

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**POLIMORFISMO DO GENE SPI2 NA OBSTRUÇÃO  
RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS E NA DOENÇA  
INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS EM CAVALOS  
PURO SANGUE DE CORRIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aline Corrêa da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**POLIMORFISMO DO GENE SPI2 NA OBSTRUÇÃO RECORRENTE  
DAS VIAS AÉREAS E NA DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS  
AÉREAS EM CAVALOS PURO SANGUE DE CORRIDA**

**por**

**Aline Corrêa da Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Karin Erica Brass**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**POLIMORFISMO DO GENE SPI2 NA OBSTRUÇÃO RECORRENTE  
DAS VIAS AÉREAS E NA DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS  
AÉREAS EM CAVALOS PURO SANGUE DE CORRIDA**

elaborada por  
**Aline Corrêa da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Karin Erica Brass, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

**Marlise Lodvocat Bartholomei Santos, Dra. (UFSM)**

**Sergio da Silva Fialho, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 2 de setembro de 2008.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

À Prof<sup>a</sup> Karin, pela orientação desde o tempo de graduação e à amiga Karin, pela amizade de quase 8 anos.

Ao Prof. Elgion, pela co-orientação e suas idéias salvadoras.

À Medica Veterinária Myriam, por ter iniciado essa linha de pesquisa em nosso laboratório, e colhido as amostras.

Ao amigo e colega, Ricardo, por toda ajuda, ao Marcos (Kabeça) e todos os estagiários e mestrandos da clínica de eqüinos.

Ao pessoal do Laboratório Drosophila, Felipe, Josmael, Ronaldo, pela enorme ajuda em biologia molecular.

À Prof<sup>a</sup> Marlise, Prof<sup>a</sup> Mara, e Prof. Flávio.

Ao Jordan, pelo carinho e paciência.

À minha irmã Vanessa.

E à minha mãe, por tudo, sempre.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **POLIMORFISMO DO GENE SPI2 NA OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS E NA DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS EM CAVALOS PURO SANGUE DE CORRIDA**

AUTOR: ALINE CORRÊA DA SILVA  
ORIENTADORA: KARIN ERICA BRASS  
Santa Maria, Setembro de 2008.

A obstrução recorrente das vias aéreas (ORA) e a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) são doenças de alta prevalência e economicamente importantes em cavalos atletas. A ORA é considerada uma enfermidade multifatorial por apresentar componentes ambientais e genéticos em sua fisiopatologia. O presente trabalho teve por objetivo determinar a presença de polimorfismos nos éxons 2, 3, 4 e 5 do gene SPI2 e verificar uma possível associação destes com a ORA e/ou DIVA em 51 cavalos Puro Sangue de Corrida através da técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). Os éxons 2, 3 e 4 não apresentaram polimorfismo. No éxon 5 do gene Spi2 foram identificados três alelos e seis genótipos. Apesar do alelo A e o genótipo AA apresentarem frequência (0,6388 e 0,3888, respectivamente) mais elevada nos animais com ORA, não houve associação entre os polimorfismos observados e ORA ou DIVA.

Palavras-chave: cavalo, doença respiratória, SSCP, alfa-1-antitripsina, serpina.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation in Veterinary Medicine  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

### **SPI2 GENE POLIMORPHISM IN RECURRENT AIRWAY OBSTRUCTION AND INFLAMMATORY AIRWAY DISEASE IN THOROUGHBRED HORSES**

AUTHOR: ALINE CORRÊA DA SILVA

ADVISER: KARIN ERICA BRASS

Santa Maria, September 2<sup>nd</sup>, 2008.

Recurrent airway obstruction (RAO) and inflammatory airway disease (IAD) show high prevalence and are economically important in equine athletes. RAO is considered a multifactorial disease due to genetic and environmental components in their pathophysiology. The aim of this study was to determine the presence of polymorphism at exons 2, 3, 4 and 5 of the SPi2 gene and a possible association between them and ORA or IAD on 51 thoroughbred horses through single-strand conformational polymorphism (SSCP). Exons 2, 3 and 4 of the Spi2 gene showed no polymorphism. On exon 5, 3 alleles and 6 genotypes were identified. Frequency of allele A (0.6388) and genotype AA (0.3888) were higher in horses affected by RAO but no association was found between any polymorphism and horses with RAO or IAD.

Key-words: horse, respiratory disease, SSCP, alpha-1-antitrypsin, serpine.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>2.1 Obstrução recorrente das vias aéreas</b> .....	8
2.1.1 Fisiopatologia.....	9
2.1.2 Patologia.....	10
2.1.3 Sinais clínicos.....	10
2.1.4 Diagnóstico.....	11
2.1.5 Tratamento e prevenção.....	12
<b>2.2 Doença inflamatória das vias aéreas (DIVA)</b> .....	12
<b>2.3 A ORA como doença genética</b> .....	13
2.3.1 Enzima alfa-1 antitripsina (AAT).....	13
<b>2.4 Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)</b> .....	14
<b>3 CAPÍTULO 1. Polimorfismo do gene SPi2 na obstrução recorrente das vias aéreas e na doença inflamatória das vias aéreas em cavalos Puro Sangue de Corrida</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>INTRODUCTION</b> .....	18
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	20
<b>RESULTS</b> .....	22
<b>DISCUSSION</b> .....	22
<b>CONCLUSIONS</b> .....	26
<b>AKNOWLEDGEMENTS</b> .....	26
<b>REFERENCES</b> .....	26
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34

# 1 INTRODUÇÃO

Epidemiologicamente, entre as doenças eqüinas que resultam em queda do desempenho e, portanto, em perdas econômicas significativas, a obstrução recorrente das vias aéreas (ORA) é considerada a segunda enfermidade mais importante sendo precedida somente pelas doenças músculo-esqueléticas (DIXON et al., 1995). Embora a sua patogenia ainda não tenha sido completamente elucidada, dois fatores têm sido postulados no mecanismo de produção das lesões da ORA: predisposição genética e sensibilidade a alérgenos ambientais (MARTI et al., 1991).

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) ocorre com prevalência elevada em cavalos mais jovens levando também à queda na performance (WOOD et al., 1999). Embora os sinais clínicos sejam similares aos da ORA, até o presente momento, não é possível afirmar se cavalos jovens com DIVA desenvolvem ORA (MAIR; DERKSEN, 2000).

Em humanos, o desequilíbrio entre proteases/antiproteases é um fator que predispõe a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença semelhante a ORA eqüina. Apesar de, além do homem, o cavalo ser a única espécie animal a sofrer de doença pulmonar crônica espontânea, ainda não se conseguiu identificar nessa espécie qual a base genética da ORA.

O objetivo do presente trabalho foi determinar eventuais polimorfismos nos éxons 2, 3, 4 e 5 do gene Spi2, responsável pela produção da antiprotease alpha-1-antitripsina, e verificar se existe alguma relação entre estes e a predisposição à ORA ou DIVA em cavalos Puro Sangue de Corrida, através da técnica de polimorfismo de conformação da fita simples do DNA (SSCP).



