

REGINA CELY BENÍCIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES OVINAS NATIVAS DO
ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Norma Ribeiro

Co-orientadores: Dra. Maria Aparecida Cassiano Lara – Pesquisadora do Instituto de Zootecnia
– Nova Odessa – São Paulo

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

Prof.^a Dra. Lúcia Helena de Albuquerque Brasil

UFRPE - RECIFE

FEVEREIRO/2007

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

Silva, Regina Cely Benício da.

Caracterização genética de populações ovinas nativas do nordeste brasileiro. Estudo de polimorfismos protéicos e microssatélites. / Regina Cely Benício da Silva. – 2007.

92 f.: il., tabs.

Orientador: Maria Norma Ribeiro

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia.

Inclui bibliografia em anexo.

CDD 636.39

1. Produção Animal
 2. Raças: Morada Nova, Cariri e Dorper
 3. Grupos Genéticos: Cara Curta e Barriga Negra
 4. Conservação
 5. Caracterização genética
 6. Polimorfismo protéico
 7. Microssatélites
 8. Focalização isoelétrica
 9. Eletroforese convencional
 10. Paraíba PB
- I. Ribeiro, Maria Norma
II. Título

BIOGRAFIA

Regina Cely Benício da Silva nasceu em 29 de maio de 1978, em Palmares – PE. Em agosto de 1998, iniciou o curso de Zootecnia na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, concluindo-o em novembro de 2003. Durante a graduação foi bolsista do Programa de Iniciação Científica – CNPq. Em março de 2005, foi selecionada para realizar o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção de Ruminantes, da UFRPE e, concluído em fevereiro de 2007.

A Deus por tudo o que Ele fez e faz na minha vida.

A minha mãe Socorro, por seu amor, sua dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida, a pessoa que mais contribuiu para a minha formação.

A minha irmã Marystella, minha sobrinha Larissa e todos os meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo sempre.

Ao meu namorado, Rinaldo, pela compreensão, paciência, incentivo e por estar tão presente em minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele não somos nada. Agradeço pela saúde, pela fé e pela força para vencer mais uma etapa da minha caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização deste Curso e por todo o aprendizado adquirido durante a graduação e o mestrado; A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao criador Manoel Dantas Vilar (Dr. Manelito) e a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A (EMEPA), pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

A Carla pela receptividade nas fazendas e pela ajuda durante a coleta do material.

À professora Maria Norma Ribeiro, pela amizade, apoio e orientação para a realização deste trabalho.

Ao professor Manoel Adrião Gomes Filho, por sua amizade e empenho no desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa-SP, pelo apoio e por permitir parte do desenvolvimento da pesquisa. Especialmente a pesquisadora Maria Aparecida Cassiano Lara, pela amizade, paciência, cuidados, orientação e empenho no desenvolvimento do trabalho e aos funcionários Aides e Sílvia.

As minhas amigas Marli e Cida, por me apoiarem nos momentos difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia Nicácio e Cristina.

À professora Lúcia Helena de Albuquerque Brasil, pelo incentivo. A todos os professores do Departamento de Zootecnia.

A Jânio e Danúsio por me ajudarem com o transporte na coleta do material.

A Núbia pela ajuda na coleta de sangue e no laboratório.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) da UFRPE, que me ajudaram em parte do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos de Areia – PB, pela amizade, pelos momentos de descontração que foram únicos, adoro vocês. Aos amigos Júlio César e Laura pelo companheirismo sempre.

A minha mãe, a pessoa que mais admiro no mundo, por todo o incentivo e dedicação, sempre com um conselho ou com palavras animadoras.

Aos meus familiares pela força que me deram em todos os momentos da minha vida e ao meu namorado pela força, incentivo e dedicação.

A todos os meus colegas da Pós-graduação, a todos os professores e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse esta etapa de minha vida.

“Com o passar dos anos, aprendemos que um sorriso representa muito mais que mil palavras; que os verdadeiros amigos são aqueles que se fazem presentes nos momentos em que mais precisamos; que a vida, muitas vezes, nos apresenta caminhos íngremes e subversos, porém a vista ao chegar ao topo é maravilhosa; que muitas vezes os caminhos mais fáceis não são os que obteremos mais sucessos e que a glória da conquista é sentida por poucos, pois são esses poucos que sabem lidar com as dificuldades encontradas durante o percurso.”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

Resumo	13
Abstract	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Classificação dos ovinos	17
2.2. Domesticação e evolução dos ovinos	17
2.3. Origem dos ovinos no Brasil	17
2.4. Descrição dos grupos estudados	18
2.4.1. Barriga Negra	18
2.4.2. Cara Curta (Cabugi)	19
2.4.3. Cariri	21
2.4.4. Morada Nova (Jaguaribe)	21
2.4.5. Dorper	22
2.5. Marcadores Moleculares e Genéticos	23
2.6. Polimorfismos Protéicos	25
2.6.1. Albumina (Alb)	26
2.6.2. Transferrina (Tf)	27
2.6.3. Enzima Málica (EM)	28
2.6.4. Peptidase-B (Pep-B)	28
2.6.5. Fosfogliconato desidrogenase (PGD)	29
2.6.6. Diaforase (DIA)	29
2.6.7. Hemoglobina (Hb)	30
2.7. Microssatélites	32
2.7.1. Microssatélite OarCP 20	33
2.7.2. Microssatélite UWCA 46	33
2.7.3. Microssatélite BM1824	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Coleta das amostras	35
3.2. Conservação das amostras	35

3.3. Extração de DNA	36
3.4. Proteínas	37
3.4.1. Tratamento das amostras	37
3.4.2. Métodos de Separação	38
3.4.2.1. Focalização isoeletrica	38
3.4.2.1.1. Albumina (Alb)	39
3.4.2.1.2. Transferrina (Tf)	40
3.4.2.2. Eletroforese	41
3.4.2.2.1. Preparo do gel de Penetrose	41
3.4.2.2.2. Tampões de Cuba e Gel	41
3.4.3. Coloração e revelação da atividade enzimática	43
3.5. Microssatélites	44
3.5.1. Amplificação de DNA	44
3.5.2. Separação dos fragmentos de DNA amplificados	48
3.5.2.1. Preparo de placas para o gel	48
3.5.2.2. Eletroforese	49
3.5.2.3. Revelação do Gel	50
3.6. Análises estatísticas dos dados	51
3.6.1. Estimativa da Variação Genética	51
3.6.2. Estimativas das frequências gênicas e genotípicas	52
3.6.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	52
3.6.4. Índices de Diversidade	52
3.6.5. Análise da diversidade em populações subdivididas	53
3.7. Relações Genéticas	54
3.7.1. Estimativas de distâncias genéticas entre as populações	54
3.7.2. Análise de Grupamento (Clusters)	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Análises de proteínas	57
4.1.1. Albumina (Alb)	57
4.1.2. Transferrina (Tf)	57
4.1.3. Enzima Málica (EM)	60

4.1.4. Peptidase-B (Pep-B)	62
4.1.5. Fosfogliconato Desidrogenase (PGD)	62
4.1.6. Diaforase-I (DIA-I) e Diaforase-II (DIA-II)	64
4.1.7. Hemoglobina (Hb)	66
4.2. Análises de microssatélites	68
4.2.1. OarCP20	68
4.2.2. UWCA46	69
4.2.3. BM1824	71
4.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	72
4.4. Índice de Diversidade	75
4.5. Análise da diversidade em populações subdivididas	81
4.6. Estimativa da distância genética	83
4.7. Análise de Grupamento (Clusters)	84
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Resumo

Um total de 290 ovinos das raças Morada Nova (MN), Cariri (Ca) e Dorper (D) e dos grupos genéticos Cara Curta (CC) e Barriga Negra (BN), do estado da Paraíba, foi investigado visando quantificar a variabilidade genética inter e intra-populacional, através de polimorfismos de proteínas e microssatélites. As amostras sanguíneas foram coletadas ao acaso e o plasma usado nas análises de focalização isoelétrica da albumina (Alb) e transferrina (Tf); os eritrócitos, para análises da enzima málica (EM), peptidase-B (Pep-B), fosfogliconato desidrogenase (PGD), diaforase I e II (Dia-I e Dia-II) e hemoglobina (Hb) por eletroforese convencional e, os leucócitos foram usados nas análises de DNA. Os resultados obtidos revelaram que 73% dos locos investigados foram polimórficos. Os locos da albumina (Alb), peptidase-B (Pep-B) e diaforase-II (DIA-II) foram monomórficos. O conjunto de marcadores investigados neste trabalho foi eficiente e pode ser considerado muito informativo para a identificação e investigação de paternidade nos estudos de grupos genéticos. Com base nos valores de G_{ST} , os locos EM, Tf, DIA-I e Hb, foram os que mais contribuíram nas estimativas de diferenciação entre as cinco populações. Tais resultados mostram que apesar de existir técnicas mais avançadas, os polimorfismos de proteínas continuam apresentando informações úteis nos estudos de caracterização genética. O dendrograma construído a partir das distâncias genéticas com base nos cinco locos de proteínas e três microssatélites estruturou as cinco populações, apresentando dois *clusters* principais: um agrupando as quatro raças nativas e, o outro, a raça exótica. Dentre as raças nativas, Morada Nova e Cara Curta foram as que apresentaram as maiores similaridades. Os animais Barriga Negra e Cariri apesar de compartilharem o mesmo *cluster* encontram-se distantes entre si e das demais populações nativas e da raça Dorper, sugerindo pertencer a grupos distintos.

Abstract

A total of 290 sheep of breed Morada Nova (MN), Cariri (Ca), Dorper (D) and Cara Curta (CC) and Barriga Negra (BN) genetic groups of Paraíba State it was investigated to quantify the genetic variability inter and intra-population through protein polymorphisms and microsatellite. The blood samples were collected and the plasma used in the analyses of isoelectric focusing of the albumin (Alb) and transferrin (Tf); the erythrocytes to analyse malic enzyme (EM), peptidase-B (Pep-B), fosfogliconato desidrogenase (PGD), diaforase I and II (DIA-I and DIA-II) and hemoglobin (Hb) by conventional eletroforese and the leucocytes were used in DNA analyses. The results showed that 73% of the investigated loci were polymorphic. The albumin (Alb), Peptidase-B (Pep-B) and diaforase-II (DIA-II) loci were monomorphic. The markers investigated in this work were efficient and could be considered very informative for the identification and investigation of paternity of the studied genetic groups. Based on G_{ST} values, the EM, Tf, DIA-I and Hb loci had the most contribution in differentiation among the five populations. In spite of many more advanced techniques, the protein polymorphisms present useful information in genetic characterization studies. The dendrogram built starting from the genetic distances with base in the five loci of proteins and three microsatellites structured the five populations, presenting two main clusters: one containing the four native breeds and another with the exotic breed. Morada Nova and Cara Curta breeds presented the largest genetic similarity. The Barriga Negra and Cariri groups in spite of they share the same cluster they are distant to each other native groups and Dorper breed, suggesting they belong to different groups.

1. INTRODUÇÃO

A evolução das raças ovinas tem sido moldada pelo homem ao longo de várias gerações. As rotas migratórias das populações humanas teriam inicialmente promovido a expansão do ovino doméstico e o seu estabelecimento nas mais diversas regiões. Muitas raças evoluíram, tendo-se adaptado ao clima, às doenças e condições nutricionais locais existentes.

A variação genética é uma condição fundamental para que haja evolução adaptativa, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, convergindo esta variação entre populações e, finalmente, para a variação entre espécies. Desta forma, a análise genética de populações nativas tem sido muito importante, pois revela a quantidade de variabilidade genética potencial de uma população.

É perceptível a importância econômica e social da produção de ovinos nas diversas regiões semi-áridas do mundo (DEVENDRA, 1998), não sendo diferente no Nordeste brasileiro onde as condições edafo-climáticas dificultam a exploração agrícola. No Brasil a ovinocultura tem despertado amplo interesse dos criadores, evidenciado pelo aumento no efetivo dos rebanhos e pelo número de propriedades envolvidas, em decorrência da elevada demanda de carne e peles ovinas (MEDEIROS, 2006).

A variabilidade entre as raças pode ser mantida por isolamento geográfico o qual, em populações razoavelmente numerosas não afeta a variação individual dentro da população (CARVALHO, 2000). Por outro lado, a redução do número de elementos da população conduz, por efeito de deriva genética e aumento de endogamia, a uma redução desta variação que, no limite, leva à uniformidade genética por fixação aleatória de vários alelos.

Assim, preservar a variabilidade genética de todo e qualquer genótipo é fundamental para a conservação e seu potencial uso no futuro. As raças locais têm capacidade de sobreviverem e de reproduzirem em condições difíceis e possuem grande aptidão para

aumentar a produção, sem perder adaptações locais mediante a realização de apropriados programas de seleção (HALL e BRADLEY, 1995). Ao contrário, raças altamente selecionadas só atingem elevada performance em condições ótimas de nutrição e adequada assistência técnica.

Os resultados obtidos através de estudos de caracterização genética são fundamentais para o conhecimento da história evolutiva de raças domésticas além de que contribuem para o planejamento de programas de manejo, conservação e melhoramento genético. Dessa forma, as análises de polimorfismos protéicos e DNA têm sido consideradas fundamentais, uma vez que podem revelar os níveis de variabilidade existente dentro e entre populações, auxiliando programas de conservação e melhoramento genético.

Dessa forma os objetivos do presente estudo foram:

1. Estimar a variabilidade genética intra e inter populacional em quatro grupos raciais nativos: Barriga Negra, Cara Curta, Cariri, Morada Nova e raça exótica Dorper com o emprego de polimorfismos de proteínas e microssatélites.
2. Otimizar a técnica de focalização isoelétrica para a análise da transferrina.
3. Padronizar as técnicas de análises dos microssatélites OarCP20, UWCA46 e BM1824 visando o seu emprego na investigação de paternidade e concretização dos objetivos do presente estudo.
4. Avaliar o grau de diferenciação genética entre as cinco populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação dos ovinos

Os ovinos pertencem ao Sub Reino Vertebrata, Classe Mammalia, Ordem Ungulata, Sub Ordem Artiodactyla, Grupo Ruminantia, Família Bovidae, Sub Família Ovinae, Gênero Ovis e Espécie Aries (PÍFFERO, 2007).

De acordo com PÍFFERO (2007), a espécie Ovis aries originou-se nas zonas mais elevadas do centro da Ásia, irradiando-se para o sul da Europa e norte da América.

2.2. Domesticação e evolução dos ovinos

Segundo PÍFFERO (2007), o temperamento sociável dos carneiros, associado à sua indiscutível utilidade econômica, fez da domesticação da espécie uma das mais antigas da história da civilização, acreditando-se que tenha ocorrido a mais de 4.000 anos a.C., na Ásia Central. Ao longo do tempo, ocorreram adaptações ao clima, solo, disponibilidade de água, alimento e utilização econômica, de tal forma que hoje se estima mais de 1.400 raças de ovinos em todo o mundo.

Estas raças estão classificadas de acordo com as funções econômicas que desempenham, constituindo o segundo maior rebanho do mundo. A seleção para lã foi obtida durante o processo de domesticação: os ovinos primitivos apresentavam pelagem formada por dois tipos de fibras, uma de pêlos longos, grossos e ásperos e outra com pêlos finos, curtos e crespos. Com a evidencia da utilidade da lã sobre o pêlo, foi sendo realizada progressivamente à seleção para sua obtenção.

2.3. Origem dos ovinos no Brasil

A formação das raças e tipos nativos no país se deu a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses, franceses e holandeses por volta de 1535 (PORTER, 1996).

SILVA, R.C. B.

Esses animais se distribuíram por todo território brasileiro adaptando-se às condições ambientais e culturais da região (MARIANTE et al., 2000). Segundo MIRANDA DO VALE (1949), citado por OLIVEIRA (2004), as principais entradas de animais domésticos ocorreram em três pólos de colonização: São Vicente, em 1534; Recife, em 1535 e Salvador, em 1550. Desta forma, a pecuária se espalhou pelo interior, agreste e sertão do Brasil, exceto o litoral, que já era ocupado pela monocultura da cana de açúcar, atividade mais lucrativa. A criação de gado necessitava de muito espaço, além de que o gado causava estragos aos canaviais (MARCÍLIO, 1986).

A introdução de ovinos pode ser considerada elemento importante e essencial ao desenvolvimento rural naquela época. Além do importante papel no desenvolvimento de algumas cidades localizadas no semi-árido, através do comércio de pele trazido por Delmiro Golveia, que estabeleceu várias agências de compras em diferentes municípios, contribuindo para o incremento de atividade comercial em algumas cidades (MENEZES, 1969).

Dentre as raças ovinas, o presente trabalho investigou quatro nativas e uma exótica, as quais são descritas de maneira breve com o objetivo de mostrar um pouco de sua história, características raciais e aptidões.

2.4. Descrição dos grupos estudados

2.4.1. Barriga Negra

De acordo com SANTOS (2003) no período colonial, os holandeses depois de derrotados em Pernambuco abandonaram o Brasil em 1652 levando tudo que era possível carregar em seus navios (cana, madeira, armas, bovinos e ovinos deslançados) em destino à sua nova possessão que seria a Ilha de Barbados.

A partir dessa época começaram a surgir no semi-árido nordestino, ovinos que apresentavam barriga negra, embora jamais tenha sido documentado com esse nome.

No entanto, ovinos apresentando a barriga negra ainda continuam surgindo espontaneamente, por segregação, ovinos deslanados como Morada Nova, Santa Inês e até entre ovinos ancestrais como a raça Zebu. Apesar do nome *Barriga Negra* não ter sido registrado no passado, alguns exemplares com a mesma característica, denominados *Blackbelly* foram introduzidos no Brasil, pela Embrapa UEPAE de Roraima trazidos da Venezuela e Guianas, que mantém esse rebanho até então.

O rebanho estimado em mestiçagem é de 70.000 cabeças. Calcula-se que existam cerca de 20.000 cabeças classificadas como pura de origem (PO), as quais se encontram aptas para receberem Certificado de Fundação. Depois de reunidos 2.000 animais com Certificado de Fundação, poderão ser homologados num livro de Registro Genealógico, com alguns dados de desempenho funcional. A situação atual do rebanho é de expansão.



Figura 1. Animal do grupo genético Barriga Negra

2.4.2. Cara Curta (Cabugi)

A presença do Cabugi na região data de 1920. De acordo com SANTOS (2003), um criador da região de Zabelé, na fronteira entre Pernambuco e Paraíba, lembrava que o Cabugi era o primeiro a engordar e o último a emagrecer, ou seja, o cara-curta era o casamento perfeito entre ganho de peso e rusticidade.

Ocorrem com maior freqüência no Estado da Paraíba, nos municípios de Cabaceiras e São Sebastião de Umbuzeiro; no sertão do Cabugi e, na região de Pedro II, no Estado do Piauí.

Manoel Dantas Vilar Filho, criador, encontrou os ovinos Cara-Curtas, efetivamente, em 1993, na Exposição de Natal (RN). Posteriormente, em 1997, durante o “Grito da Seca”, evento realizado em Lajes (RN) havia dois currais lotados para venda. Em 1999 a Fazenda Carnaúba começou a criar sistematicamente, o Cara-Curta, dando-lhe o nome de Cabugi.

O rebanho estimado em mestiçagem é de 3.000 cabeças. Calcula-se que existam cerca de 1.000 cabeças classificadas como pura de origem (PO), as quais se encontram aptas para receberem o Certificado de Fundação. Depois de reunidos 1.000 animais com Certificado de Fundação, essa raça poderá ser homologada em livro de Registro Genealógico, com alguns dados de desempenho funcional. A situação atual do rebanho é de expansão.



