

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CÃES
DA RAÇA VEADEIRO PAMPEANO

DANIELE DE CASTRO DE MENEZES

CANOAS 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CÃES
DA RAÇA VEADEIRO PAMPEANO

Dissertação elaborada para a
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Toxicologia Aplicada

DANIELE DE CASTRO DE MENEZES

Orientador (a): Dra Tania de Azevedo Weimer

CANOAS 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos senhores proprietários dos canis de Veadeiro Pampeano Carlos Bacelar (in memorian) e à Adonize Bonneto pela oportunidade de conhecer e trabalhar com estes cães.

Agradeço a todos que estiveram junto comigo durante o desenvolvimento deste trabalho, familiares, meus professores e orientadores Tania Weimer e Daniel Passos, colegas de laboratório e amigos.

Este trabalho foi financiado por CNPq, FAPERGS e ULBRA.

RESUMO

Marcadores moleculares do tipo Short Tandem Repeat (STR) ou microssatélites, são unidades de repetições de 2 a 6 pares de bases, apresentando herança genética direta, sem influência ambiental. Estes sistemas têm sido eficientemente usados, em diferentes táxons, para análises de diversidade genética, identificação individual, e estimar distâncias genéticas entre as espécies, raças ou populações. Os STRs PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ10, PEZ12, PEZ15, PEZ17 e FHC2054 foram analisados em amostras de cães da raça Veadeiro Pampeano para avaliar a diversidade genética, compará-los com outras raças e estimar a probabilidade destes marcadores na identificação individual e exclusão de paternidade. O Veadeiro Pampeano é uma raça do Sul do Brasil que apresenta pelagem curta e coloração clara e é usado principalmente como cão de caça. Eles são animais dóceis, leais e bons cães de companhia. As amostras foram obtidas em dois canis, Infinitu's Kennel, de Porto Alegre (30° 02' S, 51° 13' W; n=23) e Nhãndu Kennel, de Barra do Ribeiro (30°17' S, 51°17' W; n=14). Todos os STRs foram analisados pela PCR usando *primers* específicos. A variabilidade genética foi alta nos dois canis sendo um pouco menor nos animais do Nhãndu Kennel, provavelmente devido ao seu tamanho amostral menor. Os parâmetros de diversidade genética (número de alelos, heterozigosidade esperada e conteúdo de informação polimórfica) foram mais altos em Veadeiro Pampeano comparados com outras raças de caça, bem como com outras raças de diferentes aptidões. Isto reflete a grande preocupação dos criadores em selecionar animais não consanguíneos para criação de seus canis. Os marcadores analisados mostraram alta eficiência no controle de paternidade (aproximadamente 100%) e para identificação individual, cujos valores foram iguais a $2,3 \times 10^{-11}$ no Infinitu's Kennel

e $1,3 \times 10^{-10}$ em Nhãndu Kennel. O alto grau de diversidade genética apresentado pelo Veadeiro Pampeano comparado com a raça Ibizan Hound parece excluir a hipótese de que esta última poderia ser o possível ancestral do Veadeiro Pampeano. Alternativamente, é possível que tenha havido uma grande perda da diversidade em Ibizan Hound após a divergência destas duas raças.

ABSTRACT

Short Tandem Repeat markers (STRs) are nucleotide repeat units, 2 to 6 bases in length, of direct genetic inheritance, and that do not suffer environment influence. These systems have been successfully used in genetic diversity analyses to identify individuals and to estimate genetic relationships between species, breeds or populations for different taxa. PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ10, PEZ12, PEZ15, PEZ17 and FHC2054 STRs were analyzed in samples of Veadeiro Pampeano dog breed in order to evaluate genetic diversity, to compare with that of other dog breeds, and to estimate the probability of these markers for individual identification and parentage exclusion. Veadeiro Pampeano is a dog breed from South Brazil with clear-cut lines and light pigment, and employed primarily as a hunting dog. They are even-tempered animals, quite loyal and giving, and enjoy human companionship. Samples were obtained in two different kennels, Infinitu's Kennel, from Porto Alegre (30° 02' S, 51° 13' W; n=23) and Nhãndu Kennel, from Barra do Ribeiro (30°17' S, 51°17' W; n=14). All STRs were PCR-analyzed by standard methods, with specific primers. Genetic variability was high in both kennels though somewhat smaller in Nhãndu's animals, probably due to that kennel's smaller sample size used. Genetic diversity parameters (mean number of alleles, expected heterozygosity and polymorphic information content) were higher in Veadeiro Pampeano as compared with other hunter dog breeds and with dog breeds of different aptitudes. This probably reflects the deep concern of breeders in selecting non-consanguineous animals for foundation stocks of their kennels. The markers analyzed showed considerable efficiency in parental control (about 100%) and in individual identification, whose value was 2.3×10^{-11} in Infinitu's Kennel and 1.3×10^{-10} in Nhãndu Kennel. The high genetic diversity degree

presented by Veadeiro Pampeano compared with that of Ibizaian Hound breed seems to rule out the hypothesis that this last breed could be the possible ancestral of Veadeiro Pampeano. Alternatively, it is possible that there was a great loss of Ibizaian Hound diversity after these two breeds diverged.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Marcadores Moleculares.....	9
1.2 Cães: Domesticação e Formação de Raças.....	15
1.3 A Raça Veadeiro Pampeano.....	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Amostra.....	21
3.2 Delineamento Experimental	21
3.3 Análise Estatística	23
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Marcadores Moleculares

Desde meados da década de 80, quando começaram a surgir as técnicas de análise de DNA, iniciou-se uma grande revolução no campo da Genética e Biologia Molecular. As descobertas a respeito do fluxo da informação biológica, sua composição, organização e função cresceram exponencialmente. Hoje nos é permitido o estudo de regiões codificantes (exons) e não codificantes (introns) do DNA, bem como de seus polimorfismos, graças ao grande número de ferramentas disponíveis.

Os marcadores moleculares são alterações na cadeia de DNA, com herança mendeliana simples, de fácil reconhecimento e que não são influenciados pelo meio ambiente, podendo ser utilizados para avaliar as diferenças genéticas entre indivíduos, populações, raças ou espécies. Considera-se, de forma geral, que os marcadores analisados diretamente no DNA são melhores que os analisados por métodos sorológicos, pois não precisam material fresco ou em grandes quantidades para se trabalhar, podendo-se valer mesmo de amostras em decomposição, ou de material fóssil, mantendo ainda alta sensibilidade e reprodutibilidade, uma vez que o DNA é mais estável (Cavalli, 2003).

Existem diferentes metodologias empregadas para o estudo dos marcadores moleculares e a maioria delas está, atualmente, baseada na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction). A PCR permite a amplificação do material

genético “in vitro” utilizando a enzima DNA polimerase para copiar uma seqüência específica de DNA em ciclos repetidos de duplicação (Alberts *et al.*, 1995). Para execução de uma reação, que simula a duplicação de DNA “in vivo”, são necessários pequenos oligonucleotídeos sintéticos que servem como iniciadores (primers) para reação de polimerização, os nucleotídeos presentes no DNA (A,T,G e C), uma solução tampão, co-fatores da reação e uma enzima (DNA polimerase termoestável) reunidos em um microtubo de ensaio, juntamente com uma amostra do DNA alvo.

Seguem-se então ciclos sucessivos de desnaturação, anelamento dos iniciadores e síntese de uma nova fita de DNA, com alternância de temperatura em cada etapa dos ciclos. Normalmente estes passos são repetidos por volta de 30 - 40 vezes, obtendo-se, no final, grande quantidade de produto amplificado, a partir de uma pequena amostra inicial.

A técnica foi descrita no início da década de 80, e revolucionou a biologia molecular, pois permitiu aumento na eficiência de detecção de variantes de DNA e RNA com redução de tempo, custos e complexidade na execução dos experimentos (Matiolli & Passos-Bueno, 2001). É uma técnica que pode ser realizada com pequena quantidade de amostra devido a sua alta sensibilidade, sendo também uma metodologia rápida e com repetibilidade, podendo-se analisar simultaneamente um grande número de amostras.