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Avanços recentes indicam que fatores genéticos não apenas influenciam características físicas como conformação, cor da pelagem, etc., mas também performance e susceptibilidade a doenças. Existem mutações que causam enfermidades ou predisposição a elas e sua caracterização permite estabelecer o diagnóstico, prognóstico, tratamento e eventualmente prevenção da mesma. Alguns polimorfismos de um único nucleotídeo são marcadores genéticos úteis porque identificam a mutação que causa uma determinada enfermidade ou estão fisicamente próximos a ela (CUZEANO et al., 2005).

Em cavalos, doenças ligadas a um único gene são relativamente raras quando comparadas a outras espécies domésticas como o cão. Durante as últimas duas décadas, os genes responsáveis por algumas doenças causadas por mutação de um único gene, como a paralisia hipercalêmica periódica e a síndrome letal do potro branco, foram identificados em cavalos (RUDOLPH et al., 1992; SANTASCCHI et al., 1998). Outras doenças provavelmente também possuem base genética, mas como a sua ocorrência é influenciada por fatores, como o ambiente, a identificação do componente genético se torna mais difícil (MARTI & OHNESORGE, 2002). Além disso, acredita-se que diversas enfermidades eqüinas tenham, em sua origem, componentes genéticos múltiplos. Neste caso ocorre a contribuição de vários genes podendo ocorrer a combinação de distintas variantes alélicas de numerosos locos. A base genética dessas doenças é mais difícil de ser determinada, mas grande progresso tem sido alcançado no estudo de tais doenças em humanos. Propostas semelhantes vêm sendo aplicadas com sucesso em outras espécies (MARTIN; BINNS, 1998)

### **2.1 Obstrução recorrente das vias aéreas (ORA)**

A obstrução recorrente das vias aéreas (ORA) era anteriormente conhecida como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Devido a diferenças entre a DPOC eqüina e a humana, o “International Workshop on Equine Chronic Airway Disease”, em junho de 2000, recomendou o uso dos termos ORA ou “heaves” para cavalos com essa doença e não mais DPOC (ROBINSON, 2001). A ORA é uma das enfermidades pulmonares diagnosticadas com maior frequência em eqüinos com idade superior a seis anos (Mc PHERSON et al., 1978;

LARSON & BUSCH, 1985; BRACHER et al., 1991). De acordo com Bracher et al. (1991) 60-80% dos cavalos suíços com idade superior a oito anos apresentam a doença, embora a manifestação seja de intensidade variável.

O processo inicia com a inalação de poeiras orgânicas. As fontes mais comuns destas poeiras são o feno e a cama (VANDENPUT et al., 1997). A poeira de estábulo contém mais de 50 espécies de fungos, um grande número de ácaros, alérgenos específicos, endotoxinas, componentes do mofo como beta-glucano, e pequenas partículas que podem iniciar a inflamação pulmonar. Níveis elevados de IgE no lavado broncoalveolar (BAL) sugerem que a ORA é iniciada por uma resposta alérgica a fungos termofílicos e actinomicetos. A análise do perfil das citocinas, mostra uma resposta imune predominantemente de células “T-helper 2” (TH2) (alérgica) nos cavalos afetados (LAVOIE, 2001). A alta prevalência familiar de ORA sugere uma predisposição genética para a doença (SCHAPFER, 1939; GERBER, 1989).

### 2.1.1 Fisiopatologia

A inflamação das vias aéreas tem início assim que o animal suscetível é estabulado. (McGORUM, 1993). O ambiente com poeira de feno, pólen e mofo induz a liberação de fatores quimiotáticos como as interleucinas (IL) (IL-1, IL-2, IL-8, IL-13), o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), e possivelmente leucotrienos B4 e ICAM-1 que recrutam e ativam os neutrófilos (ROBINSON et al., 1995; FRANCHINI et al., 1998). Estes se acumulam nos pulmões e invadem o lúmen das vias aéreas em seis a oito horas (FAIRBAIRN et al., 1993).

Simultaneamente, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, leucotrienos, tromboxano e ácido 15-hidroxyeicosatetraenoico (15-HETE) (GRAY et al., 1992; McGORUM et al., 1993; FRAHNCHINI et al., 1998). Os mediadores inflamatórios são responsáveis pela ocorrência de bronco-espasmo, secreção de muco, hiperreatividade e espessamento da parede das vias aéreas resultando na obstrução das mesmas (KAUP et al., 1990; DIXON, 1992; BAYLY; SLOCOMBE, 1997).

Os mediadores inflamatórios atuam sobre as fibras dos nervos colinérgicos estimulando a contração dos músculos lisos das vias aéreas levando ao broncoespasmo (OLSZEWSKI et al., 1999). O acúmulo de muco é devido à produção aumentada e à sua alta viscosidade (GERBER et al., 2000). A hiperreatividade observada nas vias aéreas em cavalos com ORA (DERKSEN et al., 1985) se deve à resposta exagerada a uma grande variedade de

estímulos. Obel e Schmitterlow, já em 1948, observaram um aumento pronunciado na broncoconstrição após a administração de histamina em cavalos com ORA.

Alterações inflamatórias na parede das vias aéreas ocorrem tanto na fase aguda (edema), como na crônica (remodelação da parede das vias aéreas). A remodelação da parede das vias aéreas inclui metaplasia da mucosa que reveste as vias aéreas inferiores, hipertrofia do músculo liso, inflamação e fibrose peribronquial. Estas alterações são responsáveis pelo caráter crônico e desenvolvimento progressivo, não tratável, da obstrução das vias aéreas na ORA (KAUP et al., 1990b). Este remodelamento aparentemente é o resultado de episódios repetidos de inflamação das vias aéreas e da liberação das proteases (RAULO et al., 2000) e outros mediadores em animais suscetíveis.

### 2.1.2 Patologia

A ORA é classicamente descrita como uma bronquiolite, mas tanto alterações funcionais como patológicas podem ser observadas também nas vias aéreas maiores (YU et al., 1994). Nos bronquíolos há obstrução por acúmulo de muco (“plugging”) e neutrófilos no lúmen. Outras células inflamatórias incluindo linfócitos, monócitos e ocasionalmente eosinófilos são encontradas em grande número no tecido conectivo peribronquial. Ocorre metaplasia do epitélio bronquiolar, espessamento do músculo liso das vias aéreas, liberação de muco dos alvéolos adjacentes e fibrose peribronquial (KAUP et al., 1990). Todas essas alterações mostram evidência de inflamação crônica.

As alterações macroscópicas nos cavalos com ORA incluem um pulmão cor de rosa, macio, hiperinflado e sem bolhas enfisematosas. Hipertrofia dos músculos respiratórios secundários e do ventrículo direito também são descritos (BEECH, 1991).