Figura 2. Animal do grupo genético Cara Curta

2.4.3. Cariri

De acordo com SANTOS (2003), uma fêmea amarelada pariu dois borregos gêmeos com pelagem inédita, assemelhando-se ao padrão da cabra Caimbé, ou seja, com corpo negro, barriga branca e listras brancas na cara. O pai era um Barriga Negra proveniente da

SILVA, R.C. B.

Fazenda Caraça, em Taperoá (PB). Nascia assim a raça Cariri que nada mais é que uma segregação do Barriga Negra.

Posteriormente, na Expo Taperoá, de 1983, animais foram postos à venda ao criador Hortêncio Ribeiro (PE) e os acasalou com animais Morada Nova e Santa Inês, nascendo daí muitos animais Cariri, também na Paraíba.

Existem, portanto, dois grupamentos originais: o da Fazenda Carnaúba, produzido com animais segregados da raça Barriga Negra e o do criador Hortêncio Ribeiro, produzido a partir do Morada Nova e Santa Inês (acasalados com dois borregos Cariri).

O rebanho estimado em mestiçagem é de 10.000 cabeças. Calcula-se que existam cerca de 3.000 cabeças classificadas como sendo pura de origem (PO), as quais se encontram aptas para receberem um Certificado de Fundação. Depois de reunidos 2.000 animais com Certificado de Fundação, a raça poderá ser homologada em livro de Registro Genealógico, com alguns dados de desempenho funcional. A situação atual do rebanho é de expansão.



Figura 3. Animal da raça Cariri

2.4.4. Morada Nova (Jaguaribe)

De acordo com SANTOS (2003) o grupamento da raça Jaguaribe está diretamente relacionado com as raízes africanas e também portuguesas. A raça Morada Nova foi

descoberta pelo zootecnista Octávio Domingues, sendo considerada de pelagem vermelha, mocha em ambos os sexos, sem possibilidade de chifres, barba ou crina.

SANTOS (2003) cita que Octávio Domingues encontrou ovinos deslanados na cidade de Morada Nova. Posteriormente tentou descobrir a origem dos animais que povoaram o Vale do Jaguaribe (Ceará), onde está a cidade de Morada Nova, mas não encontrou. O criador João Roque de Macedo, observou o surgimento dessas ovelhas na Fazenda Favela de Pedro Carneiro, no município de Limoeiro do Norte (CE), por volta de 1902 e 1903.

O rebanho estimado em mestiçagem é de 3.000 cabeças. Calcula-se que existam cerca de 500.000 cabeças classificadas como pura de origem (PO), as quais se encontram aptas para receberem o Certificado de Fundação. Depois de reunidos 30.000 animais com o referido certificado, a raça poderá ser homologada, destacando dados de desempenho funcional. A situação atual do rebanho é de expansão.



Figura 4. Animal da raça Morada Nova

2.4.5. DORPER

De acordo com SANTOS (2003) a raça foi desenvolvida na década de 1930, visando a produção de carne com qualidade. Um dos melhores cruzamentos da raça exótica com ovelha adaptada foi entre o Dorset Horn e o Black Head Persian (cabeça negra da Pérsia). O

produto recebeu o nome de Dorper. Em 1946, a raça já estava pronta e ocupava um bom lugar na história e no mercado sul-africano.

O Dorper é considerado o segundo maior rebanho da África do Sul, com mais de 10 milhões de cabeças, representando mais de 30% do total de ovinos do país.

No Brasil, em 1995, o criador Mário Abreu da fazenda Columijuba localizada no Ceará, importou animais das raças Dorper e Black Head Persian do Canadá, e Sibe Greidanus, localizada no Paraná, importou animais Dorper da Holanda. No ano de 2000, para introduzir o Dorper no Brasil, a EMEPA-PB através da RAMSEN, uma central de transferência de embrião, introduziu cerca de 300 embriões de Dorper.



Figura 5. Animal da raça Dorper

2.5. Marcadores Moleculares e Genéticos

De acordo com FERREIRA e GATTAPAGLIA (1996), marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas e proteínas, ou um segmento específico de DNA, correspondente à regiões expressas ou não do genoma.

Nem todo marcador molecular pode ser considerado marcador genético, uma vez que é uma característica de herança Mendeliana, ou seja, transmitida entre as gerações. Portanto, é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser DNA, ou produto da

transcrição e tradução de uma seqüência de DNA, não implica em que se constitua em um marcador “genético”, como freqüentemente se supõe. Em geral, o princípio básico envolvido na obtenção e detecção de cada classe de marcador bioquímico ou DNA, consiste no emprego de análises de eletroforese.

Vários são os tipos de marcadores que podem ser utilizados para a quantificação da diversidade, tais como, os marcadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou moleculares.

As análises de marcadores genéticos, tais como grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos, permitem a caracterização da variabilidade intra e inter populacional, sendo ferramentas úteis nos estudos da caracterização e de relações genéticas entre raças (LIPPI e MORTARI, 2003).

A eletroforese de proteínas remonta à década de 60 e, até a bem poucos anos, era a técnica de análise genética mais utilizada. As metodologias de análise de DNA, desenvolvidas essencialmente nos últimos 15 anos, têm tido uma adesão e interesse crescentes. Contudo, apesar de serem os marcadores mais utilizados, não suplantaram definitivamente os métodos envolvendo proteínas. A rapidez no processamento das amostras, a economia de custos, a facilidade de execução das técnicas e, principalmente, a existência de base de dados significativa que permite estabelecer análises comparativas, são alguns dos aspectos que levaram à continuação da sua aplicação. Além disso, o conhecimento das mudanças evolutivas das proteínas tem sido muito importante, uma vez que são moléculas essenciais na construção de caracteres morfológicos e no desempenho de funções fisiológicas (NEI, 1987).

Um grande número de proteínas polimórficas têm sido descrito em ovinos, embora no Brasil seu emprego tenha sido muito restrito a provas de controle de parentesco de ovinos (LARA et al., 2004). Assim, o presente estudo foi conduzido visando uma melhor compreensão da estrutura genética das raças ovinas nativas através dos polimorfismos de

proteínas e DNA.

2.6. Polimorfismos Protéicos

Seja qual for o tipo de polimorfismo, que é transmitido entre as gerações segundo as leis básicas de herança de Mendel, trata-se de marcadores genéticos, uma vez que são caracteres inerentes ao material genético, constantes e permanentes, presentes no indivíduo durante toda a sua vida e que podem ser detectados mediante provas imunológicas ou bioquímicas, a partir de líquidos ou estruturas orgânicas do DNA (ZEPEDA, 2000).

Um determinado loco pode ser considerado polimórfico quando apresentar dois ou mais alelos com frequências superiores a 1%. O ideal seria aquele em que na amostra investigada houvesse pelo menos dois indivíduos heterozigotos, significando que no mínimo 2% dos membros da população fossem heterozigotos para um determinado loco (HARRIS, 1980), citado por LARA (1998).

Os polimorfismos de proteínas constituem sistemas promissores para a caracterização genética uma vez que podem revelar as modificações ocorridas na sequência codificadora do DNA, que alteram a estrutura ou carga da molécula, descrito por LARA (1998).

Em geral, variantes de proteínas apresentam herança monogênica de ação codominante, sendo possível identificação de indivíduos heterozigotos e inferência sobre os genótipos dos indivíduos a partir de seus respectivos fenótipos, que são visualizados no gel de eletroforese (ROCHA, 2005). Deste modo, através da escolha de certo número de proteínas, é possível estimar o número de alelos em uma população e as frequências com as quais eles ocorrem.

A migração diferencial de uma dada proteína, pela técnica da eletroforese, é dependente da composição dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas, que são os produtos primários especificados por alelos e que compõem as proteínas. Mudanças de bases

aminadas no DNA do gene estrutural podem resultar na substituição de um aminoácido e na formação de um polipeptídeo com carga ou configuração diferente. A proteína resultante, quando submetida à eletroforese, terá uma migração alterada, refletindo, portanto, a variabilidade no DNA correspondente ao gene estrutural. Embora nem todas as alterações na molécula de DNA sejam detectadas, tais como as substituições que não alteram a carga, ou aquelas no interior da molécula que não produzem mudanças em sua conformação, têm-se verificado que grande parte das alterações pode ser discriminada (LARA, 1998).

2.6.1. Albumina (Alb)

A albumina sérica é a proteína mais abundante no plasma dos mamíferos e apresenta uma estrutura monomérica, sendo responsável pela regulação osmótica, transporte de ácidos graxos, naftoquinona, bilirrubina, triptofano e outros componentes, além de servir de fonte de aminoácidos para tecidos periféricos (CARTER et al., 1989, citado por IGARASHI, 1997).

Nos mamíferos, o polimorfismo da albumina foi descrita em búfalos (SCHNEIDER et al., 1990), cavalos (STORMONT e SUZUKI, 1963; BOWLING e CLARK, 1988), coelhos (FERRAND e ROCHA, 1992), ovinos (ERHARDT e SIMIANER, 1993) e caprinos (ROCHA, 2005). Os primeiros estudos em ovinos, o polimorfismo da albumina, foi relatado por EFREMOV e BRAEND (1964), que analisaram amostras plasmáticas de ovinos de raças européias por eletroforese em gel de amido, pH 6,2. As variantes observadas estão sob o controle de um único loco, com quatro alelos codominante, denominados *F*, *S*, *V* e *W*, em ordem decrescente de mobilidade. Cada variante consiste de duas bandas, uma mais fraca e uma forte. Em carneiros Karacu foram detectados 10 fenótipos para a albumina, regidos por quatro alelos, designados *A*, *B*, *C* e *D*, onde provavelmente a nomenclatura utilizada se corresponda *F* a *A*, *S* a *B*, *V* a *C* e *W* a *D* (MARTINEZ, 1985).

MILLER e GEMEINER (1993) comparando o comportamento eletroforético da

albumina em amostras de diferentes espécies, observaram mobilidade muito semelhante entre as amostras de bovinos, caprinos e ovinos além de possuírem massa molecular e ponto isoelétrico (pI) muito semelhantes.

O loco desta proteína encontra-se no cromossomo 6 (BISHOP et al., 1994).

2.6.2. Transferrina (Tf)

A transferrina é uma β -globulina sérica com uma estrutura monomérica glicosilada. Tem como função o transporte de ferro para as células receptoras da medula e tecidos de estocagem, regulação e controle de absorção de ferro, proteção contra intoxicações férricas, tendo também evidências de atividade bacteriana, exercida através do seqüestro do ferro circulante, necessário ao desenvolvimento de muitos microorganismos (HENKES, 1992).

O sistema da transferrina tem sido muito investigado em animais domésticos devido a sua diversidade, salientando os estudos realizados em bovinos e bubalinos (DEL LAMA, 1992; LARA, 1998), em ovinos (HENKES, 1992; LARA et al., 2004), em suínos (KRISTJANSSON, 1963) e em caprinos (IGARASHI, 1997; ROCHA, 2005).

Os ovinos apresentam a mais extrema diversidade para a transferrina. Originalmente, ASHTON, (1958), citado por OGDEN, (1961), estudando soro de ovinos de raças inglesas, identificou cinco alelos (TF^A , TF^B , TF^C , TF^D e TF^E). Posteriormente ASHTON e FERGUSON, (1961), citados por OGDEN, (1961), estudando a raça Merino, identificaram mais cinco alelos (TF^F , TF^G , TF^H , TF^I e TF^K). Atualmente, foram detectados 17 alelos para o loco da TF para os ovinos e 12 alelos para os bovinos (LARSEN et al., 1992).

O estudo do polimorfismo da transferrina é muito importante, visto que pode haver relação entre o tipo de transferrina e características produtivas. ASHTON (1960) observou que o loco da transferrina em bovino está relacionado ao controle genético de produção de leite. Posteriormente, ASHTON et al. (1964) confirmaram isto quando observaram que animais com fenótipo TF D/D produziam mais leite, animais com fenótipo TF A/A

SILVA, R.C. B.

produziam menos leite e animais com fenótipo TF A/D produziam leite em quantidade intermediária. A natureza do efeito não é conhecida, possivelmente é devido ao aumento no tempo de lactação.

RAHMAN e KONUK (1976) relacionaram o loco da transferrina com ganho de peso em ovinos. Porém, PASDAR et al. (1976) não observaram a mesma relação. RASMUSEN e TUCKER (1973) relacionaram o loco da transferrina com reprodução. Ovelhas com fenótipo TF B/D parecem ter menos filhotes que ovelhas com outros fenótipos, aparentemente devido ao seu pobre desempenho reprodutivo quando cruzadas com carneiros de fenótipo TF B/C ou TF B/D.

O loco da transferrina encontra-se no cromossomo 1 (BISHOP et al., 1994).

2.6.3. Enzima Málica (EM)

A enzima málica também conhecida como malato desidrogenase NADP dependente, é uma oxido-redutase, responsável pela seguinte reação:



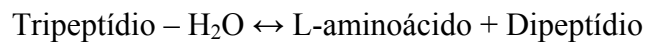
Em humanos, os locos autossômicos EM-S e EM-M codificam as variantes solúveis e mitocondriais, respectivamente (HARRIS e HOPKINSON, 1976). Na espécie ovina, o polimorfismo da EM tem sido observado apenas na variante solúvel, com a presença de dois alelos codominantes, denominados EM^S e EM^F (LARA et al., 2004).

Em caprinos, a variabilidade observada para o loco EM tem sido explicada pela existência de três alelos codominantes, denominados EM^A , EM^B e EM^C , cujos produtos apresentam mobilidades anódicas crescentes em gel de eletroforese (DEZA et al., 2000; MENRAD et al., 2002; ROCHA, 2005).

2.6.4. Peptidase-B (Pep-B)

A enzima peptidase-B também denominada tripeptidase é uma aminopeptidase que

hidrolisa ligações peptídicas, cujos produtos formados estão representados a seguir:



Essa enzima tem sido muito investigada em eritrócitos de bovinos, sendo informativa em estudos de caracterização genética de raças bovinas (DEL LAMA, 1991; LARA e CONTEL, 1997). Essa enzima hidrolisa principalmente o substrato L-leucilglicilglicina, cuja intensidade e especificidade permitem a identificação de suas variantes.

Em algumas raças bovinas especializadas européias o loco da Pep-B é considerado monomórfico e em raças zebuínas e nativas brasileiras esse loco é polimórfico (LARA e CONTEL, 1997), sendo detectados três alelos autossômicos codominantes, denominados *Pep-B¹*, *Pep-B²* e *Pep-B³*. IGARASHI (1997) e ROCHA (2005) estudando hemolisados de caprinos detectaram caráter monomórfico para esse loco, que segundo as autoras, há outras evidências que sugerem monomorfismo desta enzima para a espécie caprina. Em ovinos essa enzima foi pouco estudada (LARA et al., 2004), sendo esse loco descrito como monomórfico.

2.6.5. Fosfogliconato desidrogenase (PGD)

A enzima PGD é uma óxido redutase responsável pela descarboxilação oxidativa da Glicose-6-Fosfato (LARA et al., 1997) através da seguinte reação:



A variabilidade genética da PGD foi relatada nas espécies suína e eqüina. Para a espécie ovina, dois alelos foram detectados (LARA et al., 2004) em frequências muito pequenas (*PGD¹* e *PGD²*).

2.6.6. Diaforase (DIA)

A Diaforase é também conhecida como citocromo b5 redutase e metahemoglobina redutase que catalisa a seguinte reação:



Essa enzima faz parte do grupo que catalisam a redução da metahemoglobina. A diaforase é uma enzima monomérica, codificada por três locos autossômicos: DIA-I, DIA-II e DIA-III. As isoenzimas da diaforase ocorrem em todos os tecidos, sendo a DIA-I mais ativa que a DIA-II, enquanto a DIA-III apresenta maior atividade em tecidos do testículo, ovário e cérebro (HARRIS e HOPKINSON, 1976).

Em humanos, a investigação desta proteína tem sido intensa, já em outras espécies seu estudo é limitado (CEPICA e STRATIL, 1978). Em caprinos, MENRAD et al. (2002) e ROCHA (2005), observaram polimorfismo para o loco DIA-I, sendo detectado dois alelos codominantes. Resultados idênticos foram observados em ovinos. O polimorfismo para o loco DIA-I tem sido explicado pela presença de dois alelos codominantes, denominados ($DIA-I^F$ e $DIA-I^S$), que codificam DIA-I 1, DIA-I 1/2 e DIA-I 2 (CEPICA e STRATIL, 1978). Com relação ao loco DIA-II, ao nosso conhecimento não há relatos na literatura de polimorfismo para a espécie ovina, até o momento.

2.6.7. Hemoglobina (Hb)

A hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigênio dos pulmões para os tecidos. A sua estrutura é tetramérica, tendo cada uma das subunidades um grupo prostético, o heme, com um átomo de ferro no centro. A fração principal da hemoglobina de mamíferos é composta por duas cadeias α e duas cadeias β , que diferem entre si apenas na seqüência de aminoácidos (CECCHINI e NIJS, 1986).

A hemoglobina é uma das proteínas mais abundantes nos eritrócitos e de fácil detecção sendo, talvez por essa razão, tem sido a mais estudada (CARVALHO, 2000). Essa proteína foi a primeira a ser estudada por meio de eletroforese em gel de amido, apresentando variabilidade em caprinos (IGARASHI, 1997; ROCHA, 2005), ovinos (LARA et al., 2004), bovinos (LARA, 1998 e CARVALHO, 2000), coelho (FERRAND, 1995) e

macacos (SHIMIZU e TAKENAKA, 1991).

Dentre as proteínas eritrocitárias, a Hb é o sistema do qual se tem o maior volume de informações em ovinos, tanto no que se diz respeito à função, estrutura e caracterização das variantes, como sua distribuição em raças de todo o mundo. A cadeia α da Hb ovina normalmente é duplicada (VESTRI et al., 1980; VESTRI et al., 1981) havendo alguns casos em que se apresenta até mesmo quadruplicada (RANDO et al., 1986).

A primeira variação eletroforética da cadeia β da Hb de ovinos foi detectada por HARRIS e WARREN (1955) com o emprego da eletroforese. Atualmente, cinco alelos codominantes foram descritos para a espécie ovina, sendo Hb^A e Hb^B , os alelos mais freqüentes.

Na revisão apresentada por GRAY (1997) foram mencionados alguns estudos que sugerem que animais homozigotos para Hb^A sejam mais resistentes do que os homozigotos Hb^B , à infestação por helmintos, embora não sejam conclusivos tais resultados. Outros alelos da hemoglobina, denominados Hb^C e Hb^D vêm sendo detectados por eletroforese em géis de amido, pH alcalino (MARTINEZ, 1985). A hemoglobina Hb-C é geralmente encontrada em eritrócitos de carneiros de fenótipos Hb-A ou Hb-B, com idade ao redor de 2 a 12 semanas e, ainda, em animais adultos com acentuado grau de anemia, enquanto que a variante Hb-D, em carneiros adultos, mas em freqüências raras (VASKOV e EFREMOV, 1967). As análises eletroforéticas da hemoglobina realizadas por KILGOUR et al. (1990) detectaram duas novas variantes, denominadas Hb-G e HB-H, empregando-se a técnica de focalização isoelétrica, pH 6,7 - 7,7. O polimorfismo observado foi explicado como sendo decorrente de variações na seqüência nucleotídica da β cadeia, que estariam sob o mesmo controle genético das variantes comuns (Hb-A e Hb-B).