O método pode ser utilizado para detecção de patógenos, na análise de seqüências gênicas, na identificação de amostras, no diagnóstico de doenças genéticas e em Medicina Legal. Dentre os muitos marcadores moleculares existentes, os microssatélites ou STRs apresentam regiões repetidas em tandem, de 2 -6 pares de base (pb), e segundo Li *et al.* (2004) estão distribuídas em diferentes regiões do genoma de eucariotos tanto em seqüências que codificam proteínas, como em regiões promotoras, em introns e em regiões flanqueadoras e não traduzidas dos genes (UTRs) apresentando herança co-dominante e alto grau de variabilidade dentro e entre populações. A taxa de mutação nestas seqüências repetitivas é, em geral, 10 a 100 vezes maior do que outras regiões do genoma, fazendo com que sejam consideradas, portanto,

seqüências de alta taxa evolutiva (Chaves, 2002). São marcadores que podem ser analisados por PCR onde, para amplificação dos fragmentos, utilizam-se primers específicos que são complementares às regiões que flanqueiam o microssatélite em questão, sendo deste modo, necessário o conhecimento prévio de regiões do DNA para cada espécie.

O polimorfismo é resultante da presença de números variáveis desses elementos repetitivos. Essas repetições ocorrem com frequência significativa nas regiões promotoras dos genes, sugerindo que possam estar envolvidas com a regulação gênica (Cavalli, 2003).

Os microssatélites, devido a sua alta variabilidade e dispersão, têm sido eleitos como ótimos marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética intra e inter populacional, para estudos de diferenciação entre raças, para a identificação de amostras de sêmen, em inseminações artificiais, para estudos de controle de paternidade, onde tem sido possível a obtenção de índices de exclusão de até 99,99% para resolução de casos de abigeato, para estudos filogenéticos (Giovambattista *et al.*, 2001; Morera *et al.*, 1999), e como ferramenta no mapeamento genético, devido ao seu alto conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Ichikawa *et al.*, 2001).

Os microssatélites têm sido de grande valia também para Seleção Assistida por Marcadores (MAS) em espécies de interesse econômico. Essa metodologia se baseia no uso de marcadores para identificar, precocemente, indivíduos mais produtivos, permitindo selecionar aqueles com genótipos favoráveis, em um menor intervalo de tempo e a custos reduzidos (Rocha *et al.*, 2003).

Tem ocorrido um grande avanço no desenvolvimento de projetos de estudo do genoma de diferentes espécies, como o do Genoma Humano, e o de outros organismos de interesse econômico e biológico. As informações resultantes deste tipo de trabalho têm grande aplicação em várias áreas do conhecimento, tais como medicina, medicina veterinária e agronomia, sendo mesmo possível a extrapolação de informações entre espécies, como é o caso

do uso de dados genéticos, provenientes do projeto Genoma Humano, aplicados à prática veterinária.

Do mesmo modo que em outros organismos, o Projeto Genoma Canino está sendo desenvolvido e envolvendo três etapas, o mapeamento dos marcadores, a localização dos genes nos cromossomos e a obtenção das seqüências de nucleotídeos (Meyers-Wallen, 2001).

Lindblad –Toh *et al.* (2005), publicaram um rascunho do genoma de uma fêmea da raça Boxer que teve seu DNA seqüenciado um ano após seu início, além de outras dez raças amostradas para formação de um mapa de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) com a intenção de comparar diferenças entre as populações caninas.

Conforme novas descobertas são feitas nesta área, maior o volume de informações à disposição dos médicos veterinários e pesquisadores, melhor a compreensão sobre os fatores genéticos e ambientais e suas interações envolvidas na gênese de doenças, maior o conhecimento sobre a transmissão de genes de uma geração à outra, e melhor qualidade de atendimento pode ser dada aos animais por parte dos veterinários (Meyers-Wallen, 2001).

As informações do Projeto Genoma Canino também estão sendo úteis na construção de mapas de ligação, na elaboração de árvores genealógicas, como auxiliares nas seleções, visando a eliminação de genes deletérios ou a fixação de características de interesse em uma população, na análise de genes relacionados a doenças autossômicas recessivas, com a eliminação de portadores assintomáticos, na identificação individual, no controle de filiação, na diferenciação entre espécies e raças, nas análises comparativas das seqüências de cães com as de outros mamíferos, primatas e roedores e ainda em estudos filogenéticos e evolutivos (DeNise *et al.*, 2004; Irion *et al.*, 2003; Mellersh *et al.*, 1997; Meyers-Wallen, 2001; Lindblad –Toh *et al.*, 2005).

Além disso, os marcadores constituem uma ferramenta importante para o esclarecimento da base genética envolvida na grande diversidade morfológica e comportamental entre as raças de cães, como auxiliares em estudos de segregação e mapeamento de traços quantitativos, e de genes causadores de

doenças herdáveis, principalmente quando essas apresentam ampla distribuição em populações com pool gênico reduzido e onde os entrecruzamentos são comumente praticados para seleção de traços fenotípicos desejáveis (Cañón *et al.*, 2002; Mellersh *et al.*, 1997; Ostrander *et al.*, 1993; Zajc *et al.*, 1997).

Para a elaboração de mapas é necessário escolher dentre os inúmeros marcadores, aqueles que apresentam alto conteúdo polimórfico, maior estabilidade, ampla distribuição no genoma, custos reduzidos e facilidade de análise (Francisco *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 1999).

Assim os microssatélites, seqüências abundantes e altamente repetitivas que formam a base para construção de mapas genéticos em humanos, bovinos e camundongos e que apresentam distribuição similar em cães, diferindo apenas no tamanho das repetições, que, em geral, se mostram mais curtas, seriam também, nessa espécie, ótimas ferramentas de mapeamento. Segundo Francisco *et al.* (1996) que caracterizaram tetranucleotídeos do tipo (GAAA)_n em canídeos e verificaram serem os mesmos bastante úteis para análise de mapeamento, quando comparados a outros marcadores.

De acordo com Francisco *et al.* (1996) e Ostrander *et al.* (1993) para construção de mapas genéticos para canídeos, o conjunto de marcadores deve ser da ordem de 350 a 400, com distâncias entre eles igual ou inferior a de 10cM.

No entanto, devido ao grande número de informações obtidas com o uso de microssatélites, há a necessidade de padronização de técnicas para a análise destes marcadores, de conjuntos de marcadores a serem usados para cada espécie, assim como de intercâmbio de informações entre laboratórios. Neste sentido, a Sociedade Internacional de Genética Animal (International Society for Animal Genetics, ISAG) e a Organização para Agricultura e Alimentos (Food and Agriculture Organization, FAO) estão trabalhando na padronização e seleção de marcadores a serem empregados, nas diferentes espécies de animais domésticos (cães, gatos, ovelhas, cabras), em estudos de identificação e em trabalhos de investigação sobre diversidade genética entre raças (Cañón *et al.*, 2002; Giovambattista *et al.*, 2001). Atualmente marcadores específicos descritos

em caninos tem sido alvo de estudos para padronização de suas nomenclaturas (Hellman *et al.*, 2006) em âmbito internacional baseado em seu número variável de repetições em tandem seguindo as normas da International Society of Forensic Haemogenetics (ISFH) para STRs humanos.

Vários autores têm utilizado os microssatélites na avaliação da diversidade genética e de relações evolutivas de cães. Assim, por exemplo, Dolf *et al.* (2000) compararam lobos italianos (*Canis lupus*) e cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), separando-os em grupos distintos e Irion *et al.* (2003) analisaram a diversidade genética presente dentro e entre 28 diferentes raças com o uso de 100 microssatélites dispersos pelo genoma canídeo, demonstrando a ocorrência de um padrão complexo de subestrutura populacional.

A variabilidade dos microssatélites dentro e entre três diferentes raças e a estimativa da distância genética entre estas foi, também, alvo do estudo de Zajc *et al.* (1997), que utilizaram dezenove marcadores altamente polimórficos em Pastor Alemão, Greyhound e Labrador. As três raças diferiram na distribuição dos alelos e em sua frequência relativa dentro e entre loci. A distância genética foi maior entre Greyhound e Pastor Alemão do que entre Greyhound e Labrador ou Labrador e Pastor Alemão. Os autores observaram, também, uma redução da variação intrapopulacional nessas raças comparadas a 15 outras distintas. Posteriormente, Zajc *et al.* (1999) avaliaram as relações de parentesco entre as mesmas raças citadas acima. Os marcadores utilizados provaram sua utilidade para a avaliação da estrutura das populações, relações evolutivas entre as diferentes raças e relações entre membros aparentados de uma mesma raça.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, Irion *et al.* (2005) investigaram cães de rua, da ilha de Bali, quanto a 31 microssatélites, comparando-os aos Dingos Australianos e a 28 raças americanas. Os autores observaram que os cães da ilha apresentam alta diversidade, com maior número de alelos e alta heterozigotidade, embora compartilhem alelos com o Dingo Australiano e o Chow-Chow; além disso, os cães de Bali são mais proximamente relacionados

aos do leste da Ásia, indicando pouca interferência de cães europeus nesta raça, desde seu surgimento.