### 2.1.3 Sinais Clínicos

O primeiro sinal relatado pelos proprietários, normalmente é a tosse. Ela ocorre quando há aumento na quantidade de poeira, como ocorre quando o animal está sendo alimentado, a cocheira está sendo limpa, ou quando o cavalo começa o exercício. Ao mesmo tempo, os proprietários descrevem intolerância ao exercício. Com a evolução da doença, se observa demora na recuperação após o exercício, secreção nasal e ocasionalmente crises de

esforço respiratório aumentado. Este é identificado pelo esforço abdominal durante a respiração ou dilatação maior das narinas. Uma vez que a doença se torna severa, o esforço respiratório pode se tornar constante, principalmente se o animal está estabulado. (ROBINSON, 2001b)

Dependendo do estágio da doença ruídos vesiculares aumentados, estertores, chiados e sibilos podem ser auscultados nas diferentes áreas do pulmão (JEAN et al., 1999). Em animais severamente afetados, os pulmões podem estar silenciosos apesar do esforço inspiratório e expiratório. Isto se deve ao fato de as via aéreas estarem tão obstruídas que não há movimento de ar suficiente para gerar sons respiratórios audíveis (ROBINSON, 2001b). Na percussão um aumento de 5 a 40 cm da área pulmonar pode ser identificado (JEAN et al., 1999)

No exame físico, os sinais clínicos são restritos ao sistema respiratório. As narinas podem estar dilatadas e pode haver secreção nasal mucopurulenta. A compressão da traquéia cranial geralmente revela uma maior sensibilidade do reflexo tussígeno. Com o aumento no esforço expiratório, o cavalo necessita dos músculos abdominais para auxiliar na expiração. Com o passar do tempo ocorre hipertrofia do músculo abdominal externo, resultando na chamada “heave line” (hipertrofia do músculo oblíquo abdominal externo), no aspecto lateral do abdômen (JEAN et al., 1999).

#### 2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da ORA é baseado na história, nos sinais clínicos típicos e nos exames complementares. Outras doenças pulmonares crônicas que podem apresentar sinais clínicos semelhantes incluem DIVA, pneumonia bacteriana, doenças pulmonares intersticiais crônicas que levam a fibrose pulmonar ou formação de granuloma difuso (DERKSEN et al., 1985).

A gasometria sanguínea pode ser usada para avaliar a magnitude do comprometimento das trocas gasosas e a resposta ao tratamento. Dependendo da obstrução, a PaO<sub>2</sub> estará diminuída de forma variável, mas a PaCO<sub>2</sub> estará normal ou levemente elevada.

A avaliação indireta da função pulmonar pode ser feita através da ventigrafia que compara o esforço realizado pelos músculos respiratórios com a resistência das vias aéreas (HOFFMAN, 2002).

A gravidade da inflamação pulmonar pode ser avaliada pela citologia do líquido obtido na lavagem broncoalveolar (BAL). Em cavalos saudáveis, os linfócitos e os macrófagos

compreendem a maioria das células no BAL e os neutrófilos representam menos de 10% das células. Em cavalos com ORA, há um aumento na porcentagem dos neutrófilos não degenerados e, em cavalos severamente afetados, os neutrófilos representam mais de 50% das células do lavado broncoalveolar (DERKSEN et al., 1989).

#### 2.1.5 Tratamento e prevenção

O controle ambiental que diminua a carga de partículas estranhas sempre será a estratégias mais efetivas de prevenção ou redução da resposta infamatória pulmonar da ORA (JACKSON et al., 1999). Contudo, o controle ambiental efetivo pode ser impossível em animais atletas, tornando necessário o uso de medicamentos.

A combinação terapêutica de broncodilatadores e corticosterpóides parece ser a mais apropriada em cavalos ORA moderada a severa. O papel da terapia com corticosteróides é reverter a inflamação, aliviar a broncoconstrição e reduzir a produção excessiva de muco. Corticosteróides não promovem alívio imediato da obstrução, assim, os broncodilatadores  $\beta_2$ -adrenérgicos continuam sendo a terapia de primeira linha para o alívio da broncoconstrição em emergências (JACKSON et al., 1999).

## 2.2 Doença inflamatória das vias aéreas (DIVA)

A doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) ocorre em cavalos jovens, com idade inferior a cinco anos. A DIVA é caracterizada por aumento da quantidade de muco na traquéia ou aumento de neutrófilos no lavado traqueal. A prevalência de DIVA varia entre 11,3 e 50% em cavalos Puro Sangue de Corrida e “Standardbred”. As perdas econômicas decorrentes são consideráveis devido à queda na performance, dias perdidos de treinamento, tratamento veterinário e medidas de controle (WOOD et al., 1999).

### 2.3 A ORA como doença genética

A ORA eqüina possui vários aspectos comuns à DPOC humana. Uma predisposição genética na ORA foi sugerida pela primeira vez por Schaeper em 1939. Ele verificou que 14 de 24 descendentes do garanhão “Egmont”, portador de ORA, também sofriam da doença.

A possibilidade da ORA ter uma base hereditária no eqüino foi confirmada por Marti et al. (1991) em estudo clínico desenvolvido em 90 cavalos da raça Deutsches Warmblut e 42 cavalos da raça Lipizzaner. Eles verificaram que o risco de desenvolver ORA é 3,2 vezes maior ( $p < 0,05$ ) quando um dos progenitores sofre da doença (pai ou mãe) e 4,6 vezes maior ( $p < 0,05$ ) quando ambos os progenitores sofrem de ORA.

#### 2.3.1 Enzima alfa-1-antitripsina (AAT)

A AAT é uma glicoproteína plasmática da família das inibidoras de proteases séricas (“Serpín: serín protease inhibitor” [sistema inibidor de protease- Spi]), sintetizadas, principalmente, pelo fígado e, em menor quantidade, pelos monócitos, macrófagos bronco-alveolares e glândula mamária. A sua principal função é inibir a protease elastase dos neutrófilos, que, ao ser liberada nos locais de inflamação, promove destruição tissular. A deficiência da AAT no homem produz doença hepática crônica na infância e leva a enfisema pulmonar nos adultos. Esta enzima é herdada de forma autossômica co-dominante (LAI et al., 1983).

O gene que codifica a síntese da AAT humana está localizado no cromossomo 14 (Hsa14q31-32.2) e apresenta polimorfismo na seqüência de aminoácidos e na localização das cadeias laterais que determinam sua heterogeneidade eletroforética. Esta característica é determinada geneticamente por alelos co-dominantes que são expressos independentemente. Este *locus* polimórfico recebe o nome de sistema inibidor de proteases (PI). No homem, mais de 75 alelos diferentes foram identificados neste sistema e cada um representa uma variante genética da AAT (BRANTLY et al., 1988). As variantes alélicas foram relacionadas com os níveis séricos da enzima e classificadas como: normais (níveis séricos entre 15 e 200mg/dl), variante nula (não expressa AAT) e não-funcional (proteína ineficiente sintetizada em quantidades normais) (MASSI et al., 1994). A concentração plasmática das serpinas humanas pode ser determinada usando diversas metodologias como video-densitometria (PATTERSON et al., 1991), imunodifusão radial e ELISA (DAGLEISH et al., 1999).