O loco da hemoglobina encontra-se no cromossomo 15 (NGUYEN e BUNCH, 1980).

2.7. Microssatélites

Os microssatélites são polimorfismos que envolvem variações detectadas ao nível de seqüências nucleotídicas do DNA, sendo constituídos por pequenas repetições em ordem de 2 a 6 pares de bases (CARVALHO, 2000).

Estes marcadores estão dispersos por todo o genoma, muitas vezes exibindo em elevado grau de polimorfismo, ou seja, substanciais variações no número de repetições. As unidades de repetição mais bem estudadas são as repetições de dinucleótdeos $(CA)_n$ e $(GT)_n$, sendo também as mais abundantes no genoma de mamíferos (MACHUGH, 1996). As diferenças no número de repetições podem ser fielmente distinguidas através da sua amplificação pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica consiste na síntese de numerosas cópias de um fragmento específico de DNA a partir da cadeia de DNA alvo, utilizando para tal a enzima DNA polimerase e duas seqüências de oligonucleotideos – iniciadores (*primers*). A PCR permite a obtenção de resultados precisos, rápidos e econômicos, mesmo a partir de pequenas amostras de material biológico.

O padrão do tamanho do fragmento é bastante variável de indivíduo para indivíduo (exceto para gêmeos verdadeiros), mas aparentemente estável de um tecido para o outro no mesmo indivíduo (JEFREYS et al., 1985).

A natureza de seu polimorfismo é atribuída a erros ocorridos durante o processo de replicação do DNA e que resultaram, provavelmente, de um imperfeito emparelhamento da cadeia dupla de DNA durante a fase de replicação (TAUTZ e SCHLÖTTERER, 1994).

Os microssatélites apresentam, em geral, elevado polimorfismo e encontram-se amplamente distribuído no genoma, sendo os marcadores genéticos de eleição para uma variedade de propósitos, tais como: mapeamento genômico, análise populacional, seleção animal assistida, controle de parentesco e filiação individual e populacional (CARVALHO, 2000).

2.7.1. Microsatélite OarCP 20

O microsatélite OarCP20 é específico para ovinos, encontra-se localizado no cromossomo 21 (CRAWFORD et al., 1995), sendo clonado por EDE e CRAWFORD (1995), cujos *primers* têm as seguintes seqüências:

Forward: GATCCCCTGGAGGAGGAAACGG; Reverse: GGCATTTTCATGGCTTTAGCAGG.

Há vários estudos sobre caracterização de raças ovinas utilizando este microsatélite, o número de alelos descritos varia bastante. Ao estudar ovinos das raças Merino e Churra na Espanha ZAMORANO et al. (1998), descreveram 7 alelos. Já TOMASCO (2002) descreveu 9 alelos em ovinos no Uruguai. Por outro lado LOZANO et al. (2002), descreveram 11 alelos em ovinos da raça Talaverana na Espanha e MOIOLI et al., (2006), descreveram 9 alelos.

2.7.2. Microsatélite UWCA 46

O microsatélite UWCA 46 encontra-se localizado no cromossomo 1. Esse microsatélite foi clonado por SUN et al. (1995), cujos *primers* têm as seguintes seqüências:

Forward: CCATTTCTCTGTTGGTAACTGC; Reverse: CTCTCACAGGTGGGGTC.

Foram descritos 10 alelos para bovinos (SUN et al., 1995). Em estudos de caracterização genética da raça zebuína no Brasil LARA et al. (2005), descreveram 11 alelos para este marcador.

Em ovinos, ao nosso conhecimento, não há relatos na literatura do uso deste microsatélite, até o momento.

2.7.3. Microsatélite BM1824

O microsatélite BM 1824 encontra-se localizado no cromossomo 1, bem próximo a transferrina. Este microsatélite foi clonado por BISHOP et al. (1994), cujos *primers* tem as seguintes seqüências:

SILVA, R.C. B.

Forward: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC e Reverse: CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG.

Foram descritos 8 alelos para bovinos (BISHOP et al., 1994). ZAMORANO et al. (1998), descreveram 4 alelos estudando populações bovinas da raça Berrenda em Negro. LARA et al. (2005), estudando raças zebuínas no Brasil, descreveram 7 alelos para este microssatélite.

O BM 1824 também é marcador para raças ovinas, tendo a mesma seqüência de *primer* e a mesma localização, no cromossomo 1 (CRAWFORD et al., 1995). MARTÍNEZ et al. (2005), descreveram 4 alelos em ovinos da raça Palmera na Espanha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

Para o presente estudo, foram investigadas 290 amostras sanguíneas de ovinos, provenientes de cinco rebanhos do estado da Paraíba, representando dois grupos raciais: Barriga Negra (BN) e Cara Curta (CC) e três raças: Cariri (Ca), Dorper (D) e Morada Nova (MN). O critério adotado para a escolha dos animais foi o mais casual possível, visando uma amostra bem representativa de cada população.

As coletas sanguíneas dos animais da raça Dorper foram realizadas na Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A (EMEPA), localizada no município de Soledade – PB. As amostras sanguíneas dos grupos raciais e das demais raças foram provenientes de rebanhos localizados no município de Taperoá – PB (Tabela 1).

Tabela 1. Populações estudadas de acordo com a raça ou grupo racial, número de rebanhos (Nr), número de indivíduos, propriedade e procedência

População	Nr	N	Propriedade	Procedência
Barriga Negra	1	60	Fazenda Pau Leite	Taperoá - PB
Cara Curta	1	60	Fazenda Carnaúba	Taperoá - PB
Cariri	1	60	Fazenda Pau Leite	Taperoá - PB
Dorper	1	50	EMEPA	Soledade - PB
Morada Nova	1	60	Fazenda Carnaúba	Taperoá - PB

3.2. Conservação das amostras

Cerca de 4 mL de sangue, obtido por punção na veia jugular do animal, foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA a 10% (ácido etileno diamino tetracético), como anticoagulante. O sangue total foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, à

SILVA, R.C. B.

temperatura ambiente, obtendo-se três fases: plasma, leucócitos e hemácias. O plasma foi aspirado com auxílio de pipeta Pasteur e transferido para tubos *ependorf*, devidamente identificados.

As células sanguíneas foram lavadas, por três vezes, em solução salina contendo 0,9% de NaCl em água destilada. O sobrenadante foi descartado após centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. Os leucócitos foram transferidos para tubos *ependorf*, devidamente identificados para posterior extração de DNA, enquanto que os eritrócitos foram diluídos em volume idêntico de tampão citrato tri-sódico, pH 7,1, contendo glicerol na concentração de 40%. Estes procedimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

As amostras de plasma, leucócitos e hemácias foram estocadas a -18°C , para posteriores análises no Laboratório de Genética do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução, localizado em Nova Odessa, SP, pertencente ao Instituto de Zootecnia/Apta/Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, empregando a metodologia de MANIATIS et al. (1989), com algumas modificações, cujo protocolo encontra-se descrito a seguir:

1- 50 μL da amostra de leucócito, 50 μL de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8,0) e 100 μL de fenol equilibrado pH 8,0. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em um vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C .

2 - Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* devidamente identificado. A este tubo, foram adicionados 50 μL de fenol e 50 μL de

SILVA, R.C. B.

clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em um vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

3 - O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* devidamente identificado onde foi adicionado 100µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em um vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

4 - Em um novo tubo *ependorf* devidamente identificado, foi adicionado 10µL de acetato de amônio 3M + 100µL do sobrenadante do tubo anterior (onde se encontravam os DNAs) + 100µL de isopropanol. A mistura foi feita em 1 minuto e incubada por 30 minutos no freezer. Após incubação, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos.

5 - O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 500µL de etanol 70% e do centrifugado a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

6 - O etanol 70% foi descartado e o *pellet* mantido em temperatura ambiente, ou em estufa a no máximo 50°C para secar.

7 - Ao *pellet* foi acrescentado cerca de 50µL de água ultra-pura ou tampão TE (Tris-EDTA pH 8,0).

3.4. PROTEÍNAS

3.4.1. Tratamento das amostras

Para o estudo da albumina, as amostras de plasma foram diluídas em água destilada na proporção de 1:70 (690µL de água + 10µL de plasma).

Para o estudo da transferrina, as amostras plasmáticas foram diluídas em solução de sulfato de amônio férrico 0,15% em citrato de sódio 0,06 M (na proporção de 20 µL plasma para 50µL de solução) e incubadas à temperatura ambiente. Após 18 horas, as amostras foram parcialmente purificadas, adicionando-se 100µL de rivanol 0,6% em tampão Tris/HCl

SILVA, R.C. B.

0,05M (ajusta-se o pH para 9,1 com Tris 1M), sendo mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida centrifugadas por três minutos a 13.000 rpm, na temperatura de 4°C. A finalidade deste tratamento foi a saturação da molécula transferrina, uma vez que o conteúdo em ferro é também responsável pela variação do comportamento da transferrina.

Para as análises das enzimas EM, Pep-B, PGD e Hb, os hemolisados foram obtidos adicionando-se 20µL de mercaptoetanol 2% para 50µL de eritrócitos.

Para as análises da diaforase I e II, os hemolisados foram obtidos diluindo-se os eritrócitos em água destilada na proporção de 1:1 (50µL de água destilada para 50µL de eritrócitos).

Cada amostra obtida foi absorvida em pedaços de papel filtro (Whatman nº. 3), com dimensões de 4 x 4 mm (para as enzimas EM, Pep-B, PGD, HB, DIA-I e II), (para géis de penetrose), e dimensões de 2 x 3 mm (para as enzimas Alb e Tf), (para géis de poliacrilamida), e em seguida esses papéis eram inseridos verticalmente no gel.

3.4.2. Métodos de Separação

As proteínas plasmáticas (albumina e transferrina) foram investigadas pela técnica de focalização isoeétrica; as proteínas eritrocitárias (EM, Pep-B, PGD, DIA-I e DIA-II) por eletroforese convencional. Já a hemoglobina foi investigada utilizando-se as duas técnicas: focalização isoeétrica e eletroforese convencional.

3.4.2.1. Focalização isoeétrica

Gel de Poliacrilamida

A confecção do gel para as análises de focalização isoeétrica foi realizada de acordo

com a proteína estudada (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Após o preparo da solução, a mistura foi então injetada, com auxílio de seringa contendo agulha fina, entre dois filmes de poliéster, que se encontravam aderidos a duas placas de vidro separadas por um espaçador (2 mm). Este conjunto foi fixado com grampos de aço na borda inferior e nas laterais. Após a polimerização do gel, os grampos foram retirados, o gel contido entre as placas foi envolto em filme de PVC e levado para a geladeira, permanecendo por no mínimo 12 horas.

3.4.2.1.1. Albumina (Alb)

A separação da albumina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CARVALHO (2000). A composição da solução de polimerização e os parâmetros elétricos utilizados na focalização isoeletrica estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Solução de polimerização utilizada na separação da Alb por focalização isoeletrica

Componentes do gel de poliacrilamida	Quantidade
Uréia	6,24 g
Água purificada	6,975 mL
Acrilamida 40% e Bis 3%	1,625 mL
Anfólito pH 5,0 – 6,0 (Pharmacia)	250 µL
Anfólito pH 5,0 – 8,0 (Pharmacia)	250 µL
Anfólito pH 6,0 – 8,0 (Pharmacia)	125 µL
TEMED	22 µL
PSA (7,5 mg/ml)	650 µL

Tabela 3. Parâmetros elétricos utilizados na separação da Alb por focalização isoeletrica

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo
Pré – focalização	1500	25	1	30 min
			2	15 min
			3	15 min
Focalização	2000	25	4	3 horas
			5	30 min

As soluções eletrolíticas empregadas foram o ácido aspártico 0,04M (ânodo) e o hidróxido de sódio (NaOH) 1M (cátodo).

3.4.2.1.2. Transferrina (Tf)

Para a separação da transferrina foi utilizada a mesma metodologia empregada nas análises de focalização isoeletrica da transferrina bovina (LARA et al., 2005). As tabelas 4 e 5 apresentam a composição da solução de polimerização e os parâmetros elétricos utilizados na separação da Tf na focalização isoeletrica.

Tabela 4. Solução de polimerização utilizada na separação da Tf por focalização isoeletrica

Componentes do gel de poliacrilamida	Quantidades
Uréia	14,40 mL
Água purificada	0,890 mL
Acrilamida 40% e Bis 3%	1,625 mL
Anfólito pH 3,0 – 10,0 (Pharmacia)	126 µL
Anfólito pH 40 – 6,5 (Pharmacia)	83 µL
Anfólito 5,0 – 7,0 (Pharmacia)	165 µL
TEMED	22 µL
PSA (7,5 mg/ml)	650 µL

Tabela 5. Parâmetros elétricos utilizados na focalização isoeletrica da Tf

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo
Pré-focalização	1500	25	1	30 min
	1500	25	2	15 min
	1500	25	3	15 min
Focalização	2500	25	5	1 hora
	2500	25	7	1 hora
	2500	25	9	1 hora

As soluções eletrolíticas empregadas foram o ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1M (ânodo) e o hidróxido de sódio (NaOH) 0,75M (cátodo).

3.4.2.2. Eletroforese

3.4.2.2.1. Preparo do gel de Penetrose

O amido de milho, denominado Penetrose, foi empregado na concentração de 14% (VAL et al., 1981) em tampão específico. O cozimento do gel foi feito manualmente, em forno microondas, até total liquefação, quando então foi vertido sobre uma placa de vidro (13 cm x 20 cm) contendo protetores laterais, sem a retirada de ar, permanecendo na temperatura ambiente até completa solidificação do gel. Após 30 minutos, o gel foi coberto com plástico e levado à refrigeração até momentos antes da aplicação das amostras.

3.4.2.2.2. Tampões de Cuba e Gel

Para as análises de eletroforeses convencionais da EM, Pep-B, PGD, HB, DIA-I e DIA-II, foram utilizados três sistemas de tampões:

A) Tampão TBE, pH 8,6

Cuba: tampão Tris / Borato / EDTA (0,9 M em tris, 0,5 M em ácido bórico e 0,02 M em EDTA), pH 8,6, diluído 1:7, (142,86 ml de tampão para 857 ml de água destilada).

Gel: TBE diluído 1:10 (100 ml do tampão da cuba para 900 ml de água destilada).

B) Tampão Citrato / Fosfato, pH 5,9

Cuba: tampão Citrato / Fosfato (0,15 M em ácido cítrico, 0,245 M em fosfato de sódio monobásico NaH_2PO_4 , sendo o pH ajustado com NaOH para 5,9).

Gel: tampão da cuba diluído 1:40 (25 ml do tampão da cuba para 1 l de água destilada).

C) Tampão Tris / Citrato

Cuba: tampão Tris / Citrato (0,42 M em tris e 0,063 M em ácido cítrico), pH 8,6.

Gel: Tris / Citrato (0,005 M em tris e 0,015 M em ácido cítrico), pH 7,2.

As condições eletroforéticas estão descritas na tabela 6. Após o período de migração (Tabela 6), os géis de penetrose foram cortados no sentido horizontal, com auxílio de fio de nylon e, sobre as superfícies internas, foram realizadas colorações específicas, permitindo, na maioria, a revelação de mais de uma proteína, simultaneamente. Durante as revelações das atividades enzimáticas, todos os géis foram incubados a 37°C no escuro por aproximadamente uma hora.

Tabela 6. Condições eletroforéticas e substratos utilizados para a determinação dos fenótipos das diferentes proteínas

Proteína	Gel	Tampão	Migração eletroforética		Substrato/ Revelador
			Condições	Duração (horas)	
EM	Penetrose	A	40 V no gel	17	Ácido Málico
Hb	Penetrose	A	40 V no gel	17	-----
Pep-B	Penetrose	B	40 V no gel	17	Leucilglicil- glicina
PGD	Penetrose	B	40 V no gel	17	6- Fosfogliconato
DIA-I e II	Penetrose	C	30 V no gel	21	NADH / DCIP

A = Tampão TBE, pH 8,6.

B = Tampão Citrato / Fosfato, pH 5,9 (LARA, 1998).

C = Tampão Tris / Citrato.

3.4.3. Coloração e revelação da atividade enzimática

A revelação das atividades enzimáticas foi realizada segundo técnicas histoquímicas amplamente conhecidas, empregando-se substratos específicos descritos em HARRIS e HOPKINSON (1976). Os detalhes de cada reação são apresentados a seguir.

A detecção da Alb foi realizada mediante a coloração geral de proteínas, que é descrita da seguinte forma: coloração do gel durante 5 a 10 minutos numa solução de Coomassie Blue (PhastGel Blue R-Pharmacia) 0,115% dissolvido em ácido acético, etanol e água destilada (4:25:71) na temperatura de 60°C. O contraste desejado foi obtido através de sucessivas descolorações numa solução idêntica de ácido acético, etanol e água destilada, também aquecida a cerca de 60°C.

A detecção da Tf foi realizada mediante a mesma coloração utilizada para a Alb.

Para a revelação da atividade da enzima málica, a mistura da reação continha 50 mg de ácido málico dissolvido em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0; 1,5 mL de cloreto de magnésio 0,2M; 0,5 mL NADP (5 mg/mL); 0,5 mL de MTT (5 mg/mL); 0,05 mL de PMS (5 mg/mL); 12,5 mL de ágar 2% em água destilada, dissolvido sob aquecimento. Esta mistura foi vertida sobre a superfície do gel e mantida a 37°C. Após 40 a 60 minutos, os fenótipos da EM foram identificados com o aparecimento de bandas azul-escuras, decorrentes da redução do metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) para Formazan.

Para a revelação da atividade enzimática da Pep-B, foi empregada uma mistura de reação, que continha 15 mg do tripeptídeo L-Leucilglicil-Glicina; 15 mL de tampão fosfato 0,2M, pH 7,5; 0,5 mL de cloreto de magnésio 0,2M; 70 µL de solução de veneno de *Crotalus* sp (20 mg/mL); 150 µL de solução de peroxidase (6 mg/mL); 250 µL de ortodianizidina (25 mg/mL) 0,08M e 12,5 mL de ágar 2% em água destilada, dissolvido sob aquecimento. Esta mistura foi vertida sobre a outra parte homóloga do gel, preparado para a PGD, sendo incubado a 37°C, após 40 a 60 minutos, os fenótipos da Pep-B foram identificados com o aparecimento de bandas alaranjadas.

Para a detecção da PGD, foi utilizada a parte homóloga do gel preparado para Pep-B. As regiões de atividade da fosfogliconato desidrogenase foram visualizadas empregando-se uma mistura de reação composta por 15 mg de ácido 6-fosfoglicônico; 10 mL de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,0; 5,0 mL de cloreto de magnésio 0,2M; 1 mL de solução NADP (5 mg/mL); 1 mL de solução MTT (5 mg/mL); 1 mL de solução PMS (5 mg/mL) e 12,5 mL de ágar 2% em água destilada, dissolvido sob aquecimento. A mistura foi vertida sobre o gel e, após 30 minutos de incubação à temperatura de 37°C, os fenótipos foram determinados com o aparecimento de bandas azul-escuras, decorrentes da redução do metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) para Formazan.

Para a revelação da atividade das enzimas DIA-I e DIA-II, a mistura de reação continha 10 mg de NADH dissolvido em 15 mL de tampão Tris-HCl 0,025M, pH 8,5; 350 µL de dichlorophenol indophenol – DCIP (2 mg/mL); 500 µL de MTT (5 mg/mL) e 12,5 mL de ágar 2% em água destilada, dissolvido sob aquecimento. Esta mistura foi vertida sobre uma das partes do gel, sendo incubado a 37°C até o aparecimento de bandas azuis escuras.