Além de estudos de diversidade, a análise de identificação individual, de controle de filiação ou controle de pedigrees tem recebido grande atenção por parte dos pesquisadores, visando evitar estimativas errôneas no delineamento de árvores genealógicas. Questões sobre identidade biológica têm, assim, sido resolvidas valendo-se dos microssatélites, em função de sua grande reprodutibilidade, conteúdo informativo e robustez de ensaio (Oliveira *et al.*, 2002). O tipo de herança mendeliana destes marcadores prevê que os dois alelos portados por um indivíduo devem vir obrigatoriamente um de cada progenitor, de modo que, é possível fazer análises de exclusão de paternidade descartando ou não a linha de parentesco (Cañón, 2002). Dentro deste enfoque, DeNise *et al.* (2004) desenvolveram dois conjuntos de marcadores, totalizando 17 microssatélites, que apresentaram grande poder de exclusão de paternidade e de identificação de indivíduos, em um grupo de 108 diferentes raças de cães. Os conjuntos, combinados, excederam o valor de 99% no poder de exclusão, salientando sua utilidade para os criadores, no registro de raças, particularmente quando não existe conhecimento sobre o animal, ou quando sua identidade foi perdida.

Como os marcadores microssatélites apresentam freqüentes eventos mutacionais, ocorrendo maior taxa de mutação nos de quatro nucleotídeos (tetranucleotídeos) que nos dinucleotídeos ou trinucleotídeos, Cañón *et al.* (2002) sugeriram que, no caso de, em uma verificação de paternidade, haver incompatibilidade de um único marcador, deve-se verificar a procedência da exclusão, e eliminar-se a possibilidade dessa única exclusão ser resultado da ocorrência de um novo evento mutacional.

1.2 Cães: Domesticação e Formação de Raças

Os cães foram domesticados a partir de lobos cinza (*Canis lupus*), uma espécie de distribuição mundial, e as evidências filogenéticas sugerem a origem

da domesticação há aproximadamente 15.000 anos, no velho mundo. No novo mundo, há indicações de que os cães domésticos foram, ou trazidos pelas populações humanas primitivas que cruzaram o estreito de Bering no final do Pleistoceno, ou resultaram de domesticações independentes, no novo continente (Leonard *et al.*, 2002; Savolainen *et al.*, 2002).

A maioria das raças atuais é resultante de eventos recentes de intensos processos seletivos feitos pelo homem nos últimos 300 anos (Schelling *et al.*, 2005), com algumas exceções, como a raça Chow-Chow, que data de aproximadamente 2.000 anos (Irion *et al.*, 2003). Todas as raças resultam de seleção direcional para traços fenotípicos específicos, tais como tamanho, cor e tipo de pelagem, comportamento e utilidade. Este processo acabou gerando o inúmero contingente de raças, todas bastante homogêneas e, se não forem tomados os cuidados necessários em programas de melhoramento, pode haver grande perda da variabilidade genética dentro da espécie (Irion *et al.*, 2003). A partir do século XIX, com o surgimento dos clubes de criadores, o isolamento reprodutivo entre as raças se tornou formalizado, já que nenhum animal pode ser registrado como membro de uma determinada raça se os pais não o forem. Ocorre assim, uma forte barreira e isolamento reprodutivo entre raças (Parker *et al.*, 2004). Através desta seleção direcional há um aumento considerável de cruzamento intra-racial gerando um crescimento do risco de doenças com componente genético, como alguns tipos de câncer, catarata, epilepsia, surdez, entre outras que também acometem seres humanos, fazendo do cão um ótimo modelo para estudos dessas patologias e dos fatores genéticos envolvidos, bem como para desenvolvimento de possíveis tratamentos (Lindblad –Toh *et al.*, 2005).

1.3 A Raça Veadeiro Pampeano

Atualmente entre as raças relacionadas no Kennel clube do Brasil, algumas não tem reconhecimento pela Federação Cinológica Internacional como é o caso dos Veadeiros Pampeanos, que são cães classificados pela Confederação Brasileira de Cinofilia como uma raça reconhecida somente no

Brasil, juntamente com o Fox Paulistinha e o Fila Brasileiro. <<http://www.cbkc.org/padroes/grupo11/veadeirobras>; acesso em 28 outubro 2006>.

Os cães Veadeiros Pampeanos são animais de aparência geral rústica e porte mediano, com a pelagem variando da cor branca ao amarelo, sendo possível a presença de manchas brancas no peito, patas e coleira. Os pêlos são curtos, retos, densos e ásperos, e sua musculatura é forte, denotando capacidade para ataque e defesa. Possuem um temperamento tranquilo sendo bastante dóceis e amigáveis com seus donos e de fácil convívio com crianças, mostrando-se muito obedientes e bons companheiros <<http://www.veadeiropampeano.com.br>; acesso em 28 outubro 2006>.

São utilizados principalmente na caça a animais de pêlo, como veire

construção de uma árvore genealógica e o posterior reconhecimento e registro da raça. Além disso, os criadores pretendem a manutenção do nome Veadeiro Pampeano, já que a raça é também conhecida como Veadeiro Brasileiro em algumas regiões do país, e solicitam também que esta seja reconhecida como sendo uma raça de origem Panamericana <<http://www.veadeiropampeano.com.br>; acesso em 28 outubro 2006>.

Os animais selecionados para a composição de linhagens têm sido identificados com o auxílio de microchips e para a construção dessas linhagens, que devem ter a homogeneidade morfológica da raça, é importante a manutenção da maior diversidade genética possível, que pode ser avaliada através da análise de marcadores moleculares. Dentre os microssatélites já descritos em canídeos, os que foram utilizados neste trabalho apresentaram maior grau de polimorfismos, conteúdo informativo, grau de heterozigotidade e poder de exclusão, sendo os ideais para a estimativa da diversidade genética da raça Veadeiro Pampeano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral caracterizar a raça de cães Veadeiro Pampeano, através do uso de marcadores moleculares.

2.2 Objetivos Específicos

1. Investigar os marcadores microssatélites PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ10, PEZ12, PEZ15, PEZ17 e FHC2054, em cães da raça Veadeiro Pampeano.
2. Estimar a diversidade genética desses animais.
3. Verificar o potencial destes marcadores na determinação de paternidade e identificação individual.
4. Comparar os resultados obtidos com os de outras populações de cães.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram analisados cães da raça Veadeiro Pampeano provenientes dos canis Infinitu's Kennel de Porto Alegre (n=23) e Nhãndu Kennel de Barra do Ribeiro (n=14) no Rio Grande do Sul, para os quais se tinha disponível informação sobre idade, sexo e grau de parentesco de cada indivíduo.

Embora a amostra seja pequena, corresponde à população total dos dois canis identificados na grande Porto Alegre, no decorrer deste trabalho.

3.2 Delineamento Experimental

As amostras de sangue foram coletadas a partir da veia cefálica e armazenadas em tubos com EDTA. A extração de DNA genômico foi realizada seguindo a técnica descrita por Miller *et al.* (1988).

Os microssatélites foram investigados usando pares de *primers* específicos que hibridizam no DNA em regiões flanqueadoras ao marcador e previamente descritos na literatura para cães (PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ10, PEZ12 PEZ15, PEZ17 e FHC2054). Os sistemas foram estudados através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os *primers* que estão apresentados na Tabela 1 e com

as temperaturas de anelamento empregadas, as quais sofreram modificações para adaptar às condições do laboratório e diferem das citadas na literatura.

TABELA 1. Seqüências de primers e Temperatura de anelamento (TA).

Marcador	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	TA (C°)
PEZ03 ¹	5'CACTTCTCATACCCAGACTC3'	5'CAATATGTCAACTATACTTC3'	55°
PEZ06 ¹	5'ATGAGCACTGGGTGTTATAC3'	5'ACACAATTGCATTGTCAAAC3'	58°
PEZ08 ¹	5'TATCGACTTTATCACTGTGG3'	5'ATGGAGCCTCATGTCTCATC3'	52°
PEZ10 ¹	5'CCTCATTGAAGTATCTTACC3'	5'CCTGCCTTTGTAAATGTAAG3'	55°
PEZ12 ¹	5'GTAGATTAGATCTCAGGCAG3'	5'TAGGTCCTGGTAGGGTGTGG3'	58°
PEZ15 ¹	5'CTGGGGCTTAACTCCAAGTTC3'	5'CAGTACAGAGTCTGCTTATC3'	58°
PEZ17 ¹	5'CTAAGGGACTGAACTTCTCC3'	5'GTGGAACCTGCTTAAGATTC3'	58°
FCC2054 ²	5'GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG3'	5'ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC3'	58°

¹ Seqüências de *primers* descritas por J.Halverson (1995).