A diferença na estrutura molecular da AAT decorre de três possíveis mecanismos. O primeiro é a mutação de uma única base acarretando a substituição de um aminoácido localizado em um ponto funcional relativamente importante da proteína, levando a formação da variante não-funcional. O segundo seria a ocorrência de mutações que transformam um códon que codifica um aminoácido em um códon que codifica um “stop”, o que resulta numa proteína truncada, geralmente, não funcional. O terceiro é a deleção de um pedaço do gene que impede sua transcrição, ou seja, resulta na variante nula (MASSI et al., 1994).

No equino a enzima AAT, mais comumente chamada de sistema inibidor de protease (PI), é um sistema bioquímico muito polimórfico, com 25 alelos (haplotipos) caracterizados por eletroforese bidimensional e é considerada equivalente à AAT humana. A enzima AAT no equino diverge da humana por ser controlada por uma família de quatro *locus* ligados (multigene), chamada de serpina (Spi 1, 2, 3, 4) (PATTERSON et al., 1991). No cavalo ainda não foram demonstradas variantes genéticas na família das serpina nem correlação entre a ORA e a enzima AAT, como acontece no homem. Em equinos, Vinocur et al. (2005) não encontraram relação entre as variantes bioquímicas do sistema PI e a doença, porém, Matthews et al. (1979) observaram frequências mais altas de certas variantes em animais que apresentavam a doença.

#### **2.4 Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)**

Na busca de mutações pontuais, métodos como o sequenciamento direto, restriction fragment length polymorphism (RFLPs) (SOUTHERN, 1975), clivagem química (CCM) (COTTON et al., 1988), clivagem por RNase (GOLDRICK et al, 1996) alelo específico para hibridização (ASO) (NOLLAU; WAGENER, 1997) são normalmente empregados. Estes métodos, além de apresentarem sensibilidade variada, requerem reagentes e equipamentos sofisticados que aumentam sua complexidade e custo operacional.

A SSCP é uma técnica relativamente fácil e barata que detecta mutações em ponto com uma sensibilidade de aproximadamente 80% em condições ideais (CUZEANO et al., 2005). A troca de um único nucleotídeo em uma dada seqüência na cadeia dupla de DNA não pode ser distinguida por eletroforese, pois as propriedades físicas da dupla fita são quase idênticas nos dois alelos. Porém, após a desnaturação, as fitas únicas assumem uma estrutura de dobramento tridimensional, determinada por interações intramoleculares, de acordo com sua seqüência de DNA (CUZEANO et al., 2005). Na análise por SSCP, a seqüência mutante é

detectada pela alteração na motilidade na eletroforese em gel de poliacrilamida, causada pela alteração na estrutura de dobramento da fita (HAYASHI, 1991). Dependendo da estrutura que a molécula assume, ela corre mais ou menos rapidamente no gel, independente do número de nucleotídeos.



## **3 CAPÍTULO 1**

**POLIMORFISMO DO GENE SPI2 NA OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS  
AÉREAS E NA DOENÇA INFLAMATÓRIA DAS VIAS AÉREAS EM CAVALOS  
PURO SANGUE DE CORRIDA**

**Ciência Rural, 2008**

**SPi2 gene polymorphism in recurrent airway obstruction and inflammatory airway disease in thoroughbred**

**Polimorfismo do gene SPi2 na obstrução recorrente das vias aéreas e na doença inflamatória das vias aéreas em cavalos puro sangue de corrida**

**Aline Corrêa da Silva<sup>1\*</sup>, Karin Erica Brass<sup>1</sup>, Elgion da Silva Loreto<sup>2</sup>, Myriam Elizabeth Vinocur<sup>3</sup>, Ricardo Pozzobon<sup>1</sup>, Marcos da Silva Azevedo<sup>1</sup>**

**ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the presence of polymorphism at exons 2, 3, 4 and 5 of the SPi2 gene and a possible association between them and recurrent airway obstruction (RAO) or inflammatory airway disease (IAD) on 51 thoroughbred horses through single-strand conformational polymorphism (SSCP). Exons 2, 3 and 4 of the Spi2 gene showed no polymorphism. On exon 5, 3 alleles and 6 genotypes were identified. Frequency of allele A (0.6388) and genotype AA (0.3888) were higher in horses affected by RAO but no association was found between any polymorphism and horses with RAO or IAD.

**Keywords:** horse, respiratory disease, SSCP, alpha-1-antitrypsin, serpin.

---

<sup>1</sup>Department of Large Animal Clinics, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup>Practitioner, Gualeguaychu, Argentina.

\*Author for correspondence: [alinecsvgvet@hotmail.com](mailto:alinecsvgvet@hotmail.com), phone 55-55-3217-4074

## RESUMO

A obstrução recorrente das vias aéreas (ORA) e a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) são doenças de alta prevalência e economicamente importantes em cavalos atletas. A ORA é considerada uma enfermidade multifatorial por apresentar componentes ambientais e genéticos em sua fisiopatologia. O presente trabalho teve por objetivo determinar a presença de polimorfismos nos éxons 2, 3, 4 e 5 do gene SPi2 e verificar uma possível associação destes com a ORA e/ou DIVA em 51 cavalos Puro Sangue de Corrida através da técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). Os éxons 2, 3 e 4 não apresentaram polimorfismo. No éxon 5 do gene Spi2 foram identificados três alelos e seis genótipos. Apesar do alelo A e o genótipo AA apresentarem frequência (0,6388 e 0,3888, respectivamente) mais elevada nos animais com ORA, não houve associação entre os polimorfismos observados e ORA ou DIVA.

Palavras-chave: cavalo, doença respiratória, SSCP, alfa-1-antitripsina, serpina.

## INTRODUCTION

“Heaves” or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or, more recently, recurrent airway obstruction (RAO) is one of the most frequently diagnosed pulmonary diseases in horses over 6 years of age (Mc PHERSON et al., 1978; LARSON & BUSCH, 1985; BRACHER et al., 1991). Airway obstruction episodes are induced by exposure of susceptible horses to a dusty (hay, molds, pollen) environment. These dusts (allergens) induce the release of chemotactic factors that recruit and activate neutrophils (ROBINSON et al., 1995; FRANCHINI et al., 1998). At the site of inflammation, neutrophils release granules that contain potentially toxic products such as proteases, elastases and collagenases, which promote tissue destruction. There are, however, proteins called protease inhibitors, which, when bound to active sites on proteases, diminish or even cease their action.

The alpha-1-antitrypsin (AAT) enzyme is a plasma glycoprotein protease inhibitor of the serpin family (serin protease inhibitor), which is synthesized primarily by the liver and to a lesser amount, by monocytes, bronco-alveolar macrophages and the mammary gland (LAI et al., 1983). As any serpin, AAT has a characteristic secondary structure of alpha helices and beta sheets. Mutations in these regions can lead to polymerization and accumulation in the liver. This happens in human AAT deficiency, an inherited disease, where the deficiency of this enzyme results in failure of inhibition of tissue destruction, leading to pulmonary emphysema and cirrhosis (DE MEO, 2004). This deficiency is a cause of COPD in humans.