Para a detecção da HB não foi necessária qualquer reação, sendo estas visualizadas logo após a sua migração eletroforética.

3.5. MICROSSATÉLITES

3.5.1. Amplificação de DNA

O sucesso de uma boa amplificação advém da otimização das condições de amplificação para cada caso específico, uma vez que não existe um protocolo ótimo para todos os propósitos dado que a especificidade de cada PCR depende de vários fatores, da temperatura e tempo de duração de cada uma das fases do ciclo, número de ciclos, da Taq

polimerase, das concentrações de MgCl₂ e dNTPs (deoxinucleótídeos trifosfato), da constituição e concentração dos primers e das características dos termocicladores.

No presente estudo foram investigados três microssatélites, denominados OarCP20, UWCA46 e BM1824.

A amplificação foi realizada através da técnica de reação em cadeia polimerase (PCR), com ajuda de um termociclador (Express - Hybaid). A técnica consiste fundamentalmente em três passos:

- Desnaturação, que permite a separação das duas cadeias de DNA;
- Hibridação, que conduz à ligação dos primers ao molde de DNA;
- Extensão, que corresponde à síntese de novos fragmentos de DNA pela polimerase do DNA.

Na tabela 7 encontra-se descrita a solução utilizada na amplificação de DNA para o OARCP20.

Tabela 7. Solução utilizada na amplificação de DNA através da técnica PCR para o OarCP20

Componentes da Reação		Mix (μ L)	[] ou volume por amostra
Estoque	H ₂ O	8,94	Concentração final (15 μ L de reação)
10x	Tampão	1,5	1x
50 mM	MgCl	0,451	1,5 mM
20 mM	DNTP	0,15	0,2 mM
2,5 μ M	Prime	0,9	0,15 μ M
5 U/ μ L	Taq	0,06	0,5 unidade

Após o preparo da solução de amplificação, foram distribuídos 12 μ L do Mix por tubo e, em seguida, adicionado 3 μ L do DNA (conforme concentração).

Na tabela 8, encontra-se descrito os tempos utilizados e temperaturas para o PCR do OarCP20 e, na figura 6, sua ilustração.

Tabela 8. Programa empregado na PCR para o microssatélite OarCP20

Fase do PCR	Temperatura	Tempo (min)	Nº. de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1:30	1 ciclo
Desnaturação	94°C	0:30	
Hibridação	63°C	0:45	32 ciclos
Extensão	72°C	1:00	
Extensão Final	72°C	5:00	1 ciclo

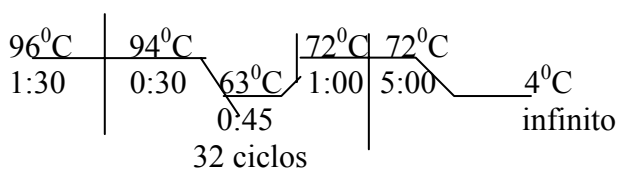


Figura 6. Ilustração do programa de amplificação do OarCP20

A solução de amplificação de DNA para o microssatélite UWCA46 está apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Solução utilizada na amplificação de DNA através da técnica PCR para o UWCA46

Componentes da Reação		Mix (µL)	[] ou volume por amostra
Estoque	H ₂ O	8,64	Concentração final (12µL de reação)
10x	Tampão	1,5	1x
50 mM	MgCl	0,2	1,5 mM
20mM	dNTP	0,15	0,2 mM
2,5 µM	Prime	1,2	0,2 µM
5 U/ µL	Taq	0,06	0,5 unidade

Após o preparo da solução foram distribuídos 12 μ L do Mix por tubo e, em seguida, adicionados 3 μ L do DNA (conforme concentração).

Na tabela 10, encontra-se descrito os tempos utilizados e temperaturas para o PCR do UWCA46 e, na figura 7, sua ilustração.

Tabela 10. Programa empregado na PCR para o microssatélite UWCA46

Fase do PCR	Temperatura	Tempo (min)	N°. de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1:30	1 ciclo
Desnaturação	94°C	0:15	10 ciclos
	70°C	0:30	
Desnaturação	94°C	0:30	35 ciclos
Hibridação	60°C	0:30	
Extensão	72°C	0:30	
Extensão Final	72°C	0:10	1 ciclo

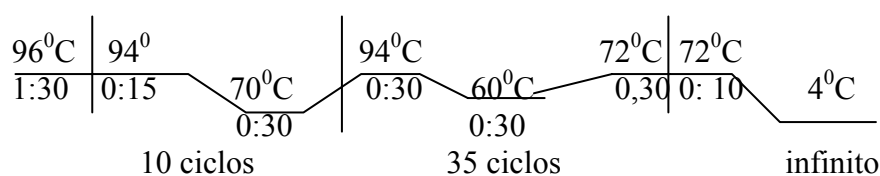


Figura 7. Ilustração do programa de amplificação do UWCA46

A mistura de amplificação de DNA para o BM1824 está apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Solução utilizada na amplificação de DNA através da técnica PCR para o BM1824

Componentes da Reação		Mix (μ L)	[] ou volume por amostra
Estoque	H ₂ O	8,94	Concentração final (12 μ L de reação)
10x	Tampão	1,5	1x
50 mM	MgCl	0,45	1,5 mM
20mM	DNTP	0,15	0,2 mM
2,5 μ M	Prime	0,9	0,15 μ M
5 U/ μ L	Taq	0,061	0,5 unidade

Após o preparo da solução foram distribuídos 12µL do mix por tubo e, em seguida, adicionados 3 µL do DNA (conforme concentração).

Na tabela 12, encontram-se descritos o tempo e a temperatura empregada em cada ciclo da PCR para o microssatélite BM1824 e, na figura 8, sua ilustração.

Tabela 12. Programa empregado na PCR para o microssatélite BM1824

Fase do PCR	Temperatura	Tempo (min)	Nº. de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1:30	1 ciclo
Desnaturação	94°C	0:15	10 ciclos
	69°C	0:30	
Desnaturação	94°C	0:30	35 ciclos
Hibridação	59°C	0:30	
Extensão	72°C	0:30	
Extensão Final	72°C	0:10	1 ciclo

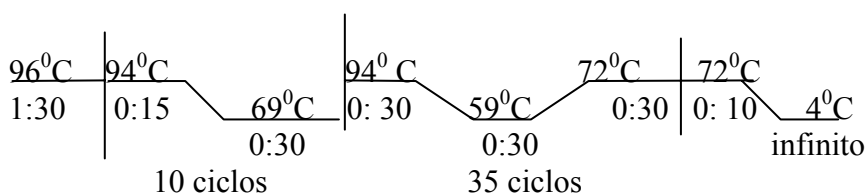


Figura 8. Ilustração do programa de amplificação do BM1824

3.5.2. Separação dos fragmentos de DNA amplificados

3.5.2.1. Preparo de placas para o gel

O jogo de placas foi colocado em solução NaOH 1 N por no mínimo 2 horas, sendo lavado com detergente, enxaguado em água corrente e esfregado com auxílio de uma esponja. Após a lavagem, foi mantido em água destilada por no mínimo 30 minutos.

Para o preparo da placa maior do gel, foram realizados os seguintes procedimentos:

(1) limpar a placa com álcool 70%; (2) preparar a solução de Bind-Silane (1mL de Etanol

absoluto, 5 μ L de ácido acético glacial e 1 μ L de Bind-Silane; (3) aplicar a solução de Bind-Silane com uma pipeta Pasteur sobre a placa e (4) espalhar com papel toalha, umedecido em etanol, sobre toda a superfície em um único sentido, respeitando a parte do pente, que não deverá receber a solução; (5) deixar secar por 30 minutos e colocar o espaçador nas laterais da placa.

Para o preparo da placa menor do gel, foram realizados os seguintes procedimentos: (1) limpeza da placa com álcool 70%; (2) aplicação de 1mL de Repel – Silane, (3) espalhou-se com papel toalha umedecido em etanol ao longo de toda a superfície da placa; (4) deixou-se secar por 10 minutos. Após preparadas, juntou-se as 2 placas e apertou-se com auxílio de garras.

3.5.2.2. Eletroforese

A separação dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada em cubas verticais empregando gel de poliacrilamida desnaturante a 6%. As soluções de polimerização encontram-se descritas na tabela 13. Utilizou-se uma potência de 65W até o aquecimento das placas a 50⁰C de maneira a permitir a manutenção das condições de desnaturação das amostras. Após o aquecimento, as amostras de DNA foram aplicadas, sendo a potência diminuída para 60W.

Tabela 13. Solução de polimerização

Gel 6% desnaturante	Quantidade
Acrilamida 40%	10,69 mL
Bisacrilamida 2%	11,25 mL
Água purificada	25,50 mL
Uréia	31,5 g
Tampão TBE 10X	3,75 mL
Persulfato de sódio 10% (0,1g/ml)	50 μ L
Temed	50 μ L

Após amplificação por PCR, 15µL de cada amostra, foram misturados com 4 µL de uma solução desnaturante (9,5 mL de Formamida; 0,4 mL de EDTA 0,5 M pH 7,5; 0,005 g de Xileno Cianol e 0,005 g de Bromofenol blue), desnaturados a 94°C durante 10 minutos em termociclador ou banho seco, sendo imediatamente conservados em gelo até a sua aplicação no gel, gelo visando a manutenção das fitas abertas de DNA. O tempo de migração dos fragmentos amplificados é proporcional ao tamanho dos alelos em cada microsatélite. Assim, o tempo de migração para o OarCP20, cuja amplitude alélica é de cerca de 73-85pb, foi de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, para UWCA46 (128-160pb), 2 horas e 10 minutos e, para BM 1824 (159-175pb), 3 horas e 30 minutos. A solução tampão empregada na cuba de eletroforese foi o TBE 0,5X.

3.5.2.3. Revelação do Gel

Os fragmentos amplificados foram revelados mediante coloração por nitrato de prata, empregando-se as seguintes soluções:

A) Solução Fixadora 10% → 150 mL de álcool etílico; 150 mL de ácido acético glacial e completou a solução para 1,5 litro com água purificada.

B) Solução de Oxidação → 23,20 mL de ácido nítrico; completando a solução para 1,5 litro com água purificada.

C) Solução de Impregnação de Prata → 2 g de nitrato de prata; dissolver em água ultra-pura completando para 1,5 litro com água purificada. Adicionou-se 2mL de formaldeído no momento da revelação.

D) Solução de Revelação → 14,84 g de carbonato de sódio anidro PA; dissolvendo em água ultra-pura e completando para 2 litros com água purificada. Essa solução foi mantida em refrigeração e, no momento da revelação, foi adicionado 2,6 mL de formaldeído e 10 mL de tiosulfato de sódio (200mg/L).

Para a revelação, o gel foi incubado em solução fixadora por 20 minutos sob agitação constante. Essa solução foi reservada para ser utilizada no final do processo. O gel foi então transferido para outra bandeja contendo água purificada, lavado durante 20 segundos por três vezes e, transferido para outra bandeja contendo solução de oxidação (B) e incubado por 3 minutos sob agitação constante.

Em seguida, o gel foi transferido para bandeja com água purificada, lavado durante 20 segundos por três vezes, transferido a outra bandeja, contendo solução de nitrato de prata (C) e 2 mL de formaldeído e, incubado por 30 minutos (escuro) sob agitação constante. O gel mais uma vez foi transferido para a bandeja de água purificada, lavado durante 20 segundos por três vezes e colocado em outra bandeja, onde foi adicionada a solução de revelação (D) contendo 2,6 mL de formaldeído e 10 mL de tiosulfato de sódio (200 mg/L). Nessa fase, o gel foi agitado manualmente até o aparecimento das bandas, sendo em seguida fixado (A) por cinco minutos e, deixado em temperatura ambiente para secagem.

3.6. Análises estatísticas dos dados

3.6.1. Estimativa da Variação Genética

A variação genética foi estimada a partir das frequências genotípicas e gênicas e, dos índices de diversidade (percentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, proporção de alelos observados em relação aos descritos para a espécie, heterozigosidade média e conteúdo de informação polimórfica) para cada população. As estimativas de frequências genotípicas e gênicas foram comparadas entre as populações e também entre estas dentro de cada população. O equilíbrio genético segundo o teorema de Hardy-Weinberg também foi verificado para as populações.

3.6.2. Estimativas das frequências gênicas e genotípicas

Os locos de proteínas e DNA investigados apresentaram alelos codominantes que permitiram inferir os genótipos a partir dos seus respectivos fenótipos. As frequências genotípicas e gênicas foram estimadas pelos programas GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e CERVUS (versão 2.0) de MARSHALL et al. (1998), que permitiram caracterizar a variabilidade genética entre as cinco populações. O programa GENEPOP foi também utilizado para verificar diferenciação genotípica e gênica entre as cinco populações, pelo teste exato de Fisher.

3.6.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio Hardy-Weinberg foi verificado através do programa GENEPOP, empregando-se o algoritmo de LOUIS e DEMPTERS (1987), gerando três análises simultaneamente, com diferentes zonas de rejeição para a hipótese nula (H_0 : união ao acaso de gametas). Assim no teste geral (sub-opção 3), o valor p corresponde à soma de todas as probabilidades, podendo esta ser igual ou inferior às obtidas nas sub-opções 1 e 2. Estas últimas permitiram a verificação das seguintes hipóteses alternativas (H_1): excesso e déficit de heterozigotos, cujas probabilidades são consideradas mais poderosas do que a anterior (LARA, 1998). Os resultados obtidos permitiram verificar o excesso e déficit de heterozigotos, estimar os valores de F_{IS} com base na metodologia de WEIR e COCKERHAM (1984) para todas as populações e locos investigados. Este programa também permitiu estimar a significância total, com base em todos os locos investigados por população, empregando o teste exato de Fisher com probabilidade combinada.

3.6.4. Índices de Diversidade

Na literatura, a diversidade genética é geralmente descrita ao nível de população ou de unidade de amostra equivalente e depois comparada entre populações. No presente

estudo foram utilizadas diversas medidas, tais como: porcentagem de locos polimórficos (P%), número de alelos por loco polimórfico (Ap), proporção de alelos contidos em cada população (PA) e heterozigosidade média observada (Ho) e esperada (He), além do índice de fixação (F), aplicando-se as seguintes fórmulas :

$P = n^{\circ} \text{ de locos polimórficos} / n^{\circ} \text{ total de locos investigados};$

$A_p = n^{\circ} \text{ total de alelos dos locos polimórficos} / n^{\circ} \text{ de locos polimórficos};$

$P_A = n^{\circ} \text{ de alelos da população} / n^{\circ} \text{ total de alelos descritos para a população};$

$F = (H_e - H_o) / H_e$

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) e as probabilidades de exclusão para cada marcador e para o conjunto dos locos investigados foram estimados pelo programa CERVUS 2.0 (MARSHALL et al., 1998), visando conhecer a eficiência do conjunto de marcadores na investigação de paternidade para as cinco populações investigadas. A metodologia adotada para o cálculo das probabilidades de exclusão foi de JAMIESON (1994), contida no programa CERVUS 2.0.

3.6.5. Análise da diversidade em populações subdivididas

Esta análise foi realizada segundo NEI (1973) cuja metodologia permitiu a partição hierárquica da diversidade total (H_T) em seus componentes entre (D_{ST}) e dentro (H_S) das populações investigadas. Assim com base nas estimativas de freqüências gênicas de oito sistemas protéicos e empregando-se o programa DISPAN (KUMAR et al., 1993). Os estimadores para H_T , H_S , D_{ST} e G_{ST} são descritos em NEI (1987), em que:

$$\hat{H}_S = 2n(1 - \sum_k X_k^2) / 2n - 1$$

$$\hat{H}_T = 1 - \sum_i X_i^2 + \hat{H}_S / 2ns$$

onde:

n = número de indivíduos amostrados;

s = número de subpopulações;

SILVA, R.C. B.

X_i = média ponderada da frequência do alelo k nas subpopulações e;

$\Sigma_i X_i^2$ = média do somatório da frequência gênica elevada ao quadrado entre as subpopulações.

sendo:

$$\hat{H}_T = H_S + D_{ST}$$

e

$$G_{ST} = D_{ST} / \hat{H}_T$$

onde:

G_{ST} = proporção da diversidade genética, que é atribuída ao componente entre populações.

3.7. Relações Genéticas

3.7.1. Estimativas de distâncias genéticas entre as populações

As distâncias genéticas foram calculadas com base nas frequências gênicas estabelecidas para os oito locos, empregando o programa DISPAN (KUMAR et al., 1993). Este programa estabeleceu duas matrizes diferentes: as das distâncias genéticas padronizadas (D_A) e das distâncias genéticas corrigidas (D_S), de acordo com a metodologia de NEI (1972 e 1978).

O método de NEI (1972) utiliza as diferenças das frequências gênicas para estimar o número médio das diferenças de códons por loco. Esta medida de NEI está fundamentada na identidade dos genes nas populações que estão sendo comparadas, podendo ser calculada da seguinte forma:

$$D = -\ln \hat{I}$$

$$\hat{I} = \hat{J}_{XY} / \sqrt{\hat{J}_X \hat{J}_Y}$$

onde:

SILVA, R.C. B.

J_X = é a probabilidade de identidade de dois alelos tirados ao acaso na população X;

J_Y = é a probabilidade de identidade de dois alelos tirados ao acaso na população Y;

J_{XY} = é a probabilidade de identidade de dois alelos tirados ao acaso em cada uma das populações X e Y.

Para n locos, os valores de J_X , J_Y e J_{XY} podem ser estabelecidos pela média aritmética de todos os valores individuais, como segue:

$$\hat{J}_X = \sum X_i^2 / n \quad \hat{J}_Y = \sum Y_i^2 / n \quad \hat{J}_{XY} = \sum X_i Y_i / n$$

onde:

X_i = é a frequência gênica do i-ésimo alelo na população X,

Y_i = é a frequência gênica do i-ésimo alelo na população Y e

n = o número total dos locos examinados.

No segundo método (NEI, 1978), as estimativas de distâncias genéticas foram corrigidas para pequenas amostras. Assim os respectivos valores de $\sum X_i^2$ e $\sum Y_i^2$ são substituídos por:

$$2n_X \cdot \sum X_i^2 - 1 / (2n_X - 1) \quad \text{e} \quad 2n_Y \cdot \sum Y_i^2 - 1 / (2n_Y - 1)$$

3.7.2. Análise de Grupamento (*Clusters*)

Esta análise está fundamentada numa matriz, na qual uma série de distâncias genéticas foi estabelecida para cada par de populações. No presente estudo os *clusters* foram determinados através de agrupamentos sucessivos de pares de taxa de acordo com o nível de similaridade genética, utilizando-se o programa DISPAN (KUMAR et al., 1993). Para o presente estudo foi adotada a metodologia de UPGMA para a construção do dendrograma a partir da matriz de distância genética padronizada (NEI, 1972).