² Francisco *et al.* (1996).

Todos os marcadores foram amplificados nas seguintes condições: Tampão 10x para enzima TaqDNA Polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 0,2µM de cada dNTP (Promega), 4pmol de cada *primer* e 5U de Taq DNA Polimerase (Promega), e a amostra do DNA alvo.

Os protocolos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial de 94° por 5 minutos, 35 ciclos de 94° 30 segundos, temperatura de anelamento (ver Tabela 1) por 30 segundos e 72° por 90 segundos, para os marcadores FHC2054, PEZ06, PEZ12, PEZ15, PEZ17 e PEZ08. Para os microssatélites PEZ10 e PEZ03 utilizaram-se 35 ciclos de 94° 20 segundos, 55° 20 segundos e 72° 1 minuto. Para PEZ03 após o término da reação de amplificação acrescentou-se mais 10 minutos a 65° e 5 minutos a 4°, otimizando a qualidade do produto amplificado para uma melhor visualização.

Os genótipos foram determinados através de eletroforese vertical por 24 horas a 180 V, em gel de poliacrilamida 10,5%, não desnaturante corado com nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Utilizaram-se os marcadores de peso

molecular de 25pb em todos os sistemas e 10pb (ambos Promega) apenas para o marcador PEZ03, para determinar os tamanhos dos alelos.

3.3 Análise Estatística

As freqüências gênicas e genótípicas foram determinadas por contagem direta, os parâmetros de diversidade genética [heterozigozidade (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC)] avaliados conforme as fórmulas:

$H_e = 1 - \sum p_i^2$, em que p_i é a freqüência dos diferentes alelos e n é o número de indivíduos analisados; a média entre todos os locos foi obtida pela somatória das H_e dividida pelo total de locos analisados (Nei,1978).

$PIC = 1 - [(\sum p_i^2) - (\sum 2 p_i^2 \cdot p_j^2)]$, em que p_i e p_j são as freqüências de diferentes alelos (Botstein et al.,1980).

A probabilidade de identidade intra (PI) e interpopulacional [PI(e)] foram estimadas conforme Van Zeveren *et al.* (1990 a, b), de acordo com as fórmulas:

$PI = \sum G_{ik}^2$, em que G_{ik} é a probabilidade do genótipo k em um loco i , e

$PI(e) = \sum p_{i1}^2 \times p_{i2}^2 + 4 \sum \sum p_{i1} \times p_{i2} \times p_{j1} \times p_{j2}$, sendo:

p_{i1} = freqüência do alelo i na população 1

p_{i2} = freqüência do alelo i na população 2

p_{j1} = freqüência do alelo j na população 1

p_{j2} = freqüência do alelo j na população 2

A probabilidade de exclusão (P_e) foi avaliada conforme Chakravarti & Li (1983), pela fórmula:

$P_e = a_1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2 \cdot a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$, em que $a_i = \sum p_i$, sendo p as freqüências alélicas. Todos os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Excel para Windows™.

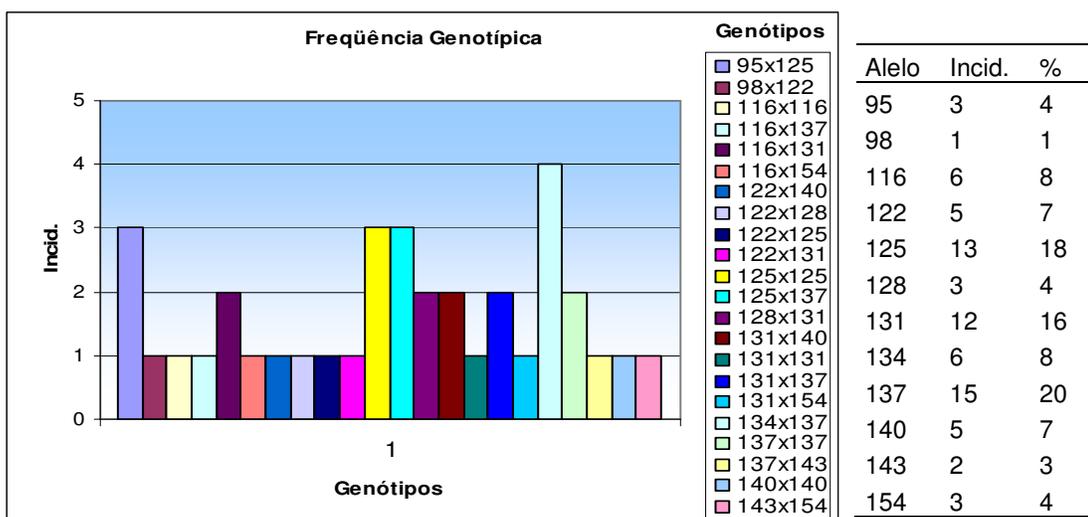
4 RESULTADOS

Os genótipos e freqüências genóticas de todos marcadores estudados estão apresentados nas figuras 1 a 8 e as freqüências gênicas nas tabelas 2 a 9. Devido a problemas de amplificação de algumas das amostras, o número amostral (N) difere entre as tabelas.

A análise do marcador PEZ03 resultou em 22 genótipos (Figura 1), correspondendo a 12 alelos diferentes, com tamanho variando de 95 a 154 pb, sendo os alelos *137 e *98 os mais e menos freqüentes, respectivamente (Tabela 2).

FIGURA 1. Freqüências genóticas do marcador PEZ 03.

TABELA 2. Freqüências alélicas do marcador PEZ 03 (N=37).



O microsatélite PEZ06 apresentou 15 alelos, com tamanhos compreendidos entre 175 e 215 pb, sendo o alelo *191 o mais freqüente e os alelos *175, *179 e *207 mais raros, como mostrado na Tabela 3, totalizando 25 combinações genotípicas (Figura 2).

FIGURA 2. Freqüências genotípicas do marcador PEZ 06.

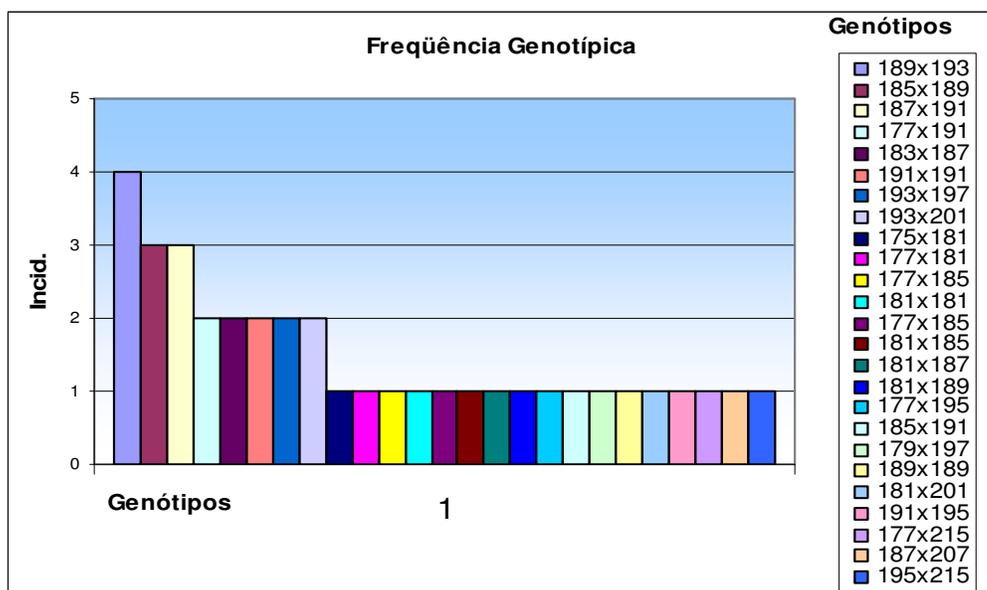


TABELA 3. Freqüências alélicas do marcador PEZ06 (N=37).