RAO in horses shares many common aspects with COPD in man. A genetic susceptibility for RAO was suggested the first time by SCHAEFER (1939). He found that 14 out of 24 descendants of the stallion "Egmont", suffering from RAO, also suffered from the disease. The hereditary basis of RAO in horses was further demonstrated by MARTI et al. (1991) in a clinical study with 90 German Warmblood horses and 42 Lipizzaners. They found that the risk of developing RAO is 3.2 times higher ( $p < 0.05$ ) when one parent (dam or sire) has the disease and 4.6 times higher ( $p < 0.05$ ) if both parents have RAO.

The AAT enzyme, more commonly called protease inhibitor (PI) in horses, is a highly polymorphic biochemical system, with 25 alleles (haplotypes) characterized by two-dimensional electrophoresis (PATTERSON & BELL, 1989). While VINOGRAD et al. (2005) found no association between Pi alleles of horses and RAO, MATTHEWS (1979) found a higher frequency of certain allelic variants in horses that had the disease.

Equine AAT differs from human AAT because it is controlled by a family of four linked loci (multigene), called serpins (Spi 1, 2, 3, 4) (PATTERSON & BELL, 1989). Only the SPi2 gene has been fully sequenced.

Inflammatory airway disease (IAD) also has a high prevalence. It occurs in younger horses affecting performance (WOOD et al., 1999). Despite similar clinical signs, it still is unknown whether young horses with IAD develop RAO (MAIR & DERKSEN, 2000).

The aim of this study was to determine if there is any polymorphism at the exons of the Spi2 gene using single strand conformational polymorphism of DNA (SSCP) and if there is an association between polymorphism and RAO or IAD that could indicate a susceptibility to the diseases.

## **MATERIAL AND METHODS**

Blood samples of 51 thoroughbred horses previously submitted to physical examination of the respiratory tract were collected in tubes containing EDTA. These horses were stabled at different brazilian racetracks and farms located in Paraná, São Paulo and Rio Grande do Sul. The diagnosis of healthy horses (controls, n = 10), and horses showing RAO (n = 18) and IAD (n= 23) was based on clinical signs, bronchoalveolar cytology (HOFFMAN, 1999) and ventigraphy. Once blood had been collected, the tubes were centrifuged in order to separate the buffy coat which was frozen at -80°C until DNA extraction was performed. For DNA extraction 25µl of buffy coat were incubated in lysis buffer [300µl of TNE (0.03g of Tris .0292g of NaCl and 0.09g of EDTA in 50 ml of water), 30µl of 1M Tris-HCl pH 8, 8µl of 25%SDS] and proteinase K (20mg/ml) during 4 hours at 95°C. Then 360µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) were added to the samples, and these were centrifuged at 13.000g for 10 minutes. Absolute ethanol (720µl) was added to the supernatant in order to precipitate the DNA. After centrifugation, the supernatant was discarded and 70% ethanol was added. Samples were again centrifuged, ethanol was discarded and the pellet was

dissolved in 75µl TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA) and then kept frozen at -20°C until use.

Exons 2, 3, 4 and 5 of the Spi2 gene were analysed by PCR-SSCP. Exon 1 has only 8 bp and was not analysed. The primer pairs were designed based on the sequence deposited at Genbank (accession number AF034077) using the Clone7 Manager program to amplify no more than 400 base pairs (bp). The sequences of the primers used were: Exon 2 - 5'TCTTGCAGGACAATGCCATC3'5' (forward) and: 5'GGTTGGTTGTGCAACCTT AC3' (reverse); Exon 3 - 5'TAGACCTTTTCCCACCCTG3' (forward) and: 5'CTGTG GCATCTCAAGGTT3' (reverse); Exon 4- 5'GTGGGCAGGGGCATAGGG3' (forward) and 5'CCACGGACGCAGGGACAGAC3' (reverse) and Exon 5 - 5'CCCGACCCTG CTCAGAAC3' (forward) and 5'GAGAGCTTTGCCCGTCACACTC3' (reverse) and amplified fragments had a size of 687 bp, 346bp, 271 bp and 348 bp respectively. The Exon 2 was cleaved using the Nru I Restriction Enzyme (5' - TCG↓CGA - 3'--- 3' - AGC↑GCT - 5'), resulting in one fragment with 269 bp and another with 422bp.

PCR was performed on a PTC 100TM thermocycler. Samples were maintained 5 minutes at 94°C and then submitted to 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C and 1 minute and 72°C, with a final extension of 7 minutes at 72°C. Amplification was confirmed by 0.8% agarose gel electrophoresis of 5µl of the PCR product with ethidium bromide.

Thereafter the PCR product was mixed with a loading buffer (formamide 95%, 0.5M EDTA and bromophenol blue with 0.5% glycerol) and placed at 95°C during 10 minutes for denaturation. Then it was cooled on ice and loaded on a 8% polyacrylamide gel (21.28 ml 30% acrylamide, 8ml 10x TAE, 40µl TEMED, 0.1 g ammonium persulphate and distilled water up to 80 ml). Electrophoresis was run using 1x TAE buffer at 80V for approximately 48 hours at room temperature.

Staining was performed immersing the gel in a 10% ethanol and 0.5% acetic acid solution for 5 minutes. Then the gel was covered with 0.1% silver nitrate for 5 minutes, rinsed with distilled water and covered with 3% NaOH and 4% formaldehyde solution during 5 minutes. The reaction was finished with 6% acetic acid solution. Reactions were evaluated on a light box.

Allelic and genotypic frequencies were determined by direct count and the association between alleles and genotypes and RAO and IAD was assessed using the compare two proportions test ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTS**

PCR-SSCP analysis of exons 2, 3 and 4 of the Spi2 gene showed no polymorphism. On exon 5, 3 different band pattern could be identified (Fig. 1). They were called A, B and C. Considering the 51 horses allelic frequencies of A, B and C were 55%, 30% and 15%, respectively. The frequency of the homozygous genotypes AA, BB and CC, was 29%, 6% and 4%, respectively and that of the heterozygous AB, AC and BC was 39%, 14% and 8% respectively. The allelic and genotypic frequencies observed in healthy horses and horses with RAO and IAD can be observed on Tab. 1 and 2. An association between the alleles or genotypes of exon 5 of the Spi2 gene and the diagnosis of RAO or IAD could not be determined (Tab. 1 and 2).

## **DISCUSSION**

Although the pathogenesis of RAO is not completely known, environmental and genetic factors seem to play a role. It is also unknown if horses with IAD develop RAO. This

lack of knowledge is responsible for the great number of candidate genes that might be involved with RAO being analysed.

AAT deficiency is a cause of COPD in humans, where 75 alleles have been identified in the Pi system and are related to seric levels of AAT and COPD (MASSI & CHIARELLI, 1994). The diagnosis is made by electrophoresis of serum AAT, serum quantification or analysis of specific DNA mutation.

In the horse, AAT is the most variable biochemical system, with 25 alleles characterized by two-dimensional electrophoresis (PATTERSON & BELL, 1989). Although VINOCCUR et al. (2005) found no association between alleles of this system and RAO in thoroughbred horses, MATTHEWS (1979) observed a higher frequency of certain Pi alleles in cross bred horses with RAO.

