21/09/2018, às 10:41, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

783 **Normas para Publicação – Arquivo Brasileiro De Medicina**
784 **Veterinária E Zootecnia**

785

786 **Preparação dos textos para publicação**

787 Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma
788 impessoal.

789

790 **Formatação do texto**

791 O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo,
792 deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main
793 Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior,
794 direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no
795 espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do
796 título às referências), com linhas numeradas.

797 Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo,
798 devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte
799 ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

800

801 **Seções de um artigo**

802 **Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo
803 e não ultrapassar 50 palavras.

804 **Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do
805 título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail
806 para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title
807 Page” (Step 6), em arquivo Word.

808 **Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro
809 contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não
810 acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos,

811 citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma
812 informação completa.

813 **Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco e no mínimo duas*.

814 * na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar
815 tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do
816 idioma em que o artigo for submetido.

817 **Introdução:** Explanação concisa na qual os problemas serão
818 estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho.
819 Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

820 **Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido,
821 a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já
822 publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos
823 geneticamente modificados deverão constar obrigatoriamente o número do
824 Certificado de Aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

825 **Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

826 **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas.
827 Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título
828 da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem
829 em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida
830 como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando
831 referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em
832 espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho
833 aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o
834 seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do
835 texto de preferência após a sua primeira citação.

836 **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos:
837 desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe
838 inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo
839 arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e
840 do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1,
841 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem

842 também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado,
843 anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras
844 devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a
845 sua primeira citação.

846 Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter,
847 abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e
848 a correspondente referência deve figurar nas Referências.

849 **Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As
850 seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo
851 do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

852 **Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa
853 executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura,
854 discussão, repetição de resultados e especulações.

855 **Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente
856 expressados.

857 **Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem
858 alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e
859 internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo
860 possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas
861 gerais da ABNT, adaptadas para o ABMVZ, conforme exemplos:

862

863 **Como referenciar:**

864 **1. Citações no texto**

865 A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar
866 interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

867 - autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou
868 Anuário... (1987/88);

869 - dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);

870 - mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979);

871 - mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al.
872 (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em
873 ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do
874 mesmo ano.

875 - Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se
876 consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se
877 reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o
878 sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de
879 publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e
880 ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a
881 fonte consultada.

882 - Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação
883 coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da
884 Instituição à qual o autor é vinculado.

885

886 **2. Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores
887 citar três autores et al.):

888 - ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

889 - FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on
890 immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10,
891 1979.

892 - HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al.
893 Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

894

895 **3. Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro
896 autores citar três autores et al.):

897 - DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA,
898 1967. 981p.

899 - LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de
900 ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
901 MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São
902 Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

903 - MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed).
904 Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

905 - NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National
906 Academy of Sciences, 1968. 69p.

907 - SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de
908 carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação
909 (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária,
910 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

911

912 **4. Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos. Acima de
913 quatro autores citar três autores et al.):

914 - QUALITY food from animals for a global market. Washington:
915 Association of American Veterinary Medical College, 1995.
916 Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27
917 abr. 2000.

918 - JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative,
919 organized. Miami Herald, 1994. Disponível em:
920 <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>.
921 Acessado em: 5 dez. 1994.

922