A metodologia de ligação média ou UPGMA (do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) obedece os seguintes procedimentos MEYER, (1995), citado por LARA, (1998), o par de taxa mais semelhante é unido. Esse par fica separado por uma

SILVA, R.C. B.

distância idêntica ao valor que os separa na matriz de distâncias e um nó é posicionado no meio do caminho entre os dois. O par de taxa recém-unido passa a ser considerado um novo táxon (um táxon composto). A sua distância dos demais é calculada da seguinte forma: a distância entre um táxon composto e um indivíduo é a média aritmética das distâncias entre cada um dos taxa que compõem a unidade composta e o táxon em relação ao qual ele está sendo comparado. A menor distância na nova matriz determina quais taxa devem ser unidos. Novamente o nó é posicionado exatamente no meio do caminho entre os dois novos taxa. Este procedimento é repetido até que todos os taxa tenham sido incorporados, gerando um dendrograma no qual os ramos que partem de um mesmo nó apresentam necessariamente o mesmo comprimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises de proteínas

4.1.1. Albumina (Alb)

Não há na literatura relatos sobre análise de focalização isoeletrica da albumina ovina. Esta proteína apresentou duas bandas com migração anódica, sendo uma banda mais rápida com intensidade de coloração mais fraca e uma mais lenta de intensidade de coloração mais forte (Figura 9). Este padrão foi observado em todas as nossas amostras, caracterizando condição monomórfica para este loco. LARA et al., (2004) estudando raças ovinas no Brasil, encontraram resultados semelhantes ao presente trabalho, ratificando assim a consistência dos resultados aqui encontrados. Na literatura esse loco tem sido considerado monomórfico para a maioria das raças ovinas (HENKES et al., 1994), porém MORERA et al. (1983) encontraram polimorfismos da albumina em ovinos das raças Merino e Churro.

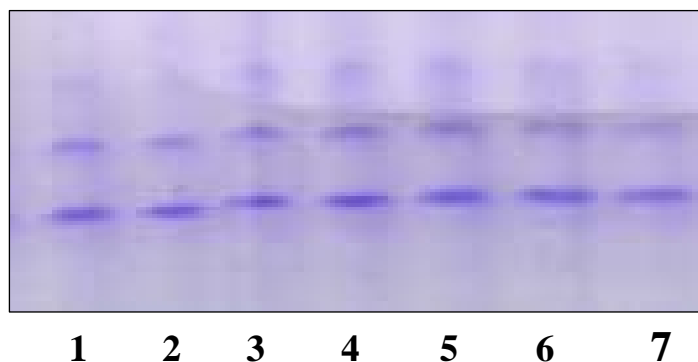


Figura 9. Perfil eletroforético da albumina ovina pela técnica de focalização isoeletrica, após coloração geral de proteínas. Amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7: fenótipo Alb A/A

4.1.2. Transferrina (Tf)

Foram observados quatro alelos codominantes, denominados Tf-1, Tf-2, Tf-3 e Tf-4 (Figura 10), na maioria das cinco raças ovinas. Esses alelos provavelmente correspondem aos alelos (Tf-A, Tf-B, Tf-C e Tf-D, respectivamente) encontrados em eletroforese

convencional. O perfil isoelétrico desta proteína está apresentado na figura 10. O homozigoto Tf 1/1 apresentou duas bandas mais anódicas, uma mais rápida e de intensidade mais fraca e outra lenta de intensidade de coloração mais forte; o Tf 2/2 apresentou também duas bandas, com migração menos anódica, uma de intensidade fraca e a outra de maior intensidade; o Tf 3/3 apresentou duas bandas com migração intermediária, sendo de migração menos anódica que o Tf 2/2; da mesma forma o homozigoto Tf 4/4 apresentou duas bandas, sendo estas de migração menos anódica que o Tf 3/3. Os heterozigotos, o Tf 1/2, Tf 1/3, Tf 1/4, Tf 2/3, Tf 2/4 e Tf 3/4 apresentaram quatro bandas, sendo duas com maior intensidade, cujas migrações correspondem às bandas intensas de seus respectivos homozigotos Tf 1/1, Tf 2/2, Tf 3/3 e Tf 4/4. Os padrões isoelétricos foram semelhantes aos achados por LARA et al. (2004).

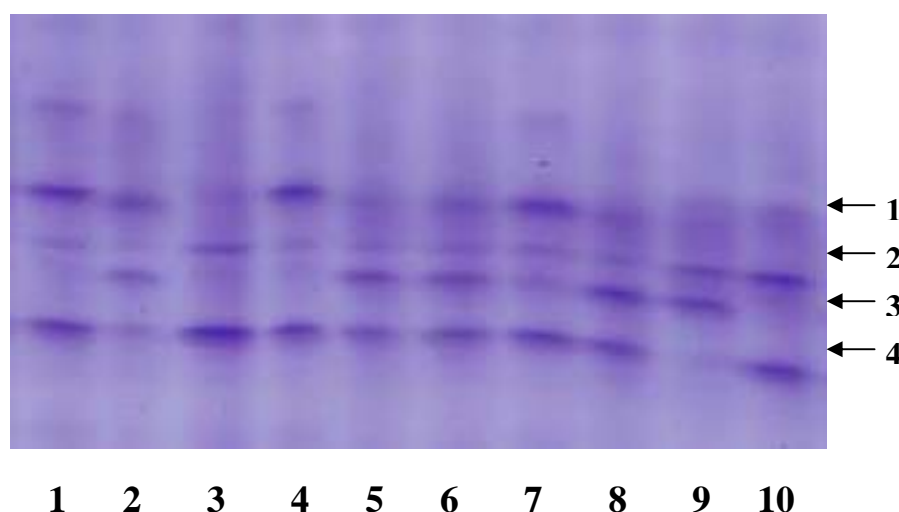


Figura 10. Perfil eletroforético das diferentes transferrinas (Tf). Amostras 1, 4 e 7: fenótipo Tf 1/4; amostra 2: fenótipo Tf 1/3; amostra 3: fenótipo Tf 4/4; amostras 5, 6 e 8: fenótipo Tf 3/4; amostra 9: fenótipo Tf 2/3 e amostra 10: fenótipo Tf 2/4

As estimativas de freqüências gênicas e genotípicas para as cinco populações investigadas estão apresentadas nas tabelas 14 e 15.

Observa-se na tabela 14, que o alelo Tf^4 foi o mais freqüente em todas as populações estudadas, variando de 0,28 (raça Dorper) a 0,90 (raça Cariri), cujos resultados diferem dos estimados para as raças Sulffolk, Ile de France, Poll Dorset, Santa Inês e ovinos cruzados,

encontrados por LARA et al. (2004) e dos estimados para a raça Crioula Lanada (HENKES et al., 1993). Nesses estudos, a transferrina havia sido investigada por eletroforese convencional, onde o alelo Tf^d foi o menos freqüentes em todas as populações avaliadas. Provavelmente o alelo Tf^d está fixado nessas populações nativas, sendo uma provável característica dos ovinos nativos. O alelo Tf^2 não foi detectado em ovinos da raça Cariri, cujas freqüências variaram de 0,03 (Barriga Negra) a 0,25 (raça Dorper), diferindo das estimadas anteriormente por LARA et al (2004) e HENKES et al. (1993). Isto pode ser explicado porque se trata de animais nativos e os animais investigados pelos autores são raças comerciais, com exceção da raça Santa Inês. Os alelos Tf^d e Tf^3 foram observados em todas as populações investigadas.

Tabela 14. Freqüências alélicas estimadas para o loco transferrina para as cinco populações ovinas investigadas

População	Alelos			
	Tf^d	Tf^2	Tf^3	Tf^d
Barriga Negra	0,21	0,03	0,06	0,70
Cara Curta	0,19	0,05	0,24	0,52
Cariri	0,07	0,00	0,03	0,90
Dorper	0,24	0,25	0,23	0,28
Morada Nova	0,30	0,13	0,09	0,48

Com relação às freqüências genotípicas, o genótipo Tf 3/3 foi observado apenas na raça Dorper. Este genótipo pode ser característico para essa raça. Como pode ser visto na tabela 15, os genótipos Tf 1/4, Tf 3/4 e Tf 4/4 foram os mais comuns na maioria das raças investigadas e, Tf 4/4, o mais freqüente na raça Cariri. O genótipo Tf 4/4 pode funcionar como marcador para a raça Cariri e para as demais raças nativas investigadas, uma vez que a freqüência desse genótipo foi alta em todas as populações nativas.

Tabela 15. Estimativa de freqüências genóticas para o loco transferrina para as cinco populações ovinas investigadas

População	Genótipos									
	Tf 1/1	Tf 1/2	Tf 1/3	Tf 1/4	Tf 2/2	Tf 2/3	Tf 2/4	Tf 3/3	Tf 3/4	Tf 4/4
Barriga Negra	0,038	0,019	0	0,327	0	0	0,038	0	0,115	0,463
Cara Curta	0,017	0,035	0,152	0,152	0	0,017	0,051	0	0,305*	0,271
Cariri	0	0	0	0,140	0	0	0	0	0,060	0,800*
Dorper	0,089	0,089	0,059	0,147	0,029	0,176	0,176	0,059	0,117	0,059
Morada Nova	0,086	0,086	0,052	0,293*	0,017	0,017	0,120	0	0,120	0,209

4.1.3. Enzima Málica (EM)

A atividade da enzima málica revelou três variantes, denominadas EM-F, EM-S e EM-FS (Figura 11), resultantes da presença de dois alelos codominantes: EM^F e EM^S , com mobilidades anódicas crescentes.

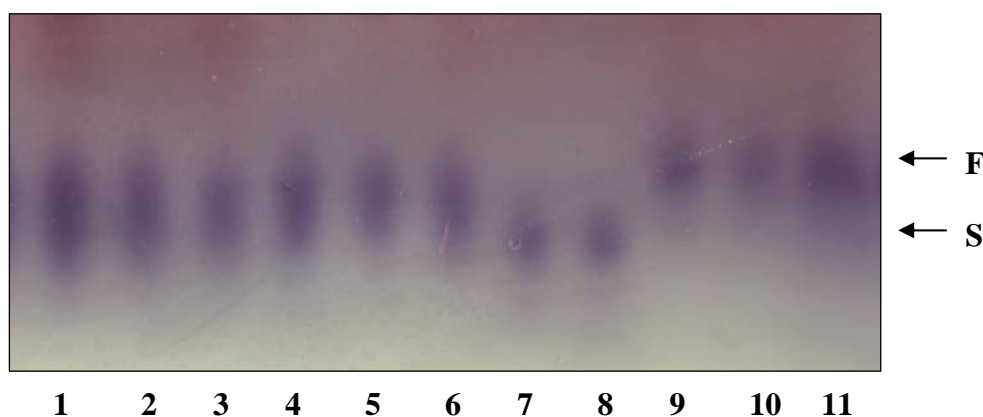


Figura 11. Perfil eletroforético da enzima málica. Amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6: fenótipo EM S/F; amostras 7 e 8: fenótipo EM S/S e amostras 9, 10 e 11: fenótipo EM F/F

As estimativas das freqüências gênicas e genóticas para o loco EM estão apresentadas nas tabelas 16 e 17.

Observa-se na tabela 16 que o alelo EM^F foi o mais freqüente em todos os rebanhos investigados, exceto para a raça Morada Nova, cujas freqüências tanto do alelo EM^S quanto do alelo EM^F foram iguais. As freqüências estimadas no presente estudo são similares às

reportadas por LARA et al. (2004), sugerindo que o alelo EM^F é mais freqüente nos ovinos em geral, ou seja, é característico da espécie ovina. A tabela 17 mostra que o genótipo EM-S/S não ocorreu nas raças Cariri e Dorper, em que a maioria dos animais foi caracterizada como homozigoto para o alelo (0,72 e 0,86, respectivamente), ou seja, genótipo EM-F/F, podendo o alelo EM^F ser marcador para essas duas raças. Nas populações Barriga Negra, Cara Curta e Morada Nova, o número de heterozigotos (EM-F/S) foi maior em relação aos homozigotos, mostrando haver provavelmente um equilíbrio entre os genótipos nessas populações.

Tabela 16. Freqüências alélicas estimadas para o loco enzima málica para as cinco populações investigadas

População	Alelos	
	EM^S	EM^F
Barriga Negra	0,40	0,60
Cara Curta	0,43	0,57
Cariri	0,14	0,86
Dorper	0,07	0,93
Morada Nova	0,50	0,50

Tabela 17. Estimativas de freqüências genótípicas para o loco enzima málica para as cinco populações ovinas investigadas

População	Genótipos		
	EM S/S	EM S/F	EM F/F
Barriga Negra	0,14	0,53	0,33
Cara Curta	0,183	0,483	0,334
Cariri	0	0,28	0,72
Dorper	0	0,14	0,86
Morada Nova	0,22	0,56	0,22

4.1.4. Peptidase-B (Pep-B)

A Pep-B apresentou duas bandas com migração anódica, sendo uma banda mais forte e uma mais fraca (Figura 12), com mobilidades eletroforéticas idênticas à enzima Pep-B 3/3 de bovinos Mantiqueira (LARA e CONTEL, 1997). Este padrão foi observado em todas as amostras, caracterizando condição monomórfica para este loco. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura, que apresenta dados sobre esta enzima em ovinos, LARA et al. (2004) não encontraram polimorfismo para o loco Pep-B, sugerindo a fixação do alelo *Pep-B*³ nas populações ovinas criadas no Brasil.

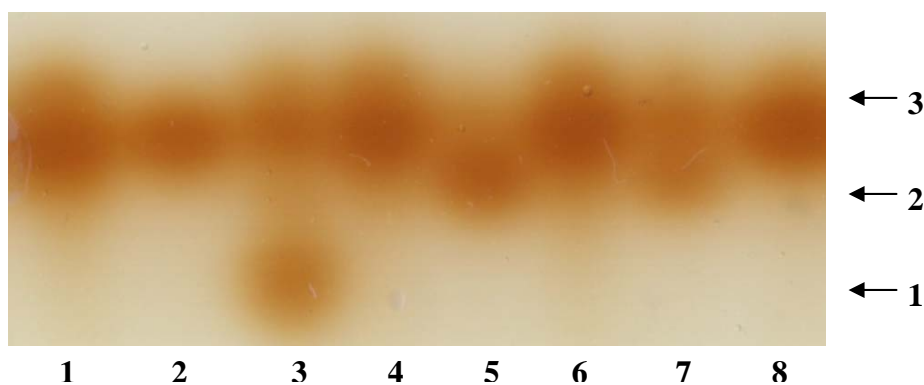


Figura 12. Perfil eletroforético da peptidase-B (Pep-B). Amostras 1, 2, 4, 6 e 8: fenótipo Pep-B 3/3; amostra 3: padrão bovino fenótipo Pep-B 1/3; amostra 5: padrão bovino fenótipo Pep-B 2/2 e amostra 7: padrão bovino fenótipo Pep-B 2/3

4.1.5. Fosfogliconato Desidrogenase (PGD)

O perfil eletroforético desta enzima está apresentado na figura 13. A atividade enzimática de PGD apresentou dois fenótipos, denominados PGD 1/1 e PGD 1/2, resultantes da presença de dois alelos codominantes: *PGD*¹ e *PGD*².

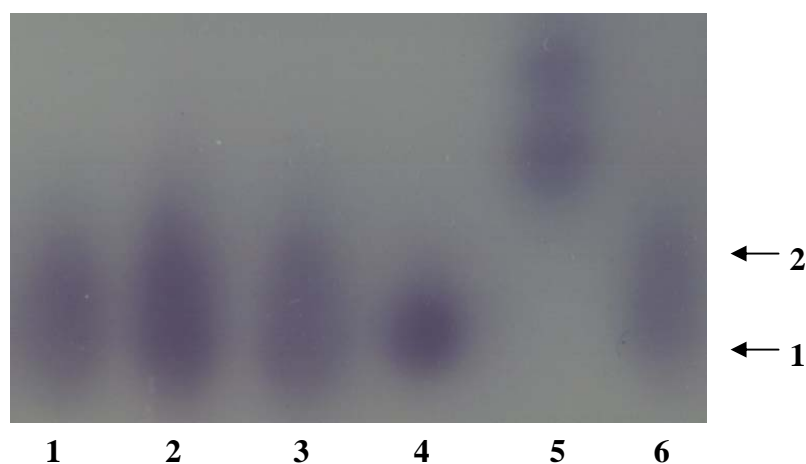


Figura 13. Perfil eletroforético da PGD. Amostras 1, 2 e 4: fenótipo PGD 1/1; amostras 3 e 6: fenótipo PGD 1/2 e amostra 5: padrão bovino fenótipo PGD 1/1

Nas tabelas 18 e 19 estão apresentadas às estimativas de freqüências gênicas e genotípicas para o loco PGD. O alelo PGD^1 foi o mais freqüente em todas as populações investigadas (Tabela 18). Esses resultantes são semelhantes aos observados por LARA et al. (2004), cujas freqüências do alelo PGD^1 foram próximas a 1 nas raças Poll Dorset, Ile de France, Sulffolk, Santa Inês e cruzados. HENKES et al. (1994) estudando ovinos Romney-Marsh e cruzados Romney-Marsh com Merino Booroola, criados no Rio Grande do Sul, caracterizaram o loco PGD como monomórfico para as referidas populações.

Tabela 18. Freqüências alélicas estimadas para o loco PGD para as cinco populações ovinas investigadas

População	Alelos	
	PGD^1	PGD^2
Barriga Negra	0,95	0,05
Cara Curta	0,86	0,14
Cariri	0,94	0,06
Dorper	0,95	0,05
Morada Nova	0,95	0,05

Como pode ser visto na tabela 19, a maioria dos indivíduos foram homozigotos, predominando o genótipo PGD 1/1 em todas as populações estudadas. A variabilidade observada foi muito pequena, sendo este loco pouco informativo em estudos de caracterização de raças ovinas.

Tabela 19. Estimativas de freqüências genotípicas para o loco PGD para as cinco populações ovinas investigadas

População	Genótipos		
	PGD 1/1	PGD 1/2	PGD 2/2
Barriga Negra	0,90	0,10	0
Cara Curta	0,72	0,28	0
Cariri	0,88	0,12	0
Dorper	0,90	0,10	0
Morada Nova	0,90	0,10	0

4.1.6. Diaforase-I (DIA-I) e Diaforase-II (DIA-II)

A variabilidade observada para esta enzima foi explicada pela presença de dois locos autossômicos denominados DIA-I e DIA-II, sendo o loco DIA-II de caráter monomórfico para todas as populações estudadas. Os resultados obtidos no presente estudo são concordantes com os dados da literatura uma vez que a enzima DIA-II tem sido descrita como monomórfica (CEPICA e STRATIL, 1978; HENKES et al., 1993; LARA et al., 2004).

Para o loco DIA-I foram detectados dois alelos codominantes, denominados *DIA-I^S* e *DIA-I^F*, cujos produtos da expressão gênica apresentaram migrações anódicas crescentes. O perfil eletroforético das isoenzimas diaforase pode ser observado na figura 14.

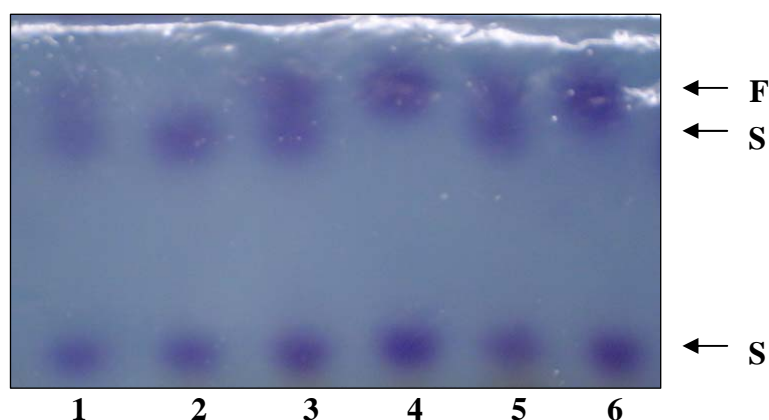


Figura 14. Perfil eletroforético da diaforase-I e diaforase-II. Loco DIA-I: Amostras 1, 3 e 5: fenótipo DIA-I S/F; amostra 2: fenótipo DIA-I S/S e amostras 4 e 6: fenótipo DIA-I F/F. Loco DIA-II: Amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6: fenótipo DIA-II S/S

Como pode ser visto na tabela 20, o alelo $DIA-I^S$ foi o mais freqüente na população Barriga Negra e, nas demais populações, o alelo $DIA-I^F$ foi mais freqüente. Dessa forma, provavelmente o alelo $DIA-I^S$ é característico para o grupo genético Barriga Negra.