On the other hand, the concentration of Pi enzymes is higher in fluid obtained from the lungs of horses with clinical signs of RAO (MILNE et al., 1994). CORBELLA et al. (1977) also found variations in serum levels of AAT in horses with respiratory diseases. This suggests a possible relevance of the AAT in the clinical manifestation of RAO and IAD leading to the analysis using SSCP of the Spi2 gene in this study, the only gene of the serpin family already sequenced, using SSCP.

The Spi2 gene has 5 exons. Exon 1 has only 8pb. The short sequence reduces the probability of polymorphism, so that we decided not to analyse it. The amplified fragments of exons 2, 3 and 4 of the Spi2 gene showed no polymorphism. These fragments had more than 200 bp. This turns the method less sensitive as SHEFFIELD et al. (1993) observed lower sensitivity of the technique when analyzing fragments over 200pb. The amplified fragments had a GC content of approximately 50%. According to NATARAJ et al. (1999) 100-300bp fragments are easily detected by SSCP when they have 60% GC and are not detected when they possess 40% GC. This is attributed to the hydrogen bridges that influence the complexity



of the tertiary structure formed by the DNA tape (CUZEANO et al., 2005). So, it is possible that there are polymorphisms on exons 2, 3 and 4, that were not detected because of their size.

SSCP resulted in identification of 3 alleles (A, B and C) and 6 genotypes (AA, BB, CC, AB, AC and BC) on exon 5 of Spi2 gene. Although SSCP has a sensitivity of less than 100%, it was able to detect polymorphism on this fragment.

There was no significant association between identified alleles and genotypes and the diseases studied but a higher frequency of the A allele was observed in horses with RAO. Similarly a higher frequency of the AA genotype was observed in these animals. It is possible that analyzing a larger population of affected horses the frequencies of these genotypes might turn significant.

It is important to remember that the other serpins (Spi1, Spi3 and Spi4) and different genes may be involved in the pathogenesis of this disease, so that there are many other candidate genes. Recent information in equine and human medicine revealed major differences between human COPD and equine RAO, and greater similarities between RAO and human asthma. RAO in horses is characterized by a reversible narrowing of the airways due to bronchospasm, which is also seen in human asthma but not in human COPD which is a progressive disease, with little reversibility and usually related to smoking (International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, 2000). Therefore, studies of equine RAO based on human medicine currently tend to be guided also by human asthma, and not just by COPD.

Several studies suggest that immunoglobulin E (IgE) may be involved in the pathogenesis of RAO (EDER et al., 2000). In humans, IgE levels are high in asthmatic patients and the ability to produce high or low IgE response is hereditary (MEYERS, 1993) and linked to several genes (BARNERS & MARSH, 1998). IgE levels against fungi were determined in 450 Lipizzaner horses and showed that not only environmental factors, but also genetics

influence in the specific IgE response. A heritability of 0.33 was found for IgE levels against fungi. This means that 33% of the IgE level variation is due to genetic factors (EDER et al., 2001).

Interleukine 4 receptor (ILRA) is also a candidate gene because of its role in human asthma development and because of a possible heterogeneity of the locus (JOST, 2007). In horses there is also evidence that T-helper 2 cells (Th2) are the main source of interleukins (IL). IL-4 and IL-13 are the cytokines involved in the response to inhaled allergens and could be involved in the pathophysiology of RAO in horses (HALLIWALL et al., 1993) due to an imbalance in the Th1/Th2 cytokine profile favoring Th2 cells. The regulation of gene expression that encodes these cytokines depends on the release of transcription factors to promote their regions (BARNES & ADCOCK, 1998).

ANTON et al. (2005) suggested the epidermal growth factor (EGFR) and the calcium dependant chloride channel 1 (CLCA 1) genes as possible candidates to the pathogenesis of RAO. Their expression is strongly induced in the airway epithelium, particularly in the goblet cells, where they mediate airway hyperreactivity and overproduction of mucus.

Recent studies in asthma patients detected the expression of genes involved in eosinophil apoptosis, on the arginase pathway, in response to allergens, interleukins and inhaled corticosteroids. Genetic regions found to be involved in human asthma are the A1AR and CLCA1 genes (chromosome 1), IL-1RN and DPP10 (2q14), HLA-G and TNF- $\alpha$  (6p21), GPRA (7p14),  $\epsilon$  Fc RI and GSTP1 (11q13), NOS1, IFNG, STAT6, VDR, and other genes (12q13-26), PHF11 and flanking genes (13q14), AACT and PTGDR (14q), and ADAM33 (20p13) (MALERBA & PIGNATTI, 2005). The role of these and other genes need to be confirmed, both in humans and equine studies.

## CONCLUSIONS

In conclusion, exons 2, 3 and 4 of the Spi2 gene showed no polymorphism using SSCP but on exon 5 three alleles and six genotypes were identified. The allelic and genotypic frequencies of this polymorphism, however, were not associated with the incidence of RAO or IAD, although animals with RAO have shown a tendency to have the A allele.

## ACKNOWLEDGMENTS

Funding was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**The project was approved by the ethical committee of UFSM under the protocol number #23081.000917/2008-12.**

## REFERENCES

- ANTON, F. et al. Overexpression of eCLCA1 in small airways of horses with recurrent airway obstruction. **J Histochem Cytochem**, v. 53, p. 1011-1021, 2005.
- BARNES, P. & ADCOCK, I. Transcription factors and asthma. **Eur Respir J**, v. 12, p. 221-234, 1998.
- BARNERS, K. C. & MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunol Today**, v.19, p. 325-334, 1998.

BRACHER, V. et al. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. **Equine Vet J**, v.23, p.136–141, 1991.

CORBELLA, E. et al. Serum antiproteases and respiratory diseases of the horse. **Folia Vet Lat**, v. 7(3), p. 258-272, 1977.

CUZEANO, A. E. et al. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. **Rev Peru Biol**, v.12(3), p. 349-358, 2005.

DE MEO D.L. & SILVERMAN E.K. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2 genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. **Thorax**, v.59 (3) p.259-64, 2004.

EDDER, C. et al. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 73, p. 241-253, 2000.

EDDER, C. et al. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. **Equine Vet J**, v. 33, p. 714-720, 2001.

FRANCHINI, M. et al. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Vet. Immunol Immunopathol**, v.66, p.53–65, 1998.

HALLIWALL, R. E. W. et al. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 38, p. 201-215, 1993.

HOFFMAN, A.M. Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. **Equine Vet J**, v.11, p.330-336, 1999.