Alelo	Incid.	%
175	1	1
177	7	9
179	1	1
181	8	11
183	2	3
185	7	9
187	7	9
189	10	14
191	11	15
193	8	11
195	3	4
197	3	4
201	3	4
207	1	1
215	2	3

O marcador PEZ08 mostrou a presença de 13 alelos, o mais incidente foi o *225 e os mais raros foram *213, *217 e *249 (Tabela 4). O intervalo de variação foi 213 a 254 pb, e as freqüências dos 26 genótipos são mostradas na Figura 3.

FIGURA 3. Freqüências genotípicas do marcador PEZ 08.

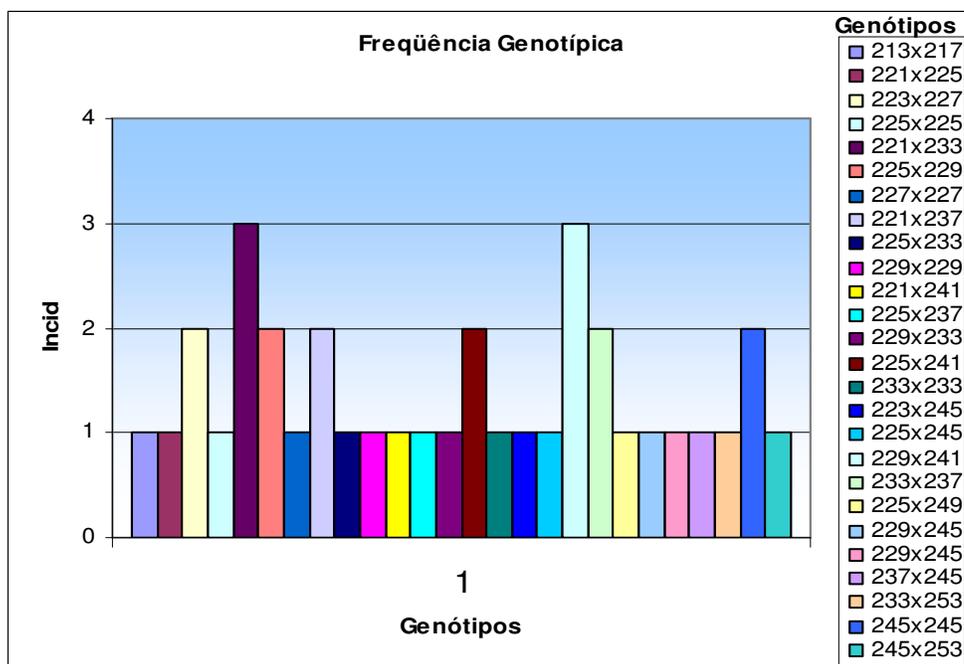


TABELA 4. Freqüências alélicas do marcador PEZ08 (N=36).

Alelo	Incid.	%
213	1	1
217	1	1
221	7	10
223	3	4
225	11	15
227	4	6
229	10	14
233	10	14
237	6	8
241	6	8
245	10	14
249	1	1
253	2	3

PEZ10 apresentou 12 alelos no intervalo de 292 a 332 pb (Tabela 5), com o mais comum o de 312 pb e os mais raros os de 314, 326 e 332 pb. Foram observadas 21 combinações genóticas (Figura 4).

FIGURA 4. Frequências genóticas do marcador PEZ 10.

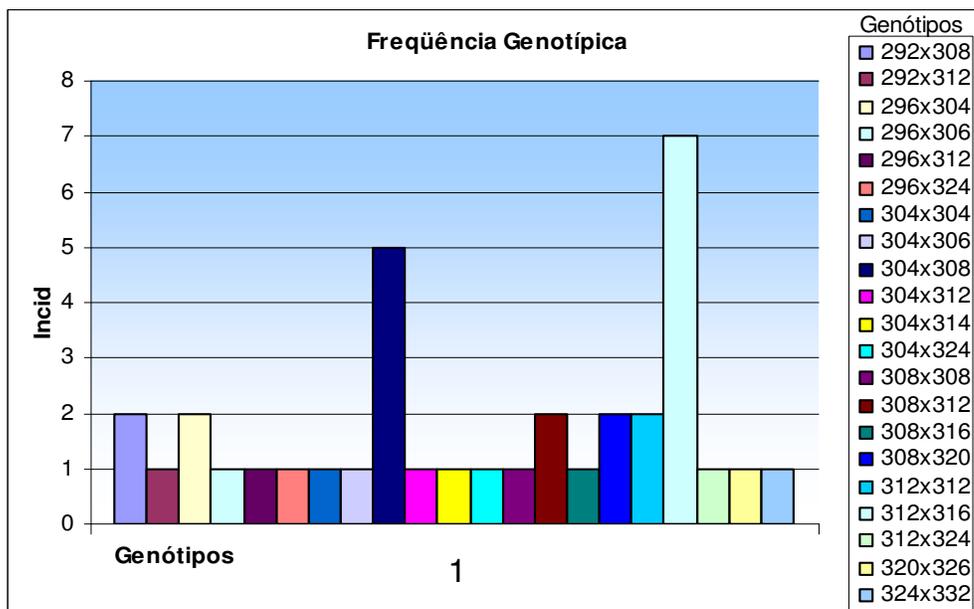
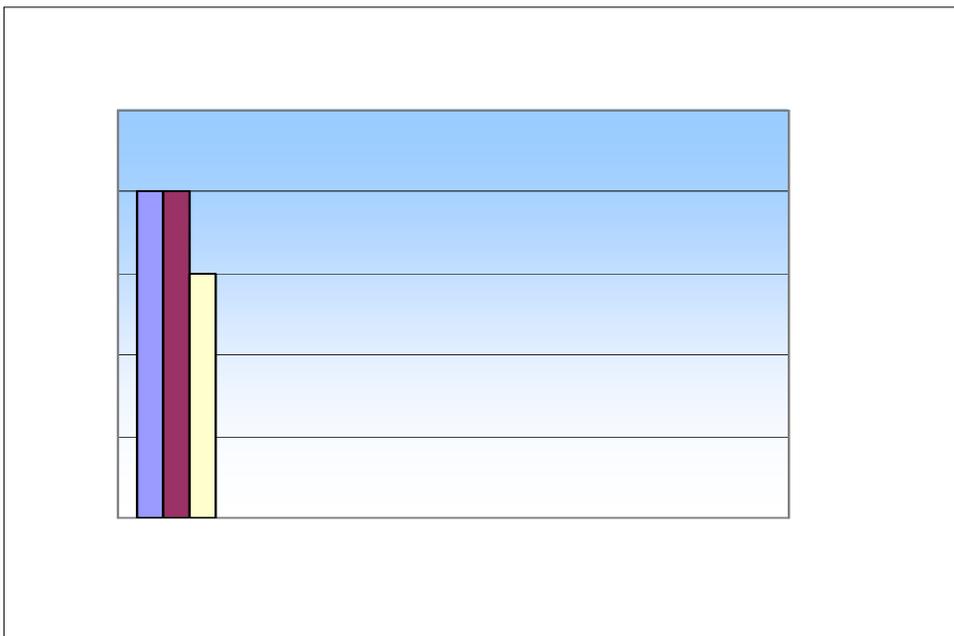


TABELA 5. Frequência alélicas do marcador PEZ10 (N=36).

Alelo	Incid.	%
292	3	4
296	5	7
304	13	18
306	2	3
308	14	19
312	17	24
314	1	1
316	8	11
320	3	4
324	4	6
326	1	1
332	1	1

Para o marcador PEZ12 foram encontrados 11 alelos com intervalos entre 271 e 319 pb, com o alelo *295 sendo o mais freqüente e o *303 o menos freqüente (Tabela 6), com 24 combinações genotípicas (Figura 5).

FIGURA 5. Freqüências genotípicas do marcador PEZ 12.



No microssatélite PEZ15 detectou-se a presença de 17 combinações de genótipos (Figura 6), correspondendo a 10 alelos, de 205 a 241 pb (Tabela 7). O alelo *225 teve a mais alta incidência e os alelos *219, *237 e *241 a menor.

FIGURA 6. Frequências genotípicas do marcador PEZ 15.