A tabela 21 apresenta as estimativas de freqüências genóticas para o loco DIA-I. Observa-se que 52% dos ovinos Barriga Negra eram homozigotos para o genótipo DIA-I S/S e, apenas 7%, para o genótipo DIA-I F/F enquanto que para o grupo genético Cara Curta, a maior freqüência observada foi do genótipo DIA-I F/F (0,54) e, a menor, do genótipo DIA-I S/S (0,03). Tais resultados mostram a diversidade genética específica de cada grupo genético investigado, sendo esses resultados muito importantes para posteriores estudos de produção, rusticidade e adaptabilidade.

Tabela 20. Freqüências alélicas estimadas para o loco Diaforase-I para as cinco populações ovinas investigadas

População	Alelos	
	$DIA-I^S$	$DIA-I^F$
Barriga Negra	0,73	0,27
Cara Curta	0,25	0,75
Cariri	0,36	0,64
Dorper	0,42	0,58
Morada Nova	0,39	0,61

Tabela 21. Estimativa de frequências genóticas para o loco diaforase-I para as cinco populações ovinas investigadas

População	Genótipos		
	DIA-I S/S	DIA-I S/F	DIA-I F/F
Barriga Negra	0,52	0,41	0,07
Cara Curta	0,03	0,43	0,54
Cariri	0,23	0,25	0,52
Dorper	0,14	0,56	0,30
Morada Nova	0,15	0,48	0,37

4.1.7. Hemoglobina (Hb)

Para esta enzima, três padrões eletroforéticos foram observados: os homozigotos Hb A/A com uma banda de migração mais lenta e Hb B/B com uma banda de migração mais rápida e, o heterozigoto Hb A/B com duas bandas de mesma intensidade e com migração correspondente aos dois homozigotos descritos anteriormente (Figura 15). O polimorfismo observado para a hemoglobina foi explicado pela presença de um loco autossômico, com dois alelos codominantes denominados Hb^A e Hb^B , cujos produtos gênicos apresentam migração anódica crescente. Em 2,75% dos indivíduos houve a presença da variante C, que segundo a literatura, esse tipo de hemoglobina só ocorre em animais em condições anêmicas (KILGOUR et al., 1990).

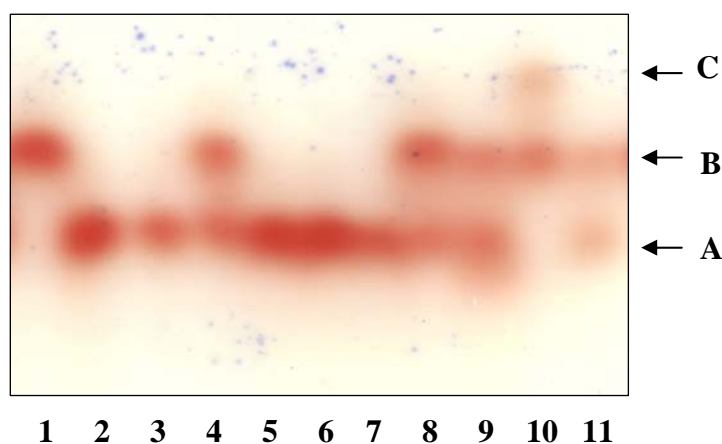


Figura 15. Perfil eletroforético da hemoglobina. Amostra 1: fenótipo Hb B/B; amostras 2, 3, 5, 6 e 7: fenótipo Hb A/A; amostras 4, 8, 9 e 11: fenótipo Hb A/B e amostra 10: fenótipo Hb B/C

Nas tabelas 22 e 23 estão apresentadas as estimativas de frequências gênicas e genotípicas para o loco Hb para a cinco populações ovinas investigadas.

Na tabela 22, observa-se um equilíbrio entre as distribuições dos alelos Hb^A e Hb^B nas populações nativas em relação à raça exótica Dorper, que apresenta maior concentração do alelo Hb^A (0,93). Este fator pode estar relacionado com a seleção que vem sendo empregada nesses animais, uma vez que estes passam por processos de melhoramento genético. Observa-se na tabela 23 que o genótipo Hb A/B, apresenta-se em maior proporção nas raças nativas quando comparados com a raça exótica Dorper e que não há presença do genótipo Hb^B para esta raça. As frequências alélicas estimadas para a raça Dorper diferem daquelas estimadas por SOTOMAIOR e THOMAZ-SOCCOL (1998) e por HENKES et al. (1993). Nesses estudos, as frequências genotípicas de Hb B/B foram superiores em relação ao genótipo Hb A/A. Considerando que os ovinos investigados anteriormente não pertenciam ao grupo de raças nativas brasileiras, consideradas adaptadas ao meio tropical, existe a hipótese de que o alelo Hb^A possa apresentar vantagens adaptativas, já que na maioria das populações nativas os indivíduos eram homocigotos para Hb^A ou heterocigotos.

Há na literatura estudos que sugerem que ovinos homocigotos Hb^A sejam mais sensíveis à anemia que os demais, principalmente pelo fato da hemoglobina C estar relacionada aos indivíduos que possuem o alelo Hb^A (BLUNT e HUISSMAN, 1975; TUCKER et al., 1983; KILGOUR et al., 1990).

Tabela 22. Frequências alélicas estimadas para o loco hemoglobina para as cinco populações ovinas investigadas

População	Alelos	
	Hb^A	Hb^B
Barriga Negra	0,59	0,41
Cara Curta	0,55	0,45
Cariri	0,51	0,49
Dorper	0,93	0,07
Morada Nova	0,56	0,44

Tabela 23. Estimativas de frequências genóticas para o loco hemoglobina para as cinco populações ovinas investigadas

População	Genótipos		
	Hb A/A	Hb A/B	Hb B/B
Barriga Negra	0,27	0,65	0,08
Cara Curta	0,25	0,60	0,15
Cariri	0,18	0,65	0,17
Dorper	0,86	0,14	0
Morada Nova	0,32	0,48	0,20

4.2. Análises de microssatélites

4.2.1. OarCP20

Os resultados das análises de eletroforese dos fragmentos amplificados para o loco OarCP20 podem ser visualizados na figura 16. Cada alelo mostrou duas bandas fortes de igual intensidade e duas mais fracas e mais anódicas. No conjunto das cinco populações estudadas foram encontrados 7 alelos, com tamanho variando de 73 a 85pb. A população Barriga Negra foi o grupo genético que apresentou o maior número de alelos (Tabela 24).

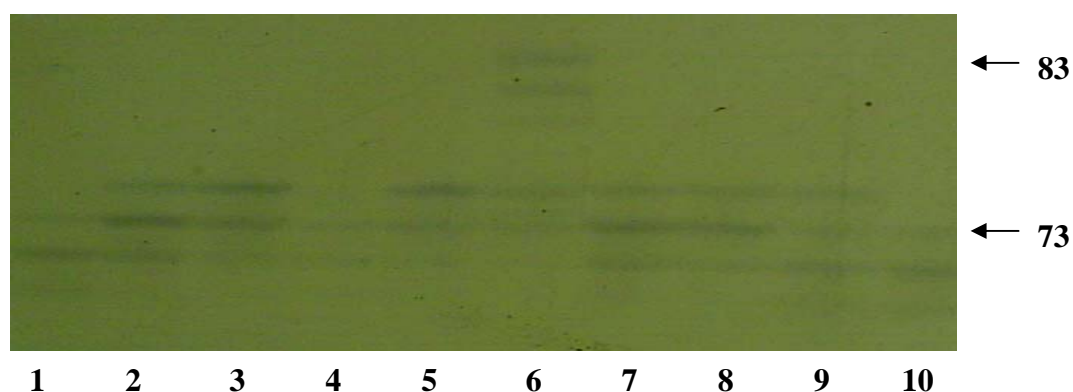


Figura 16. Resultados das análises de eletroforese para o microssatélite OarCP20. Amostras 1, 4 e 10: alelos 73/73pb; amostras 2, 7, 8 e 9: alelos 73/75pb; amostras 3 e 5: alelos 75/75pb e amostra 6: alelos 75/83pb

A distribuição dos diferentes alelos do loco OarCP20 foi distinta entre as populações investigadas. Como pode ser visto na tabela 24, o alelo 83pb foi o mais freqüente nas populações Barriga Negra (0,448), Cara Curta (0,30) e Cariri (0,35), podendo ser utilizado como marcador racial para esses grupos genéticos. Por outro lado, a elevada freqüência do alelo 73pb na raça Morada Nova (0,375) assemelha-se a encontrada em raças Uruguaias (0,313-0,344) (TOMASCO et al., 2002), esses resultados podem estar relacionados com o fato de o Uruguai fazer fronteira com o Brasil através do estado do Rio Grande do Sul, que já foi grande produtora de lã, dessa forma, a raça Morada Nova poderia provavelmente ter sofrido influência de cruzamentos de raças Uruguaias.

Tabela 24. Freqüências alélicas estimadas para o microssatélite OarCP20 para as cinco populações investigadas

Loco	Alelos	Barriga Negra	Cara Curta	Cariri	Dorper	Morada Nova
OarCP20	73	0,2500	0,1500	0,2300	0,2245	0,3750
	75	0,1354	0,1700	0,2500	0,2347	0,0521
	77	0,1146	0,2100	0,0400	0,4592	0,2813
	79	0,0208	0,0300	0,0400	0	0,0104
	81	0,0208	0,1400	0,0900	0	0,1354
	83	0,4480	0,3000	0,3500	0,0102	0,1458
	85	0,0104	0	0	0,0714	0

4.2.2. UWCA46

Os resultados das análises de eletroforese dos fragmentos amplificados para o loco UWCA46 estão representados na figura 17. Cada alelo mostrou duas bandas fortes de igual intensidade e duas mais fracas e mais anódicas. No conjunto das cinco populações estudadas foram detectados 13 alelos. A Cariri foi a população que apresentou o maior número de alelos (10) e, a Morada Nova, o menor número (5).

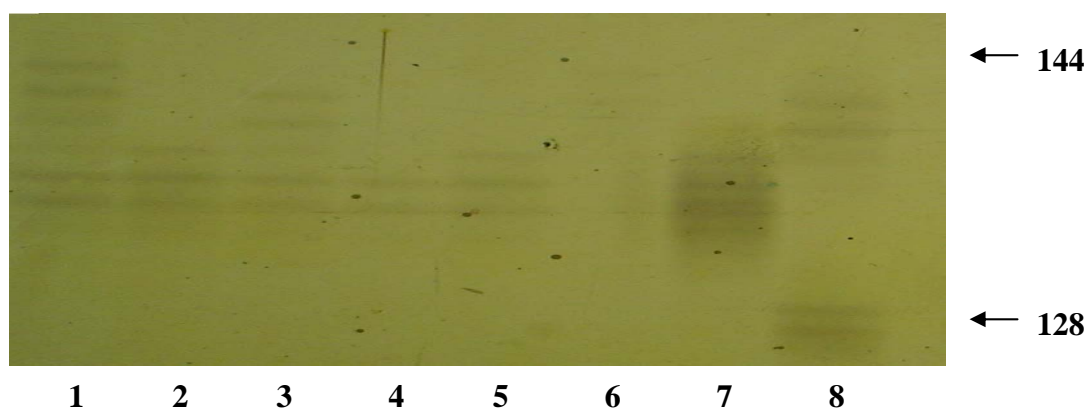


Figura 17. Resultados das análises de eletroforese para o microssatélite UWCA46. Amostra 1: alelos 136/144pb; amostras 2, 5 e 7: alelos 136/138pb; amostra 3: alelos 136/142pb; amostra 4: alelo 136/136pb; amostra 5: alelos 140/144pb; amostra 6: alelos 136/138pb e amostra 8: alelos 128/142pb

Como pode ser visto na tabela 25, os alelos 128pb e 144pb foram restritos ao grupo genético Cara Curta, cujas estimativas de frequências alélicas foram 0,01, 0,01, apesar das frequências baixas esses alelos possivelmente podem ser utilizados como marcadores para esse grupo genético. O alelo 156pb foi identificado apenas na raça Cariri, com frequência alélica de 0,03, podendo provavelmente ser utilizado como marcador para esta raça.

O alelo 136pb foi o mais freqüente em todas as raças, embora na raça Morada Nova este alelo tenha ocorrido numa frequência maior (0,64) em relação às demais populações investigadas. Este alelo possivelmente é característico tanto dos ovinos nativos quanto dos exóticos, podendo ser utilizado como marcador para raças ovinas.

Tabela 25. Frequências alélicas estimadas para o microssatélite UWCA46 para as cinco populações ovinas investigadas

Loco	Alelos	Barriga Negra	Cara Curta	Cariri	Dorper	Morada Nova
UWCA46	128	0	0,01	0	0	0
	132	0	0,01	0,02	0	0
	136	0,57	0,52	0,43	0,551	0,64
	138	0,09	0,12	0,03	0,051	0,15
	140	0,04	0,21	0,10	0,153	0,09
	142	0,22	0,07	0,03	0,133	0,10

144	0	0,01	0	0	0
150	0	0,02	0,06	0,020	0
152	0,01	0	0	0	0,02
154	0,01	0,03	0,19	0,081	0
156	0	0	0,03	0	0
158	0,04	0	0,01	0,010	0
160	0,02	0	0,10	0	0

4.2.3. BM1824

Como pode ser visto na figura 18, cada alelo aparece com duas bandas fortes de igual intensidade e duas mais fracas e mais anódicas. No conjunto das cinco populações foram observados 9 alelos. A raça Morada Nova e o grupo genético Barriga Negra apresentaram o maior número de alelos (8).

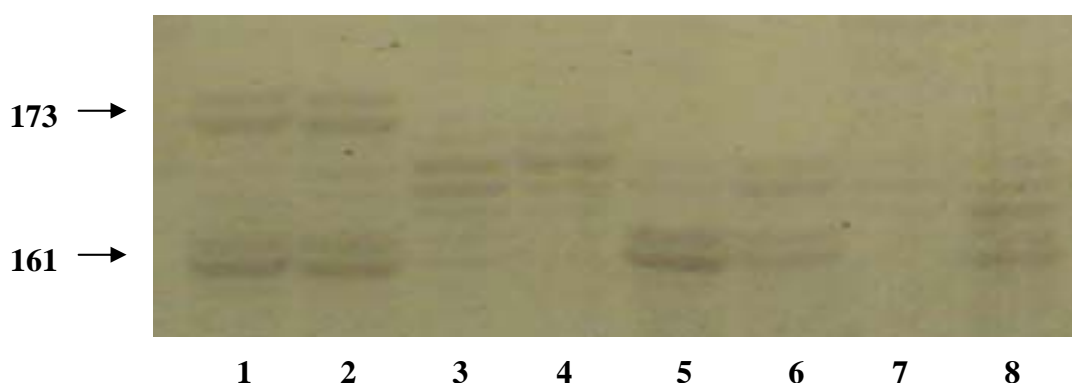


Figura 18. Resultados das análises de eletroforese para o microssatélite BM1824. Amostras 1 e 2: alelos 161/173pb; amostra 3: alelo 167/167pb; amostra 4: alelos 167/169pb; amostras 5 e 6: alelos 161/167pb; amostra 7: alelos 165/167pb e amostra 8: alelos 165/161pb

Como podem ser visto na tabela 26, as estimativas de freqüências alélicas para o microssatélite BM1824 foram distintas entre as cinco populações. O alelo 159pb foi restrito à raça Cariri (0,01), apesar da baixa freqüência esse alelo possivelmente pode ser utilizado como marcador para esse grupo genético. O alelo 165pb apresentou maior freqüência nas populações Cara Curta, Morada Nova e Barriga Negra, cujas estimativas foram 0,44; 0,39 e

0,3367, respectivamente, podendo esse alelo possivelmente ser utilizado como marcador para raças nativas. Vale salientar, ainda, a ausência do alelo 163pb na raça Cariri e a baixa frequência deste alelo nas demais populações investigadas, mostrando que provavelmente esse alelo não pode ser utilizado como marcador para raças ovinas.

Tabela 26. Frequências alélicas estimadas para o microssatélite BM1824 para as cinco populações ovinas

Loco	Alelos	Barriga Negra	Cara Curta	Cariri	Dorper	Morada Nova
BM1824	159	0	0	0,01	0	0
	161	0,1532	0,14	0,029	0,2041	0,05
	163	0,0102	0,02	0	0,0204	0,02
	165	0,3367	0,44	0,059	0,0918	0,39
	167	0,3163	0,24	0,351	0,2449	0,18
	169	0,0612	0,06	0,139	0,1939	0,21
	171	0,0306	0,02	0,139	0,0612	0,03
	173	0,0408	0,08	0,273	0,1837	0,09
	175	0,051	0	0	0	0,03

4.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Na tabela 27 estão apresentados os resultados dos testes de equilíbrio genético para cada loco polimórfico investigado nas cinco populações. Quando todos os locos (Hb, EM, Tf, PGD, DIA-I, CP20, UWCA46 e BM1824) foram considerados na análise, o teste exato de Fisher revelou que as populações Barriga Negra, Cara Curta e Cariri não se encontravam em equilíbrio segundo o teorema de Hardy-Weinberg, ($P=0,001$, $P=0,0215$ e $P=0,0015$, respectivamente). Para as populações Dorper e Morada Nova, os desvios entre as proporções genotípicas observadas e esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg não foram significativos ($P=0,2357$ e $P=0,4544$, respectivamente).

Para o grupo genético Barriga Negra os resultados obtidos foram devidos ao excesso de heterozigotos no loco da hemoglobina ($P = 0,0085$) e déficit de heterozigotos nos locos OarCP20 ($P = 0,0057$) e BM1824 ($P = <10^{-4}$). O valor de F_{IS} , estimado para o loco Hb ($-0,338$), assim como, os valores altos e positivos de F_{IS} estimados para os locos OarCP20 e BM1824 ($0,212$ e $0,252$, respectivamente) foram concordantes com a hipótese aceita, que sugere excesso e déficit de heterozigotos para os referidos locos.

Para o grupo genético Cara Curta, os resultados foram devidos aos excessos de heterozigotos observados nos locos da hemoglobina ($P = 0,0317$) e da transferrina ($P = 0,0280$). Os valores de F_{IS} para esses locos ($-0,204$ e $-0,121$, respectivamente) foram concordantes, sugerindo níveis baixos de homozigoses. Além disso, a não aderência das proporções genóticas observadas às esperadas foi devida ao déficit de heterozigotos para os locos UWCA46 ($P = 0,0090$) e BM1824 ($P = 0,0524$). Os valores de F_{IS} para esses locos ($-0,043$ e $0,119$, respectivamente) foram concordantes, sugerindo um alto grau de homozigose para esses locos.

Para a raça Cariri, também foi verificado um desvio significativo entre as proporções genóticas observadas e teóricas para o loco da hemoglobina ($P = 0,0217$), sugerindo excesso de heterozigotos. O valor de F_{IS} para esse loco ($-0,293$) foi também concordante, sugerindo nível baixo de homozigose. Ainda nesta raça, foi verificado um desvio significativo entre as proporções genóticas observadas e teóricas para o loco DIA-I ($P = 0,0004$). O valor alto e positivo de F_{IS} ($0,463$) para esse loco foi também concordante com a hipótese aceita, que sugere déficit de heterozigotos. Os valores de F_{IS} estimados para os locos Hb, Tf, DIA-I, CP20, UWCA46 e BM1824 sustentam as hipóteses tanto para déficit como para excesso de heterozigotos, uma vez que valores elevados e positivos sugerem excesso de homozigotos e valores elevados e negativos, excesso de heterozigotos.