**INTERNATIONAL WORKSHOP ON EQUINE CHRONIC AIRWAY DISEASE**, Michigan State University, 2000.

- JOST, U. et al. A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. **Equine Vet J**, v. 39(3), p. 236-241, 2007.
- LAI, E.C. et al. Assignment of the alpha-1AT gene and sequence related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. **Am J Hum Genet**, v. 35(3), p.385-392, 1983.
- LARSON, V.L.& BUSCH, R.H. Equine tracheobronchial lavage:comparison of lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Vet Res**, v.46, p.144-46, 1985.
- MAIR T. S.& DERKSEN, Chronic obstructive pulmonary disease: a review. **Eq Vet J**, v. 12, n.1, p. 35-44, 2000.
- MALERBA, G. & PIGNATTI, P. F. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. **J Appl Genet**, v. 46(1), p. 93-104, 2005.
- MARTI, E. et al. The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. **Eq Vet J**, v.23, p.457-460, 1991.
- MASSI, G. & CHIARELLI, C. Alpha 1- antitrypsin: molecular and the Pi system. **Acta Paediatr Suppl**, v. 393, p. 1-14, 1994.
- MATTHEWS, A.G. Identification and characterisation of the major antiproteases in equine serum and an investigation of their role in the onset of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Eq Vet J**, v.11, p.177-182, 1979.
- MC PHERSON, E.A. et al.Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. **EqVet. J**, v.10, p.47-53, 1978.
- MEYERS, D. A. Genetics of atopic allergy: family studies of total serum IgE levels. In: Marsh, D.G. et al. **The genetics of asthma. Oxford: Blackwell Scientific Publications**, p.153-161, 1993.

- MILNE, E. M. et al. Quantitation of alpha -1 proteinase inhibitor in the pulmonary epithelial lining fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Res Vet Sci**, v. 52(2), p. 262-264, 1994.
- NATARAJ, A. et al. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. **Electrophoresis**, v.20, p.1117-1185, 1999.
- PATTERSON, S.D. & BELL, K. The carbohydrate side chains of the major plasma serpin of horse and wallaby: analyses of enzymatic and chemically treated (including 'Smith degradation') protein blots by lectin binding. **Biochemistry International**, v. 20, p. 429-436, 1990.
- PATTERSON, S.D. et al. The equine major plasma serpin multigene family: partial characterization including sequence of the reactive-site regions. **Biochem Genet**, v.29,p.477-499, 1991.
- ROBINSON, N. et al. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. **British Vet J**, v.152 , p.283–306, 1996.
- SCHAEPER, W. Untersuchungen ueber die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd. **Tieraerztliche Rundschau**, v.31, p. 595-599, 1939.
- SHEFFIELD, V. et al. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. **Genomics**, v.16, p.325-332, 1993.
- VINOCUR, M.E. et al. Equine protease inhibitor system as a marker for the diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Gen and Mol Biol.**, v. 28 (3), p.382-385, 2005.
- WOOD, J.L.N. et al. A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definitions, prevalence and incidence. **Eq Infec Diseases VIII**, p.64-70, 1999.

Table 1 –Allelic frequencies of the polymorphism identified on exon 5 of the Spi2 gene in healthy horses and horses with RAO and IAD.

<b>Allele</b>	<b>Healthy (n=20)</b>	<b>RAO (n=36)</b>	<b>IAD (n=46)</b>	<b>Total (n=102)</b>
A	0.5500	0.6388	0.500	0.5588
B	0.2000	0.2777	0.3478	0.2941
C	0.2500	0.0833	0.1521	0.1470

Table 2 – Genotypic frequencies of the polymorphism identified on exon 5 of the Spi2 gene in healthy horses and horses with RAO and IAD.

<b>Genotype</b>	<b>Healthy (n=10)</b>	<b>RAO (n=18)</b>	<b>IAD (n=23)</b>	<b>Total (n=51)</b>
AA	0.2000	0.3888	0.2608	0.2941
BB	0	0.0555	0.0869	0.0588
CC	0.1000	0	0.0434	0.0392
AB	0.4000	0.3888	0.3913	0.3921
AC	0.3000	0.1111	0.0869	0.1372
BC	0	0.0555	0.1304	0.0784





Figure 1- Electrophoretic profile of the polymorphism identified on exon 5 of the SPi2 gene characterized by SSCP on 8% polyacrylamide gel. Lanes 2, 4, 10, 14, 18 and 23 present genotype AA; 1,5,7,11,19, 24, 27 and 28 - AB; 6, 12 -AC; 8, 15 and 16 - BC; sample 13 - CC and 21 - BB. M - DNA Molecular Weight Ladders (100pb).

## 4. CONCLUSÕES

- Não foi detectado polimorfismo nos éxons 2, 3 e 4 do gene Spi2 por meio da técnica SSCP.
- O exon 5 do gene Spi2 apresentou polimorfismo. Foram identificados três alleles.
- Não houve relação entre a frequência alélica e genotípica do exon 5 do gene Spi2 e a manifestação de obstrução recorrente das vias aéreas ou doença inflamatória das vias aéreas, embora animais com ORA possuam uma tendência maior a apresentarem o alelo A.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTON, F. et al. Overexpression of eCLCA1 in small airways of horses with recurrent airway obstruction. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 53, n. 8, p. 1011-1021, maio. 2005.

BARNES, P.; ADCOCK, I. Transcription factors and asthma. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 12, n. 1, p. 221-234, jan.1998.

BARNERS, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunology Today**, Cambridge, v.19, n.9, p. 325-334, set.1998.

BAYLY, W. M.; SLOCOMBE, R.F. Airflow mechanics in models of equine obstructive airway disease under conditions simulating exercise. **Research Veterinary Science**, Londres, v. 62, n. 2, p. 205–211, maio/jun.1997.

BEECH, J. Chronic obstructive pulmonary disease. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 7, n. 1 p. 79-91, abril.1991.

BRACHER, V. et al. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v.23,n. 2, p.136–141, março. 1991.

BRANTLY. M. et al. Molecular basis of alpha 1-antitrypsin deficiency. The **American Journal of Medicine**, Nova York, v. 84, n. 6A, p. 13-31, jun. 1988.

CORBELLA, E. et al. Serum antiproteases and respiratory diseases of the horse. **Folia Veterinaria Latina**, Milano,v. 7, n. 3, p. 258-272, jul/set.1977.

COTTON, R.G. et al. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. **Proceedings of the National Academy Science.**, Washington, v. 85, n.12 p. 4397-4401, jun.1988.

CUZEANO, A. E. et al. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. **Revista Peruana de Biología**, Lima, v. 12, n. 3, p. 349-358, fev. 2005.

DAGLEISH, M. P. et al. Kinetics of equine neutrophil elastase release and superoxide anion generation following secretagogue activation: a potential mechanism for antiproteinase inactivation, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 72, n.3, p. 257-275, dez.1999.

DE MEO D.L.; SILVERMAN E.K. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2:genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. **Thorax**, Londres, v. 59, n.3, p. 259-64, março. 2004.

DERKSEN, F. J. et al. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 58, n. 2 p. 598-604, fev. 1985.

DERKSEN, F. J. et al. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. n.1, 21, p. 23-26, jan. 1989.

DIXON, P. M. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. **Veterinary Record**, Londres, v.131, n.11, p. 229–235, set. 1992.

DIXON, P. M. et al. Equine pulmonary disease: a case–control study of 300 referred cases. Part 1. Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 27, n.6, p. 416–421, nov.1995.