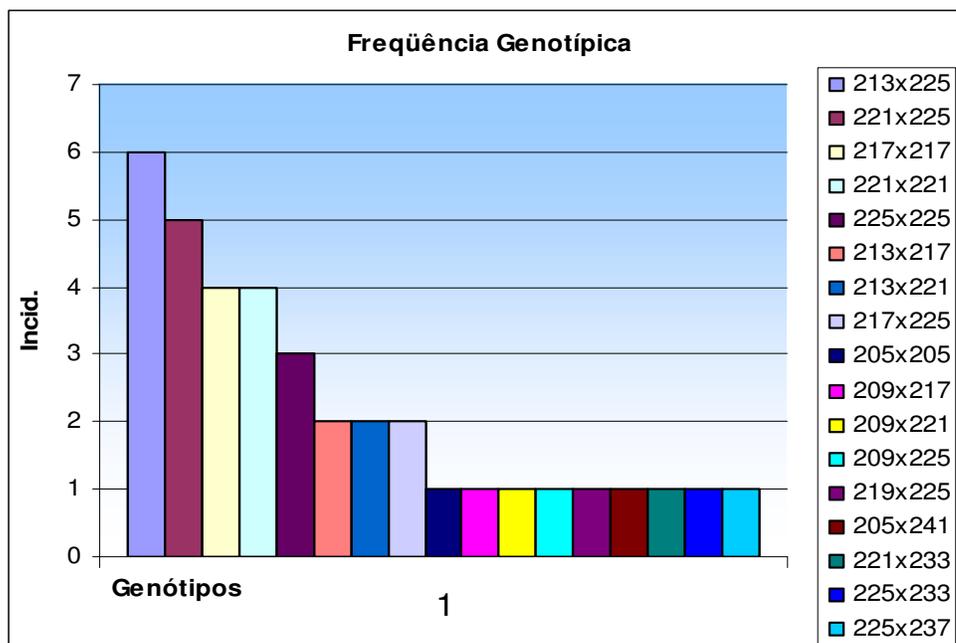


TABELA 7. Frequências alélicas do marcador PEZ15 (N=37).

Alelo	Incid.	%
205	3	4
209	3	4
213	10	14
217	13	18
219	1	1
221	17	23
225	23	31
233	2	3
237	1	1
241	1	1

PEZ17 apresentou 9 alelos distribuídos entre 204-228 pb, com 20 combinações genóticas (Tabela 8 e Figura 7). O alelo mais comum foi o *224 e os mais raros foram *210, *214 e *228.

FIGURA 7. Freqüências genóticas do marcador PEZ 17.

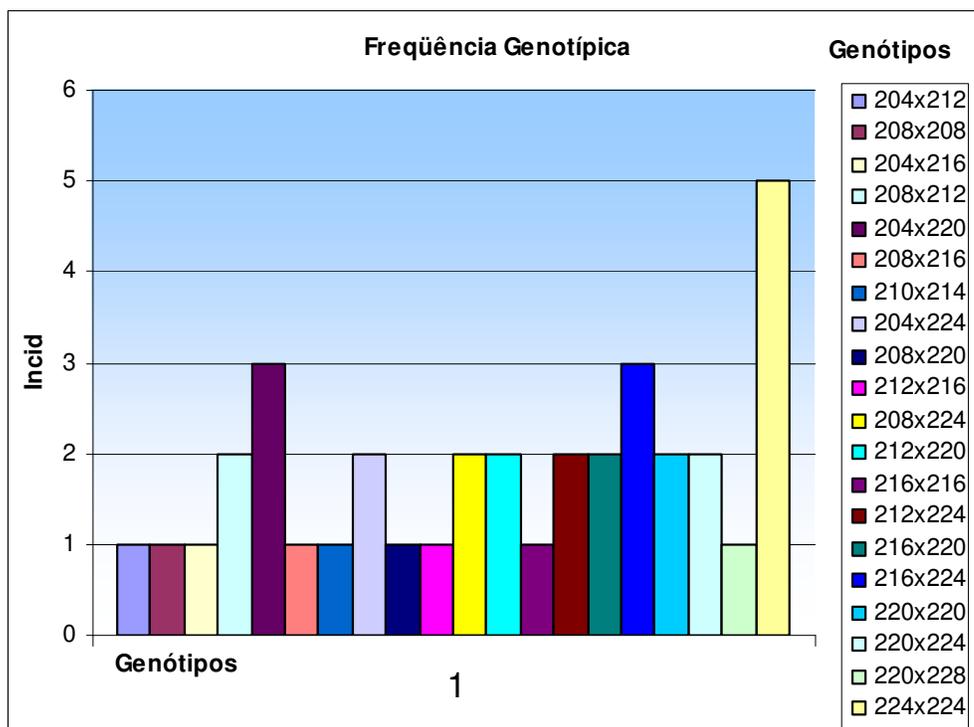


TABELA 8. Freqüências alélicas do marcador PEZ17 (N=36).

Alelo	Incid.	%
204	7	10
208	8	11
210	1	1
212	8	11
214	1	1
216	10	14
220	15	21
224	21	29
228	1	1

Em FHC2054 foram verificados 13 alelos, no intervalo 148 a178 pb, sendo o *178 o mais freqüente e *148 e *172 os mais raros (Tabela 9), verificando-se a ocorrência de 23 genótipos (Figura 8).

FIGURA 8. Freqüências genóticas do marcador FHC2054.

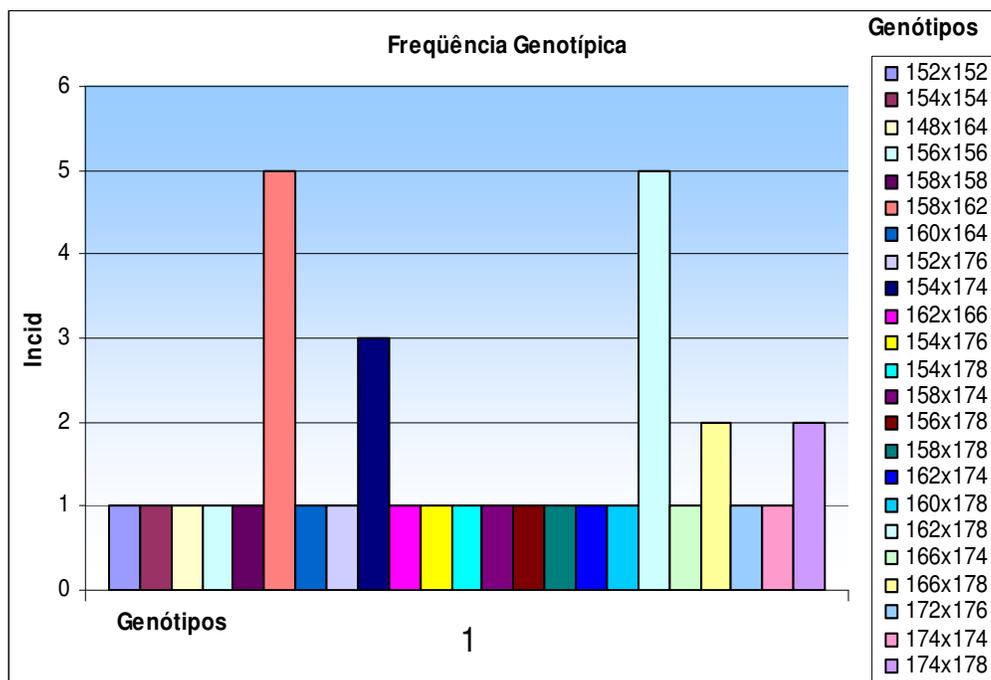


TABELA 9. Freqüências alélicas do marcador FHC2054 (N=35).

Alelo	Incid.	%
148	1	1
152	3	4
154	7	10
156	3	4
158	9	13
160	2	3
162	12	17
164	2	3
166	4	6
172	1	1
174	10	14
176	3	4
178	13	19

Os padrões de diversidade genética na amostra estudada foram estimados separadamente para cada canil e reunindo as duas amostras em uma população total. No primeiro caso os canis foram classificados como Pop1 (n=23) para os cães provenientes de Porto Alegre e Pop2 (n=14), para a amostra de Barra do Ribeiro. Os parâmetros de diversidade [Probabilidade de Identidade (PI), Probabilidade de Exclusão (Pe), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Heterozigosidade (He)] são apresentados na Tabela 10 para amostra total e na Tabela 11 para as amostras separadas por canil, onde consta, também, a Probabilidade de Identidade entre as Populações PI(e).

TABELA 10. Marcadores moleculares e padrões genéticos na amostra como um todo.

MARCADORES								
	PEZ03	PEZ06	PEZ08	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
PI	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,07	0,06	0,03
Pe	0,75	0,80	0,77	0,70	0,72	0,60	0,64	0,75
PIC	0,86	0,9	0,88	0,83	0,84	0,77	0,79	0,87
H	0,88	0,91	0,90	0,87	0,87	0,80	0,83	0,89

TABELA 11. Padrão de diversidade genética (PI, Pe e PIC) nas duas populações, separadamente e PI entre populações.