O excesso de heterozigotos para as populações nativas provavelmente é devido aos cruzamentos entre os grupos raciais.

Para a raça Dorper os locos UWCA46 ($P = 0,0397$) e BM1824 ($P = 0,0084$) não apresentaram em equilíbrio genético, cujos valores de F_{IS} foram pequenos e positivos (0,093 e 0,158, respectivamente), sugerindo déficit de heterozigotos nos referidos locos. Esse resultado também foi observado na raça Morada Nova, em relação ao loco UWCA46 ($P = 0,0274$), provavelmente devido à seleção que vem sendo feita nessa raça. No entanto, o teste exato de Fisher revelou que ambas as raças encontravam-se em equilíbrio genético quando todos os locos foram considerados na análise.

Tabela 27. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg em cinco populações de ovinos

População	Loco	Número de Animais				F_{IS}	Teste exato de Fisher		
		Homozigoto		Heterozigoto			Déficit	Excesso	Geral
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.		Heterozigoto	Heterozigoto	
Barriga Negra	Hb	21	(30,76)	39	(29,23)	-0,338	Ns	0,0085	0,0149
	EM	28	(30,96)	32	(29,04)	-0,103	Ns	ns	ns
	TF	26	(27,93)	26	(24,07)	-0,081	Ns	ns	ns
	PGD	54	(54,25)	6	(5,75)	-0,044	Ns	ns	ns
	DIA-I	35	(35,87)	25	(24,12)	-0,037	Ns	ns	ns
	OarCP20	21	(13,83)	27	(34,17)	0,212	0,0057	ns	0,0084
	UWCA46	20	(18,95)	30	(31,05)	0,034	Ns	ns	ns
	BM1824	21	(11,67)	28	(37,33)	0,252	$<10^{-4}$	ns	0,0002
	Todos						P=0,0010		
Cara curta	Hb	24	(30,05)	36	(29,94)	-0,204	Ns	0,0317	ns
	EM	31	(30,43)	29	(29,57)	0,019	Ns	ns	ns
	TF	17	(21,49)	42	(37,50)	-0,121	Ns	0,0280	ns
	PGD	43	(45,28)	17	(14,71)	-0,157	Ns	ns	ns
	DIA-I	34	37,31	26	(22,69)	-0,147	Ns	ns	ns
	OarCP20	10	(9,89)	40	(40,10)	0,003	Ns	ns	0,0039
	UWCA46	15	(16,43)	35	(33,56)	-0,043	0,0090	ns	Ns
	BM1824	18	(13,71)	32	(36,28)	0,119	0,0524	ns	
	Todos						P=0,0215		
Cariri	Hb	21	(29,75)	39	(30,24)	-0,293	Ns	0,0217	0,0375
	EM	43	(45,28)	17	(14,71)	-0,157	Ns	ns	ns
	TF	40	(40,69)	10	(9,30)	-0,076	Ns	ns	ns
	PGD	53	(53,35)	7	(6,65)	-0,054	Ns	ns	ns

	DIA-I	45	(32,17)	15	(27,82)	0,463	0,0004	ns	0,0005	
	OarCP20	12	(12,08)	38	(37,92)	-0,002	Ns	ns	ns	
	UWCA46	16	(12,01)	34	(37,99)	0,106	Ns	ns	0,0120	
	BM1824	11	(13,93)	39	(36,07)	-0,082	Ns	ns	ns	
	Todos						P=0,0015			
Dorper	Hb	43	(43,42)	7	(6,58)	-0,065	Ns	ns	ns	
	EM	43	(43,42)	7	(6,58)	-0,065	Ns	ns	ns	
	TF	8	(8,16)	26	(25,84)	-0,006	Ns	ns	ns	
	PGD	45	(45,20)	5	(4,80)	-0,043	Ns	ns	ns	
	DIA-I	22	(25,39)	28	(24,60)	-0,140	Ns	ns	ns	
	OarCP20	15	(15,41)	34	(33,59)	-0,012	Ns	ns	ns	
	UWCA46	20	(17,04)	29	(31,96)	0,093	0,0397	ns	0,0054	
	BM1824	15	(8,68)	34	(40,32)	0,158	0,0084	ns	ns	
	Todos						P=0,2357			
Morada Nova	Hb	31	(29,67)	28	(29,33)	0,046	Ns	ns	ns	
	EM	26	(29,25)	33	(29,75)	-0,110	Ns	ns	ns	
	TF	18	(19,48)	40	(38,52)	-0,039	Ns	ns	ns	
	PGD	53	(53,25)	6	(5,74)	-0,045	Ns	ns	ns	
	DIA-I	31	(30,69)	28	(28,31)	0,011	Ns	ns	ns	
	OarCP20	10	(12,21)	38	(35,79)	-0,062	Ns	ns	ns	
	UWCA46	30	(22,25)	20	(27,74)	0,281	0,0274	ns	ns	
	BM1824	18	(11,68)	32	(38,31)	0,166	Ns	ns	ns	
	Todos						P=0,4544			

ns = não significativo ($P > 0,05$)

4.4. Índice de Diversidade

A tabela 28 apresenta os valores de proporção de locos polimórficos (P), número médio de alelos por locos polimórficos (A_p) e Proporção de alelos contidos em cada população (P_A) para as cinco populações ovinas estudadas. Dos onze locos investigados no presente estudo, oito apresentaram-se polimórficos. A porcentagem de locos polimórficos foi de 73% (alelo mais freqüente com freqüência igual ou superior a 99%), nas cinco populações estudadas. Esse critério foi sugerido por NEI (1987) para situações em que o tamanho da amostra é superior a 50 indivíduos.

Com relação aos valores P_A , as maiores estimativas foram obtidas para as populações nativas (Barriga Negra, Cara Curta e Cariri), cujos valores foram 86,36%; 84,10% e 84,10%, respectivamente, sugerindo maior variabilidade genética para essas populações em relação às raças Dorper e Morada Nova, cujos valores de P_A foram 77,27% e 72,27%, respectivamente, provavelmente devido a intensa seleção que vem sendo feita nessas duas raças principalmente na raça Dorper.

Tabela 28. Proporção de locos polimórficos (P), número médio de alelos por locos polimórficos (A_p) e proporção de alelos contidos em cada população (P_A) para as cinco populações ovinas com base na variação observada em oito locos de proteínas e três microssatélites

População	Nº de animais	P (%)	A_p	P_A (%)
Cara Curta	60	73	3,36	84,10
Dorper	50	73	3,09	77,27
Cariri	60	73	3,36	84,10
Barriga Negra	60	73	3,45	86,36
Morada Nova	59	73	3,09	77,27

Com relação ao A_p , pode-se observar que os maiores valores foram estimados para as populações nativas (Barriga Negra, Cara Curta e Cariri), variando de 3,45 (Barriga Negra) a 3,36 (Cara Curta e Cariri), sugerindo que essas populações ainda mantêm um pool gênico que as tornam capazes de sobreviver às condições adversas do semi-árido nordestino. Os menores valores de A_p foram observados para as raças Dorper (3,09) e Morada Nova (3,09), provavelmente porque essas raças, principalmente a Dorper, vêm sendo submetidas a processos de seleção artificial e isso, possivelmente estaria diminuindo a variabilidade genética e conseqüentemente fixando determinados alelos.

A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para o loco marcador e depende do número de alelos e da freqüência do mesmo

na população. Segundo SUSOL et al. (2000), valores para heterozigidade acima de 70% são considerados muito informativos, cujas estimativas são consideradas muito eficientes em estudos de variabilidade intra-populacional.

Na tabela 29 estão apresentados os valores de heterozigidade observada $H(o)$ e esperada $H(e)$, índices de fixação (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Na população Barriga Negra, todos os locos apresentaram valores de $H(o)$ inferiores a 0,70, sendo PGD o loco menos informativo. Já nas demais populações alguns locos apresentaram valores H_o igual ou superiores a 0,70, destacando os locos Tf, OarCP20 e UWCA46 (Cara Curta), OarCP20 e BM1824 (Cariri), Tf (Dorper) e OarCP20 (Morada Nova).

Em geral, as estimativas de heterozigidade observada $H(o)$ foram maiores em relação às esperadas $H(e)$. Os valores de $H(o)$ variaram de 0,100 (Dorper e Barriga Negra) a 0,800 (Cara Curta) enquanto que $H(e)$, de 0,096 (Dorper e Barriga Negra) a 0,8230 (Dorper).

Com relação aos índices de fixação, pode-se observar que na maioria dos locos os valores de F foram negativos. Os valores de F negativo poderiam indicar excesso de heterozigotos, embora esse parâmetro esteja intimamente relacionado com o tamanho da amostra, número de locos investigados, frequências alélicas, etc. Devido a estes fatores, o índice de fixação foi interpretado em conjunto com os resultados do teste de equilíbrio genético, apresentado anteriormente (Tabela 27).

Como podem ser visto na tabela 29, os maiores valores de PIC foram estimados para locos que apresentaram os maiores valores de $H(o)$ e $H(e)$. Nas cinco populações investigadas, os marcadores de DNA (OarCP20, UWCA46 e BM1824) apresentaram valores de PIC superiores a 0,50. Resultados semelhantes foram observados para o marcador de proteína (Tf) nas populações Cara Curta, Dorper e Morada Nova, sendo esses locos os mais eficientes para quantificar a variabilidade existente dentro das referidas populações.

Tabela 29. Valores da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), índice de fixação médio (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estimados com base em cinco locos de proteínas e três microsátélites

População	Marcador	H(o)	H(e)	F	PIC
Barriga Negra	Tf	0,500	0,463	- 0,080	0,410
	EM	0,533	0,484	- 0,101	0,365
	PGD	0,100	0,096	- 0,042	0,090
	DIA-I	0,417	0,402	- 0,037	0,319
	Hb	0,650	0,487	- 0,335	0,366
	OarCP20	0,563	0,712	0,209	0,662
	UWCA46	0,600	0,621	0,034	0,574
	BM1824	0,571	0,762	0,250	0,717
Cara Curta	Tf	0,712	0,636	- 0,119	0,574
	EM	0,483	0,493	0,020	0,369
	PGD	0,283	0,245	- 0,155	0,214
	DIA-I	0,433	0,378	- 0,145	0,305
	Hb	0,600	0,499	- 0,202	0,372
	OarCP20	0,800	0,802	0,002	0,763
	UWCA46	0,700	0,671	-0,043	0,627
	BM1824	0,640	0,726	0,118	0,680
Cariri	Tf	0,200	0,186	- 0,075	0,175
	EM	0,283	0,245	- 0,155	0,214
	PGD	0,117	0,111	- 0,054	0,104
	DIA-I	0,250	0,464	0,461	0,354
	Hb	0,650	0,504	- 0,290	0,375
	OarCP20	0,760	0,758	-0,002	0,710
	UWCA46	0,680	0,760	0,105	0,727
	BM1824	0,780	0,721	-0,082	0,667
Dorper	Tf	0,765	0,760	- 0,006	0,702
	EM	0,140	0,132	- 0,061	0,122
	PGD	0,100	0,096	- 0,042	0,090
	DIA-I	0,560	0,492	- 0,138	0,369
	Hb	0,140	0,132	- 0,061	0,122
	OarCP20	0,694	0,685	-0,013	0,625
	UWCA46	0,592	0,652	0,092	0,613
	BM1824	0,694	0,823	0,156	0,788
Morada Nova	Tf	0,690	0,664	- 0,039	0,601

EM	0,559	0,504	- 0,109	0,375
PGD	0,102	0,097	- 0,052	0,092
DIA-I	0,475	0,480	0,010	0,363
Hb	0,475	0,497	0,044	0,371
OarCP20	0,792	0,746	-0,061	0,696
UWCA46	0,400	0,555	0,279	0,515
BM1824	0,640	0,766	0,164	0,727

Os valores de heterozigosidade e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) refletem o polimorfismo do marcador nas populações estudadas. Segundo a literatura, valores de (PIC) superiores a 0,5 podem ser considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,5 medianamente e inferiores a 0,25, pouco informativos para estimativas de variabilidade intra-populacional. .

Na tabela 30 estão apresentadas os valores médios de PIC e probabilidades de exclusão (Excl-1 e Excl-2) estimados com base em oito locos de proteínas e três microssatélites para as cinco populações ovinas.

Observa-se que os locos investigados no presente estudo, em geral, apresentaram um alto grau de polimorfismo, sendo o maior valor observado para o grupo genético Cara Curta (0,355) e, o menor valor, para a raça Cariri (0,302), esses resultados mostram a eficiência desses locos nos estudos de caracterização genética.

De acordo com GÜNDEL e REETZ (1981) e JAMIESON (1994) a probabilidade de detecção de falso parentesco depende do número de locos investigados, do número de alelos por loco e das frequências dos mesmos na raça ou população, a qual o animal pertence. No presente estudo, as probabilidades de exclusão, quando apenas um parental foi considerado (Excl1) na análise, variaram de 77,60% (Barriga Negra) a 83,90% (Cara Curta). No entanto, esses valores aumentaram quando ambos parentais foram considerados (Excl2) na análise, sendo estimados valores que variaram de 94,00% (Barriga Negra) a 96,40% (Cara Curta).

Esses valores foram superiores aos estimados por LARA et al. (2004), quando analisaram apenas locos de proteínas em ovinos das raças Suffolk, Ile de France, Poll Dorset e Santa Inês, cujas probabilidades de exclusões foram 76,9; 68,0; 61,3 e 84,8% respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o conjunto de marcadores investigados foi eficiente, podendo ser considerado muito informativo para a identificação e investigação de paternidade de ovinos dos grupos raciais Barriga Negra e Cara Curta e, para as raças Cariri, Dorper e Morada Nova. No entanto, a substituição de alguns locos de proteínas por outros marcadores, que possam revelar índices maiores de variabilidade intra-populacional, permitiria aumentar a eficiência das análises de identificação genética para 100%, reduzindo o número de locos em estudos de caracterização genética e na investigação de paternidade para as referidas raças.

Tabela 30. Estimativas de índice do conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidades de exclusão Excl (1) e Excl (2) obtidas com base em oito locos de proteínas e três microssatélites para as cinco populações ovinas

População	PIC	Excl1	Excl2
Cara Curta	0,355	0,839	0,964
Dorper	0,312	0,823	0,958
Cariri	0,302	0,791	0,944
Barriga Negra	0,319	0,776	0,940
Morada Nova	0,340	0,820	0,955

Excl (1) – quando apenas um parental for considerado na investigação de paternidade,
Excl (2) - quando ambos parentais forem considerados na investigação de paternidade

Na tabela 31 estão apresentados os valores de PIC, H(o), H(e) e probabilidades de exclusão Excl (1) e Excl (2) para os onze locos investigados.

Com relação ao PIC, os locos Tf, OarCP20, UWCA46 e BM1824 apresentaram valores superiores a 0,50, podendo ser considerados os mais informativos para o conjunto das cinco populações investigadas. Em oposição, os locos Hb, EM e DIA-I revelaram pouca

variabilidade, sendo considerados medianamente informativos e, PGD, o loco de menor informação sobre a variabilidade intra-populacional. Esses resultados complementam as estimativas de heterozigosidade, refletindo a eficiência de cada marcador e do conjunto, cujas probabilidades de exclusão foram iguais a 86,30% (Excl1) e 97,20% (Excl2).

Tabela 31. Locos estudados, número de alelos detectados, média de alelos por loco, conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_o)

Locos	Número de alelos	PIC	H_E	H_o	Excl (1)	Excl (2)
HB	2	0,361	0,473	0,516	0,112	0,180
Pep-B	1	0	0	0	0	0
EM	2	0,338	0,432	0,408	0,093	0,169
Tf	4	0,541	0,589	0,569	0,187	0,351
PGD	2	0,123	0,132	0,142	0,009	0,062
DIA-I	2	0,370	0,491	0,422	0,120	0,185
DIA-II	1	0	0	0	0	0
Alb	1	0	0	0	0	0
OarCP20	7	0,761	0,795	0,722	0,412	0,590
UWCA46	13	0,643	0,668	0,594	0,282	0,471
BM1824	9	0,774	0,803	0,665	0,435	0,612
Média	4	0,356	0,398	0,367	0,863	0,972

Excl (1) – quando apenas um parental for considerado na investigação de paternidade,
Excl (2) - quando ambos parentais forem considerados na investigação de paternidade

4.5. Análise da diversidade em populações subdivididas

A análise de diversidade de NEI (1973), que considera a subdivisão nas populações, foi realizada com base nas informações referentes aos onze locos, cujos resultados estão apresentados na tabela 32. Em média, a divergência entre as cinco populações foi de 8,10%. Este resultado reflete que 8,10% da diversidade total decorrem de diferenças na distribuição

dos alelos entre as populações, e, 91,90%, em virtude da variabilidade existente dentro das populações.

A pequena proporção da variação genética devido às diferenças entre populações resulta das pequenas alterações nas frequências alélicas, provavelmente causadas pelo baixo número de animais destinados à reprodução e pelos cruzamentos dirigidos em cada raça. Dessa forma, a maior parte da diversidade genética observada foi devido a diferenças intra-populacionais. Tais resultados poderiam sugerir a existência de deriva genética ou efeitos de seleção entre as populações, principalmente para os grupos raciais Barriga Negra, Cara Curta e Cariri, os quais não se encontravam em desequilíbrio segundo Hardy-Weinberg (Tabela 27).

Como pode ser visto na tabela 32, a grande variabilidade que os valores de G_{ST} por locos podem assumir evidenciando a importância da análise de um grande número de locos para uma correta estimativa de diferenciação genética inter e intra-populacional.

Os marcadores que mais contribuíram nas estimativas de diferenciação (G_{ST}) entre as populações analisadas foram os locos EM (0,1346), Tf (0,1096), DIA-I (0,1031) e Hb (0,1007). Em oposição, os locos polimórficos PGD, OarCP20, UWCA46 e BM1824, por apresentarem um padrão semelhante na distribuição dos alelos nas diferentes populações, foram os que menos contribuíram para as estimativas de diferenciação.

Tabela 32. Estimativas de H_T , H_S e G_{ST} para os cinco locos de proteínas e três microssatélites

Locos	Índice de Diversidade de NEI		
	H_T	H_S	G_{ST}
Hb	0,4673	0,4202	0,1007
EM	0,4257	0,3684	0,1346
Tf	0,6020	0,5360	0,1096
PGD	0,1302	0,1276	0,0199

DIA-I	0,4898	0,4393	0,1031
OarCP20	0,7927	0,7331	0,0753
UWCA46	0,6668	0,6453	0,0322
BM1824	0,8020	0,7519	0,0623
Todos	0,3979	0,3656	0,0810

4.6. Estimativa da distância genética

Com base nas frequências gênicas estimadas para as cinco populações ovinas, foi possível calcular as distâncias genéticas padrões (D_A) e as corrigidas para pequenas amostras (D_S). As estimativas foram obtidas para todos os pares de populações investigadas.

Na tabela 33 estão apresentados os valores de D_A e D_S que foram estimadas com o emprego do programa DISPAN (KUMAR et al., 1993), segundo as metodologias de NEI (1972 e 1978), respectivamente. Em geral, as distâncias genéticas padrão (D_A) foram superiores às distâncias corrigidas (D_S).