EDDER, C. et al. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 73, n. 3, p. 241-253, março. 2000.

EDDER, C. et al. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 33, n.7, p. 714-720, nov. 2001.

FAIRBAIRN, S. M. et al. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 23, n.10, p. 821-828, out.1993.

FRANCHINI, M. et al. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53–65, nov. 1998.

GERBER, H. The genetic basis of some equine diseases. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 21, n.4, p. 244-248, jul.1989.

GERBER, V. et al. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 32, n.5, p. 411-417, set. 2000.

GOLDRICK, M. et al. Nirca(Tm) – A Rapid Robust Method For Screening For Unknown Point Mutations. **Biotechniques**, Natich, v. 21, n.1, p.106-12, julho.1996.

GRAY, P. R. et al. Decreased airway mucosal prostaglandin E2 production during airway obstruction in an animal model of asthma. **American Review of Respiratory Disease**, Nova York, v.146, n. 2, p.586–591, set. 1992.

HALLIWALL, R. E. W. et al. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 38, n.3-4, p. 201-215, out.1993.

HAYASHI, K. PVR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v.1, n.1, p.34-38, agost.1991.

HOFFMAN, A.M. Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v.11, n.6, p.330-336, jun. 1999.

HOFFMAN, A. M. Newest diagnostic methods for inflammatory airway disease (IAD). In: Proceedings of 48 th **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Orlando, Florida, p. 208-217, dez.2002.

INTERNATIONAL WORKSHOP ON EQUINE CHRONIC AIRWAY DISEASE, (jun-2000), Michigan State University, **Equine Veterinary Journal**, Londres, v.33, n. 1, p. 5-19, jan 2001.

JEAN, D. et al. Monthly, daily and circadian variations of measurements of pulmonary mechanisms in horses with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60 n.11, p. 1341-1346, nov. 1999.

JACKSON, C. A. et al. Prednisone – is it really effective in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease? **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, 1999. Disponível em <<http://www.ivis.org>>. Acesso em 19 jan. 2008.

JOST, U. et al. A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 39, n. 3, p. 236-241, maio. 2007.

KAUP, F. J. et al. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I. Alterations of the larger conducting airways. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 22, n.5, p. 343–348, set.1990.

KAUP, F. J. et al. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: pathomorphological changes of the terminal airways and alveolar region. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 22, n.5 p. 349-355, set. 1990b.

LAI, E. C. et al. Assignment of the alpha-1AT gene and sequence related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 35, n.3, p. 385-392, maio.1983.

LARSON, V. L.; BUSCH, R.H. Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary disease histopathologic findings. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 1, p.144–46, jan.1985.

LAVOIE, J. P. et al. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova York, v. 164, n. 8, p. 1410-1413, out. 2001.

MAIR T. S.; DERKSEN, F. J. Chronic obstructive pulmonary disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 12, n. 1, p. 35-44, jan. 2000.

MALERBA, G.; PIGNATTI, P. F. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 46, n. 1, p. 93-104, jan.2005.

MARTI, E. et al. The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 23, n.6, p. 457-460, nov.1991.

MARTI, E.; BINNS, M. Horse genome mapping: a new era in horse genetics? **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 30, n.1, p. 13-17, jan.1998.

MARTI, E.; OHNESORGE, B. Genetic basis of respiratory disorders. **Equine Respiratory Diseases**, Londres, fev. 2002.

MASSI, G.; CHIARELLI, C. Alpha 1-antitrypsin: molecular and the Pi system. **Acta Paediatrica Supplement**, Oslo, v.83, n. 393, p. 1-4, março. 1994.

MATTHEWS, A. G. Identification and characterisation of the major antiproteases in equine serum and an investigation of their role in the onset of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 11, n. 3 p.177-182, jul. 1979.

McGORUM, B. C. et al. Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. **Veterinary Immunology and Immunopathol**, Amsterdam, v. 36, n. 3 p. 223–237, abril. 1993.

McGORUM, B. C. et al. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. **Research of Veterinary Science**, Londres v. 55, n.1, p. 57-59, jan.1993b.

Mc PHERSON, E. A. et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 10, n.1, p. 47–53, jan.1978.

MILNE, E. M. et al. Quantitation of alpha -1 proteinase inhibitor in the pulmonary epithelial lining fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease. **Research of Veterinary Science**, Londres, v. 52, n.2, p. 262-264, fev. 1994.

NATARAJ, A. et al. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. **Electrophoresis**, Weinheim, v.20, n.6, p.1117-1185, maio.1999.

NOLLAU, P.; WAGENER, C. Methods for detection of point mutation: performance and quality assesment. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 43, n.7, p. 1114-1128, março. 1997.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 276, n.3, p. 522-529, março.1999.

PATTERSON, S.D.; BELL, K. The carbohydrate side chains of the major plasma serpin of horse and wallaby: analyses of enzymatic and chemically treated (including 'Smith degradation') protein blots by lectin binding. **Biochemistry International**, Marrickville, v. 20, n.3, p. 429-436, março.1990.

PATTERSON, S. D. et al. The equine major plasma serpin multigene family: Partial characterization including sequence of the reactive-site regions. **Biochemical Genetics**, Nova York, v. 29, n. 9-10, p.477-499, out. 1991.

RAULO, S. M. et al. Concentrations of elastolytic metalloproteinases in respiratory tract secretions of healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n.9, p. 1067-1073, set. 2000.

ROBINSON, N. E. et al. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. **British Veterinary Journal**, Londres, v. 152, n.1 p. 283–306, jan. 1995.

ROBINSON, N. E. Chairperson's introduction: International workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University, junho, 2000. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 5-19, Londres, 2001.

ROBINSON, N. E. Recurrent Airway Obstruction (Heaves). **Equine Respiratory Disease**, Nova York, nov. 2001. Disponível em <<http://www.ivis.org>>. Acesso em 19 jan. 2008.

RUDOLPH, J. A. et al. Periodic paralysis in Quarter Horses: A sodium channel mutation disseminated by selective breeding. **Nature Genetics**, Nova York, v. 2, n. 2, p.144-147, out. 1992.

SANTSCHI, E. M. et al. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. **Mammalian Genome**, Nova York, v. 9, n.4, p. 306-309, abril.1998.

SCHAPFER, W. Untersuchungen ueber die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd. **Tieraerztliche Rundschau**, Frankfurter, v. 31, p. 595-599, 1939.

SHEFFIELD, V. et al. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. **Genomics**, Sandiego,v.16, n.2 p.325-332, maio. 1993.

SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 98, n.3, p. 503–517, nov. 1975.

VANDENPUT, S. et al. Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 19, n.4, p. 154-158, nov.1997.

VINOCUR, M. E. et al. Equine protease inhibitor system as a marker for the diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 3, p. 382-385, jul/set. 2005.

YU, M. et al. Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 77, n.5, p. 2149-2154, maio. 1994.

WOOD, J. L. N. et al. A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definitions, prevalence and incidence. **Conference on Equine Infectious Diseases VIII**, R&W Publications, Newmarket, United Kingdom, p. 64-70, 1999.