MARCADORES								
	PEZ03	PEZ06	PEZ08	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
PI Pop 1	0,03	0,02	0,03	0,05	0,03	0,07	0,04	0,03
PI Pop 2	0,03	0,05	0,05	0,04	0,05	0,12	0,14	0,05
Pe Pop 1	0,72	0,78	0,74	0,67	0,73	0,60	0,70	0,74
Pe Pop 2	0,75	0,66	0,68	0,70	0,67	0,50	0,45	0,67
PIC Pop 1	0,85	0,88	0,86	0,81	0,85	0,77	0,83	0,85
PIC Pop 2	0,86	0,80	0,82	0,83	0,81	0,68	0,64	0,81
He Pop 1	0,88	0,91	0,89	0,85	0,88	0,81	0,87	0,89
He Pop 2	0,90	0,85	0,87	0,88	0,87	0,75	0,72	0,87
PI (e)	0,02	0,01	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05	0,02

Quando são comparados os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) verificam-se valores similares, apesar de pequenas variações, o que indica a ausência de endocruzamento, nestas populações (Tabela 12).

TABELA 12. Heterozigosidades Esperadas (H_e) e Observadas (H_o) para os sistemas estudados em Veadeiro Pampeano.

	MARCADORES							
	PEZ03	PEZ06	PEZ08	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
H_e	0,88	0,91	0,90	0,86	0,87	0,80	0,82	0,89
H_o	0,81	0,94	0,83	0,89	0,91	0,89	0,91	0,91

Quando comparadas as H_e médias (H) entre os dois canis, a Pop1 ($H=0,87$) revelou diversidade um pouco mais elevada que a Pop2 ($H=0,84$).

5 DISCUSSÃO

Os cães estudados, embora em número amostral reduzido, contabilizam a população total disponível; as tentativas realizadas para aumentar o tamanho da amostra não obtiveram sucesso, pois existem poucos criadores com registro no Kennel Clube do Rio Grande do Sul e apesar de haver referência a canis no Mato Grosso não foi possível a sua localização. Alguns sistemas não tiveram todas as amostras amplificadas, devido a dificuldades técnicas, que pode ser consequência do reduzido volume de sangue obtido, pois alguns indivíduos eram filhotes no momento da coleta, o que acabou dificultando o processo.

Na literatura as informações disponíveis para os microssatélites aqui analisados é bastante ampla, porém os resultados disponíveis referem-se sempre ao número e tamanho de alelos e aos parâmetros de diversidade, não havendo publicações quanto às frequências alélicas, nas diversas raças de canídeos, de modo que análises de distância e construções de filogenias não puderam ser feitas. Também, pela mesma razão, não foi possível verificar se há ou não a presença de alelos exclusivos no Veadeiro Pampeano. As comparações envolveram então, o número e os intervalos de variação de alelos e o grau de diversidade.

Os marcadores PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ12 e PEZ17 apresentaram, nos Veadeiros, comparados com outras raças, número de alelos superior aos descritos na literatura para estes STRs (DeNise *et al.*, 2004). As raças utilizadas na comparação (Tabela 13) foram selecionadas para abranger cães de diferentes

aptidões, como os de caça, levantadores, farejadores, de guarda, de tração, boiadeiros e de companhia, bem como raças consideradas primitivas, com base na classificação cinológica brasileira <<http://www.cbkc.com.br/instclubes.htm>; acesso em 02 dezembro 2006 >.

Para o STR FHC2054 um número de alelos observados foi igual ao descrito para Pastor Alemão, embora superior aos de outras raças. No microssatélite PEZ10 o número de alelos é similar em todas as raças, com exceção dos Pharoah Hound, que apresentam menor variação. Em PEZ15 o número encontrado está no limite superior da distribuição, sendo inferior ao apresentado pelos São Bernardo. Nos demais STR a variabilidade alélica dos Veadeiros foi sempre superior às das demais raças.

Quando a comparação é realizada entre o Veadeiro Pampeano e outras raças de mesma habilidade (caça), o número de alelos observado foi superior ao descrito na literatura, com exceção do marcador PEZ12 que apresentou diversidade um pouco maior em Afghan Hound (Tabela 13).

A compilação das informações da literatura referentes ao intervalo de variação no tamanho dos alelos (Tabela 14) indica que, apesar dos Veadeiros apresentarem, em geral, maior grau de variação, os alelos observados estão dentro do intervalo de variação descrito em outras raças, com apenas duas exceções, PEZ10 e PEZ12.

Os valores de H_e em cada STR aqui verificados são superiores, ou estão no limite superior da variação observada em outras populações de cães (Tabela 15), o que se reflete em maiores valores médios de heterozigosidade em Veadeiro que nas demais raças (Tabela 16).

TABELA 13. Comparação do número de alelos em diferentes raças.

	NÚMERO DE ALELOS POR MARCADOR							
	PEZ3	PEZ6	PEZ8	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
BASSET HOUND*	7	7	4	11	8	5	6	5
COCKER SPANIEL*	7	9	7	9	6	5	7	9
PASTOR ALEMÃO	9	5	4	8	3	7	6	13
IBIZAN HOUND*	5	7	4	8	3	5	5	5
PHAROAH HOUND	6	5	5	5	3	5	3	5
ROTTWEILER	4	9	4	9	7	9	5	7
HUSKY SIBERIANO	8	6	6	12	8	5	5	8
SÃO BERNARDO	8	5	7	12	5	12	5	6
WEIMARANER*	7	6	5	9	6	6	4	5
POINTER*	7	7	7	8	9	8	5	5
Y. TERRIER	11	6	6	14	5	9	6	6
V. PAMPEANO	12	15	16	12	11	10	10	13

* Cães de caça.

TABELA 14. Intervalo de tamanho de alelos descritos em diferentes raças de cães e os encontrados em Veadeiro Pampeano.

	INTERVALO DE VARIAÇÃO (pb)							
	PEZ3	PEZ6	PEZ8	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
Neff <i>et al.</i> (1999)	95-153	166-203	213-260	282-302	266-313	200-245	199-227	138-185
DeNise <i>et al.</i> (2004)	95-154	166-215	230-260	230-330	250-317	193-284	196-245	140-184
Veadeiro Pampeano	95-154	175-215	213-253	292-332	271-319	205-241	204-228	148-178

TABELA 15. Comparação dos valores de Heterozigosidade Esperada (He) em várias raças de cães.

HETEROZIGOSIDADES ESPERADAS (He)								
	PEZ03	PEZ06	PEZ08	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
AFGHAN HOUND	0,64	0,68	0,22	0,83	0,86	0,66	0,50	0,63
BASSET HOUND	0,70	0,70	0,47	0,85	0,72	0,61	0,52	0,69
COCKER SPANIEL	0,65	0,82	0,66	0,72	0,72	0,59	0,72	0,67
HUSKY SIBERIANO	0,71	0,76	0,57	0,69	0,72	0,27	0,71	0,73
IBIZAN HOUND	0,67	0,77	0,56	0,83	0,35	0,80	0,57	0,73
PASTOR ALEMÃO	0,62	0,64	0,62	0,87	0,06	0,36	0,75	0,49
PHAROAH HOUND	0,66	0,56	0,73	0,58	0,26	0,60	0,66	0,69
POINTER	0,67	0,68	0,64	0,62	0,78	0,64	0,50	0,75
ROTTWEILER	0,51	0,68	0,55	0,70	0,74	0,80	0,69	0,54
SÃO BERNARDO	0,82	0,71	0,71	0,88	0,58	0,87	0,58	0,71
Y. TERRIER	0,72	0,74	0,53	0,88	0,60	0,81	0,76	0,69
WEIMARANER	0,72	0,52	0,58	0,74	0,68	0,64	0,69	0,55
V. PAMPEANO	0,88	0,91	0,90	0,86	0,87	0,80	0,82	0,89

TABELA 16. Heterozigosidade média em Veadeiro Pampeano e diversas raças de cães.

HETEROZIGOSIDADE MÉDIA	
AFGHAN HOUND	0,63
BASSET HOUND	0,61
COCKER SPANIEL	0,69
HUSKY SIBERIANO	0,64
IBIZAN HOUND	0,66
PASTOR ALEMÃO	0,55
PHAROAH HOUND	0,59
POINTER	0,66
ROTTWEILER	0,65
SÃO BERNARDO	0,73
YORKSHIRE TERRIER	0,72
WEIMARANER	0,64
VEADEIRO PAMPEANO	0,87

TABELA 18. Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) em diferentes raças.