As menores divergências foram observadas entre as populações Morada Nova e Cara Curta, cujas estimativas de D_A e D_S foram 0,0084 e 0,0219, respectivamente. Esses baixos valores podem ser explicados pelos possíveis cruzamentos entre grupos, uma vez que esses animais são criados juntos.

Em oposição, os maiores valores de distância foram estimados para pares em que uma das populações era formada por ovinos nativos, e a outra, de origem africana, sendo as maiores distâncias (D_A e D_S) estimadas entre os pares de populações: Barriga Negra e Dorper (0,0883 e 0,0733, respectivamente); Cariri e Dorper (0,0849 e 0,0867, respectivamente). Estes resultados eram esperados, pois a raça Dorper tem origem africana, diferindo das populações nativas que têm origem ibérica trazidas pelos colonizadores portugueses e espanhóis.

Tabela 33. Estimativa da distância genética entre as cinco populações ovinas investigadas, pelo método de NEI (1972 e 1978), a partir das frequências gênicas para os cinco locos de proteínas e três microssatélites. A distância genética padrão (D_A) de NEI (1972) está representada acima da diagonal e, a distância corrigida para amostras pequenas, (NEI, 1978) abaixo da diagonal

	Cara curta	Dorper	Cariri	Barriga negra	Morada nova
Cara curta	--	0,0671	0,0444	0,0384	0,0084
Dorper	0,0624	--	0,0849	0,0883	0,0623
Cariri	0,0516	0,0867	--	0,0480	0,0635
Barriga negra	0,0347	0,0733	0,0544	--	0,0297
Morada nova	0,0219	0,0608	0,0712	0,0289	--

4.7. Análise de Grupamento (*Clusters*)

O dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das distâncias genéticas de NEI (1972), calculadas com base nas frequências alélicas, estimadas para cinco locos de proteínas e três microssatélites, apresentou dois clusters principais: um agrupando todas as populações nativas e o outro, os rebanhos Dorper (Figura 19).

No primeiro cluster, pode-se observar as populações Cara Curta e Morada Nova mais próximas, tal resultado pode estar refletindo os possíveis cruzamentos que ocorrem entre as referidas populações, uma vez que os animais são criados numa mesma propriedade em sistema extensivo, sem controle de reprodução. A grande proximidade observada entre os grupos Barriga Negra e Morada Nova era esperada, pois existem relatos históricos de que o Barriga Negra surgiu por segregação na raça Morada Nova. Já a raça Cariri apesar de compartilhar o mesmo cluster encontra-se distante das demais, sugerindo pertencer a grupo distinto.

O segundo cluster foi formado com a raça Dorper, mostrando ser distinta das raças e grupos nativos. Além disso, como já eram esperados, os resultados confirmaram a distância genética entre a raça comercial Dorper e os animais nativos estudados por ser uma raça pura, pertencente a tronco diferente das demais.

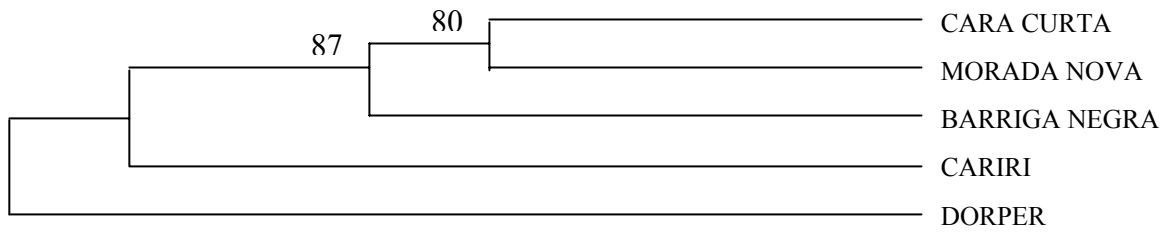


Figura 19. Dendrograma construído com base no método UPGMA, a partir da distância genética de NEI (1972), demonstrando as relações genéticas entre as cinco populações ovinas investigadas

5. CONCLUSÕES

As populações Barriga Negra, Cariri e Cara Curta não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo a existência de deriva genética ou efeitos de seleção entre as populações.

Dentre as populações investigadas, a Barriga Negra foi a que apresentou a maior variabilidade intra-populacional.

Os locos Tf, OarCP20, UWCA46 e BM1824 foram os mais informativos para o conjunto das cinco populações investigadas.

O conjunto de marcadores investigados foi eficiente, podendo ser considerado muito informativo para a identificação e investigação de paternidade de ovinos dos grupos raciais Barriga Negra, Cara Curta, Cariri, Dorper e Morada Nova.

Os locos EM, Tf, DIA-I, e Hb foram os que mais contribuíram nas estimativas de diferenciação entre as cinco populações analisadas por apresentarem padrões distintos de distribuição dos alelos nas diferentes populações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHTON, G. C. Beta-globulin polymorphism and economic factors in dairy cattle. **Journal Agriculture Science**, v. 54, p. 321-328, 1960.

ASHTON, G.C.; FALLON, G.R.; SUTHERLAND, D.N. Transferrin (B globulin) type and milk and butterfat production in dairy cows. **Journal Agriculture Science**, v. 62, p. 27-34, 1964.

BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, K. W.; STONE, R. T.; SUNDEN, S. L. F.; HAWKINS, G. A.; TOLDO, S. S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J.; BEATTIE, C. W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, p. 619-639, 1994.

BLUNT, M. H. e HUISMAN, T. H. J. **The Blood of Sheep; Composition and Function** (ed. Huisman, T. H. J.) 155. Springer, New York, 1975.

BOWLING, A. T. e CLARK, R. S. Excesses of heterozygotes at albumin locus in American Standard bred horses. **Animal Genetics**, v.19, p. 331-34, 1988.

CARVALHO, I. M. B. S. M. de. **Caracterização genética de raças bovinas autóctones portuguesas. Estudo de polimorfismos protéicos e microssatélites.** Dissertação (Mestrado em Ecologia). 125 f. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2000.

CECCHINI, G. e NIJS, M. D. Literature review on cattle blood polymorphisms and preliminary results of analysis in East African Zebu in Ethiopia. **Agricoltura Subtropicale e Tropicale**, v. 80, p. 433-463, 1986.

CEPICA, S. e STRATIL, A. Further studies on sheep polymorphic erythrocyte diaphorase. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet**, v. 9, p. 239-243, 1978.

CRAWFORD, A. M.; DODDS, K. G.; EDE, A. J.; PIERSON, C. A.; MONTGOMERY, G. W.; GARMONSWAY, H. G.; BEATTIE, A. E.; DAVIES, K.; MADDOX, J. F.; KAPPES, S. W.; STONE, R. T.; NGUYEN, T. C.; PENTY, J. M.; LORD, E. A.; BROOM, J.; BUITKAMP, E.; J.; SCHWAIGER, W.; EPPLIN, J. T.; MATTHEW, P.; MATTHEWS, M. E.; HULME, D. J.; BEH, K. J.; MCGRAW, R. A.; BEATTIE, C. W. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, v. 140, p. 703-724, 1995.

DEL LAMA, S. N. **Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismo protéico e grupos sanguíneos.** Tese (Doutorado em Genética). 207 f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1991.

DEVENDRA, C. Improvement of small ruminant production system in rainfed agroecological zones of Asia. **Annals of Arid Zone**, v. 37, n. 3, p. 215-232, 1998.

DEZA, C.; Perez, G. T.; GARDENAL, C.N.; VARELA, L.; VILLAR, M.; RUBIALES, S.; BARIOGLIO, C. Protein polymorphism in native goats from central Argentina. **Small Ruminant Research**, v. 35, p. 195-201, 2000.

SILVA, R.C. B.

EDE, A. J. e CRAWFORD, A. M. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the glycine- and tyrosine-rich keratin locus (KAP8) prevent the amplification of some alleles. **Animal Genetics**, v. 26, p. 43-44, 1995.

EFREMOV, G. e BRAEND, M. Haemoglobins, transferrins and albumins of sheep and goats. In: EUROPEAN CONFERENCE ON ANIMAL BLOOD GROUPS AND POLYMORPHISM, 9, Prague, **Proceedings...** Prague, p. 313-320, 1964.

ERHARDT, G. e SIMIANER, H. Linkage between the loci for serum albumin and vitamin D binding protein (GC) in sheep. **Animal Genetics**, v. 24, p. 301-303, 1993.

FERRAND, N. **Variação genética de proteínas em populações de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*) – Análise da diferenciação subespecífica, subestruturação, expansão geográfica e domesticação.** Tese (Doutorado em Biologia). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 1995.

FERRAND, N. e ROCHA, J. Demonstration of serum albumin (ALB) polymorphism in wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by means of isoelectric focusing. **Animal Genetics**, v. 23, p. 275-278, 1992.

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1996.

GRAY, G. D. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. **Vet. Parasitology**, v. 72, p. 345-366, 1997.

GUNDEL, H. e REETZ, I. Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphisms in dogs. **Anim Blood Groups Biochem Genet.** v. 12, p. 123-132, 1981.

HALL, S. J. G. e BRADLEY, D. G. Conserving livestock breed biodiversity. **Trends Ecology Evolution**, v. 10, n. 7, p. 267-270, 1995.

HARRIS, H. e HOPKINSON, D. A. **Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics.** North-Holland, Amsterdam, 1976.

HARRIS, H. e WARREN, F. L. Occurrence of electrophoretically distinct haemoglobins in ruminants. **Biochemical Journal**, v. 14, p. 60, 1955.

HENKES, L. E. **Investigação da variabilidade genética em um rebanho ovino Rommey Marsh Booroola.** Dissertação de Mestrado. 127 f. Universidade Federal do Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1992.

HENKES, L. E.; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H. L. P.; MORAES, J. C. F. Genetic characterization of the “Crioula Lanada” sheep from southern Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, n. 2, p. 449-455, 1993.

HENKES, L. E.; WEIMER, T. A.; MORAES, J. C. F. Biochemical in sheep and their potential use for potential use for paternity tests. **Ciência Rural**, v. 24, p. 579, 1994.

SILVA, R.C. B.

IGARASHI, M. L. S. de P. **Variabilidade genética em caprinos de rebanhos do Nordeste brasileiro**. Tese (Doutorado em Ciências: Genética). 83f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

JAMIESON, A. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing fullsib pair members. **Animal Genetics**, v. 25 (supplement 1), p. 37, 1994.

JEFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

KILGOUR, L.; DIXON, S. C.; TUCKER, E. M. Two new sheep haemoglobins, one of which is replaced by hemoglobin C in anemia. **Animal Genetics**, v. 21, p. 115-121, 1990.

KRISTJANSSON, F. K. Genetics control of two pre-albumins pigs. **Genetics**, v. 48, p. 1059-1063, 1963.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **(DISPAN) Molecular Evolutionary Analysis-MEGA**. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University Park, 1993.

LARA, M. A. C. e CONTEL, E. P. B. A new allele of peptidase-B in cattle. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.1, p. 9-12, 1997.

LARA, M. A.; SERRANO, J. R. B.; MAZZA, MC. M.; CONTEL, E. P. B. Investigação de variabilidade genética em bovinos Pantaneiros através de polimorfismo de proteínas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, Juiz de Fora, 1997. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 3, p. 59-61, 1997.

LARA M. A. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento**. Tese de Doutorado. 215f. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

LARA, M. A. C.; CUNHA, E. A.; VERÍSSIMO, L. E.; SANTOS, E.; BUENO, M. S. Caracterización genética de razas ovinas com el empleo de polimorfismos de proteínas. **Archivo Latinoamericano Producción Animal**, v. 12 (Suplemento. 1), p. 35-41, 2004.

LARA, M. A. C.; CONTEL, E. P. B.; SERENO, J. R. B. Caracterización genética de poblaciones cebuínas através de marcadores moleculares. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, p. 295-303, 2005.

LIPPI, A. e MORTARI, N. Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga marchador and Mangalarga (Equus caballus). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 403, 2003.

LOUIS, E. J. e DEMPSTERS, E. R. A exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. **Biometrics**, v. 43, p. 808-811, 1987.

MACHUGH, D. E. **Molecular biogeography and genetic structure of domesticated Cattle**. (Ph. D. Thesis). University of Dublin, 1996.

SILVA, R.C. B.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

MARCÍLIO, M. L. O Sertão pecuário na época colonial. In: SILVA, S. V. (ORG). **A igreja e a questão agrária do Nordeste**. Ed. Paulinas, São Paulo: Subsídios históricos São Paulo, p. 12, 1986.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. Situação Atual da conservação de Recursos Genéticos de Animais do Brasil. In. **FITHE GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOUC**E, Palestras CD Room; 20-24, Novembro, Brasília, 2000.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, B. e PEMBERTON, M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639, 1998.

MARTÍNEZ, J. M. **Inmunogenética Animal**. Editora Científico – Técnica, Ciudad de la Habana, Cuba, 245 p., 1985.

MARTÍNEZ, M. A.; VEGA-PLA, J. L.; BRAVO, M. J.; CARABALLO, J.; DELGADO, J. V. Caracterización genética de la oveja Palmera com microsátélites. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 206-207, p. 363-367, 2005.

MEDEIROS, G. R. **Efeito dos níveis de concentrado sobre o desempenho, características de carcaça e componentes não carcaça de ovinos Morada Nova em confinamento**. Tese de Doutorado. 109 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

MENEZES, H. Contribuição da caprinocultura no povoamento do sertão. In MENEZES H CAMARA, V. MOTA, PARAHYM, COSTA FILHO, G. A. **O bode no Brasil**. Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisa Sociais – IJNP/MEC. Recife, vol. Único, p. 38-49. Ministério da Agricultura. Pecuária. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/> Acesso em 15/01/2007.

MENRAD, M.; STIER, C. H.; GELDERMANN, H.; GALL, C.F. A study on the Changthangi pashmina and the Bakerwali goat breeds in Kashmir. I. Analysis of blood protein polymorphisms and genetic variability within and between the populations. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 3-14, 2002.

MILLER, I. e GEMEINER, M. Peculiarities in electrophoresis behavior of different serum albumins. **Electrophoresis**, v. 14, p. 1317, 1993.

MOIOLI, B.; NAPOLITANO, F.; ORRÙ, L.; CATILLO, G. Analysis of the genetic diversity between Gentile di Puglia, Sopravissana and Sarda sheep breeds using microsatellite markers. Ital. **Journal of Animal Science**. vol. 5, p. 73-78, 2006.

MORERA, L.; LLANES, D.; BARBANCHO, M.; RODERO, A. Genetic polymorphism in Spanish Merino sheep. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.** v. 14, p. 77-82, 1983.

NEI, M., Genetics distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

SILVA, R.C. B.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, N. Y, USA, 1987.

NGUYEN, C. T. e BUNCH, T. D. Blood groups and evolutionary relationships among domestic sheep, domestic goat, Aoudad and European Mouflon. **Ann. Genet. Sel. Anim.**, v. 12, p. 169-180, 1980.

OGDEN, A. L. Biochemical polymorphism in farm animals. **Animal Breeds. Abs.** v. 29, p. 127-138, 1961.

OLIVEIRA, J. C. V. **Caracterização e perfil etnológico de rebanhos caprinos nos municípios de Ibimirim e Serra Talhada, estado de Pernambuco**. Dissertação (mestrado em Zootecnia). 58f. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

PÍFFERO, P. **Ovinos uma visão geral**. Disponível em <http://www.web.rural.com.br/> Acesso em 02/02/2007.

PORTER, V. **Goats of the World**. London: Farming Press. p. 151-156. 1996.

RAHMAN, M. F. e KONUK, T. A. A Note on Transferrin and R-O-1 Polymorphism in Sheep, Anim. Blood Groups. **Biochemical Genetics**, v. 7, p. 147-155, 1976.

RANDO, A.; RAMUNNO, L.; MASINA, P. Variation in the Number of α -Globin Loci in Sheep. The University of Chicago. **Molecular Biology and Evolution**, v. 3, n. 2, p.168-176, 1986.

RASMUSEN, B. A. e TUCKER, E. M. Transferrin types and reproduction in sheep. **Anim Blood Groups Biochem Genet.** v. 4, n. 4, p. 207-20, 1973.

RAYMOND, M. e ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumeinism. **J. Hered.**, v. 86, p. 248-249, 1995.

ROCHA, L. L. **Caracterização genética e morfoestrutural de caprinos da raça Moxotó nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte**. Dissertação (mestrado em Zootecnia). 99f. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

SANTOS, R. **A cabra e a ovelha no Brasil**. Editora Agropecuária Tropical Ltda. Uberaba – MG. Minas Gerais, 2003.

SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, B. T. F.; SALZANO, F. M. Transferrin and albumin polymorphisms in buffaloes from Brazil. **Animal Genetics**, v. 21, p. 335-337, 1990.

SHIMIZU, K e TAKENAKA, O. DNA Polymorphisms in the α -Globin gene regions in Asian Macaques. **Biochemical Genetics**, v. 29, p. 189-202, 1991.

SILVA, R.C. B.

SOTOMAIOR, C. S. e THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes aos helmintos gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 51-55, 1998.

STORMONT, C. e SUZUKI, Y. Genetic control of albumin phenotypes in horses. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 144, p. 673-675, 1963.

SUN, H. S.; BARENDESE, W.; KIRPATRICK, B. M. "UWCA 46" a polymorphic bovine microsatellite marker. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1530, 1995.

TAUTZ, D. e SCHLÖTTERER, C. Simple sequences. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 4, p. 832-837, 1994.

TOMASCO, I.; WLASIUK, G.; LESSA, E. P. Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 37-41, 2002.

TUCKER, E. M.; DENIS, B.; KILGOUR, L. Blood genetic marker studies of a sheep-goat hybrid and its back-cross offspring. **Animal Genetics**, v. 20, p. 179-186, 1983.

VAL, A. L.; SCHWANTES, A. R.; SCHWANTES, M. L. Amido de hidrolisado de milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 7, p. 992-996, 1981.

VASKOV, B. e EFREMOV, G. Fourth Hemoglobin Type in Sheep. Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Skopje, Yugoslavia. **Nature**, v. 216, p. 593-594, 1967.

VESTRI, R.; CREMA, C.; MARINUCCI, M.; GIORDANO, P. C.; BERNINI, L. F. Possible duplication of the hemoglobin a chain locus in sheep. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 625, p. 328-336, 1980.

VESTRI, R.; SALMASO, S.; CONDO, S. G.; ANTONINI, E. Distribution and respiratory properties of sheep hemoglobins A and B containing the II alphaHis chain. **Hemoglobin**, v. 5, n. 4, p. 391-402, 1981. Disponível em [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) / Acesso em 20/01/2007.

WEIR, B. S. e COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

ZAMORANO, M. J.; RUITER, J.; TOWNSEND, S.; CRUICKSHANK, R.; BRUFORD, M., BYRNE, K.; RODERO, A.; VEGA-PLA, J.L. Polimorfismos de DNA en las razas ovinas Merino y Churra Lebrijana. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, p. 267-272, 1998.

ZAMORANO, M. J.; RUITER, J.; RODERO, A.; VEGA-PLA, J.L. Análisis genético de marcadores microsatélites en dos poblaciones de la raza bovina Berrenda en Negro. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, p. 195-200, 1998.

ZEPEDA, D.J.S, **Caracterización Etnológica de las Cabras Criollas del Sul de Puebla (México)**. Tese (Douctorado em Veterinária). 321 f. Faculdade de Veterinária, Universidade de Córdoba, Córdoba – Espanha, 2000.