CONTEÚDO DE INFORMAÇÃO POLIMÓRFICA (PIC)								
	PEZ03	PEZ06	PEZ08	PEZ10	PEZ12	PEZ15	PEZ17	FHC2054
AFGHAN HOUND	0,59	0,59	0,21	0,81	0,84	0,59	0,45	0,59
BASSET HOUND	0,65	0,51	0,43	0,84	0,67	0,53	0,47	0,64
COCKER SPANIEL	0,59	0,63	0,61	0,70	0,65	0,09	0,68	0,63
HUSKY SIBERIANO	0,66	0,72	0,52	0,67	0,67	0,25	0,66	0,70
IBIZAN HOUND	0,63	0,72	0,50	0,81	0,31	0,76	0,53	0,54
PASTOR ALEMÃO	0,54	0,55	0,57	0,86	0,06	0,34	0,72	0,46
PHAROAH HOUND	0,62	0,48	0,69	0,54	0,24	0,52	0,59	0,65
POINTER	0,61	0,62	0,61	0,58	0,75	0,60	0,46	0,71
ROTTWEILER	0,42	0,62	0,51	0,65	0,70	0,77	0,64	0,52
SÃO BERNARDO	0,80	0,65	0,67	0,86	0,54	0,84	0,49	0,65
Y. TERRIER	0,69	0,67	0,50	0,87	0,55	0,79	0,72	0,63
WEIMARANER	0,68	0,45	0,51	0,70	0,62	0,58	0,64	0,51
V. PAMPEANO	0,86	0,89	0,88	0,83	0,84	0,77	0,79	0,87

A alta diversidade genética observada nos cães Veadeiros Pampeanos, maior que a das demais raças, provavelmente reflete o cuidado por parte dos criadores em selecionar animais não consangüíneos para a origem de seus canis.

Comparado com o Ibizian Hound, que se acredita poderia ser um possível ancestral, os Veadeiros apresentam, em geral mais do dobro de alelos observados naquela raça, os parâmetros de diversidade sendo sempre mais elevados em Veadeiros. Estes resultados sugerem ser pouco provável que o Ibizian Hound seja ancestral dos Veadeiros Pampeanos, a menos que se admita uma grande perda da diversidade genética naquela raça após a ocorrência de separação evolutiva entre esses dois grupos.

6. CONCLUSÕES

A investigação de oito polimorfismos de repetições curtas em tandem, STRs PEZ03, PEZ06, PEZ08, PEZ10, PEZ12, PEZ15, PEZ17 e FHC2054 em cães da raça Veadeiro Pampeano, procedentes dos canis Infinitu's Kennel, de Porto Alegre (n=23) e Nhãndu Kennel, de Barra do Ribeiro (n=14) possibilitou estimar a diversidade genética desses animais, verificar o potencial destes marcadores para determinação de paternidade e identificação individual e comparar os resultados obtidos com os de outras populações de cães, obtendo-se as seguintes conclusões:

- todos os STRs mostraram-se polimórficos, com o número de alelos variando de 9 (PEZ17) a 15 (PEZ06);
- as análises comparativas com várias raças de diferentes aptidões e/ou cães de caça indicaram um maior número de alelos presentes em Veadeiro Pampeano, mostrando maior diversidade neste último;
- verificou-se maior heterozigosidade média nos Veadeiros Pampeanos que nas demais raças usadas como comparação;
- a população do canil Infinitu's Kennel mostrou-se um pouco mais variável que a do canil Nhãndu Kennel; é possível que essa diferença seja decorrente do menor tamanho desta segunda amostra;
- o alto grau de variabilidade verificado nos cães Veadeiros Pampeanos provavelmente resulta de um cuidado estabelecido pelos criadores

baseado em cruzamentos não consangüíneos e compor linhagens não aparentadas em seus canis;

- entre os marcadores moleculares aqui analisados, PEZ06 foi o que apresentou maior Probabilidade de Exclusão (Pe), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Heterozigosidade (He), sendo eleito o melhor para estudos de diversidade, nesta população;
- PEZ15 foi considerado o menos eficiente para estudar a variação genética (He = 0,026 e PIC = 0,014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell** - 3rd Edition. New York, NY, EUA: Garland Publishing Inc, 1995. 1294 p.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Genetic**, v. 32, p. 314-331, 1980.

CAÑÓN, J.; PARRA, D.; DUNNER, S. Control de paternidad y Pedigrí Genético: Situación Actual em la espécie canina. **Laboratório de Genética**. Faculdade de Veterinária, UCM, Espanha, 2002. Disponível em <<http://www.ucm.es/info/genetvet>>. Acesso em: 28 mar. 2005.

CAVALLI, S.S. **Diagnóstico Genético e Molecular: Métodos de Diagnóstico Genético-molecular em plantas**. 1ª edição, Canoas: ed. Ulbra, 2003. 372p.

CHAKRAVARTI, A., LI, C. C. The effect of linkage on paternity calculations. In: WALKER, R. H. **Inclusion probabilities in parentage testing**. Arlington: ed. Amer. Assoc. Blood Banks, p. 411- 422, 1983.

CHAVES, R.A. **Marcadores Moleculares**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL0008>>. Acesso em: 28 mar. 2005.

DeNISE, S.; JOHNSTON, E.; HALVERSON, J. *et al.* Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 35, p.14-17. 2004.

DOLF, G.; SCHLAPFER, J.; GAILLARD, C. *et al.* Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. **Genet Sel Evol**, v. 32, p. 533-541. 2000.

FRANCISCO, L. V.; LANGSTON, C. S.; MELLERSH, C. S. *et al.* A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 359-362. 1996.

GIOVAMBATTISTA, G.; RIPOLI, M. V.; LIRÓN, J. P. *et al.* Aplicación de las técnicas de polimorfismo de DNA en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. **Analecta Veterinaria**, v. 21, p. 5-11. 2001.

HALVERSON J., DVORAK J. & STEVENSON T. Microsatellite sequences for canine genotyping. US Patent 05874217. 1995.

HELLMANN, A. P.; ROHLEDER, U.; EICHMANN, C. *et al.* A proposal for standardization in forensic canine DNA typing: Allele nomenclature of six canine-specific STR loci. **J. Forensic Sci**, v. 51, p. 274 – 281. 2006.

ICHIKAWA, Y.; TAKAGI, K.; TSUMAGI, S. *et al.* Canine parentage testing based on microsatellite polymorphism. **J. Vet.Med.Sci.**, v. 63, p. 1209-1213. 2001.

IRION, D. N.; SCHAFFER, A. L.; FAMULA, T. R. *et al.* Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. **Journal of Heredity**, v. 94, p. 81-87. 2003.

IRION, D. N.; SCHAFFER, A. L.; GRANT, S. *et al.* Genetic variation analysis of the Bali street dog using microsatellites. **BMC Genetics**, v. 6:6. 2005.

LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., *et al.* Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 991 -1007, 2004.

LINDBLAD-TOH, K., WADE, M. C., MIKKELSEN, S. T., *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, p. 803 – 819, 2005.

LEONARD, J.A.; WAYNE, R.K.; WHEELER, J., *et al.* Ancient DNA evidence for old world o

PARKER, H. G.; KIM, L. V.; SUTTER, N. B. et al. Genetic structure of the purebred domestic dog. **Science**, v.304, p.1160-1164. 2004

ROCHA, R. B. ; PEREIRA, J. F.; CRUZ, C. D. *et al.* O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.30, p. 27-32. 2003.

SANGUINETTI, C.J., NETO, E.D., SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, p. 914-921, 1994.

SAVOLAINEN, P.; ZHANG, Y.; LUO, J. *et al.* Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. **Science**, v. 298, p. 1610-1613. 2002.

SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. **J. Anim. Breed. Genet.** , v.122, p. 71 – 77. 2005.

VAN ZENEREN, A., BOUQUET, Y., VAN DE WEGHE, A., COPPIETERS, W. A genetic blood marker study on 4 pig breeds. I Estimation and comparison of within-breed variation. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 107, p. 104-112, 1990 a.

VAN ZENEREN, A., BOUQUET, Y., VAN DE WEGHE, A., COPPIETERS, W. A genetic blood marker study on 4 pig breeds II Genetic relationship between the populations. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 107, p. 113-118, 1990 b.

ZAJC, I.; MELLERSH, C.S.; SAMPSON, J. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 182-185. 1997.

ZAJC, I.; SAMPSON, J. Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 104-107. 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)