

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOÃO BATISTA FERREIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS DE EQUINOS (*Equus caballus*) E
JUMENTOS (*Equus asinus*) E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
BIOQUÍMICO SÉRICO DE BARDOTOS E DE JUMENTOS DA RAÇA
PÊGA

UBERLÂNDIA

2016

JOÃO BATISTA FERREIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE
HÍBRIDOS DE EQUINOS (*Equus caballus*) E JUMENTOS (*Equus asinus*) E
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE BARDOTOS E DE
JUMENTOS DA RAÇA PÊGA

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias, da
Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Co orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

UBERLÂNDIA

2016

S237 Santos, João Batista Ferreira dos

Desenvolvimento de um método molecular para identificação de híbridos de equinos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*) e caracterização do perfil bioquímico sérico de bardotos e de jumentos da raça Pêga / João Batista Ferreira dos Santos. - Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2016.

81p.:il.:color

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Co orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

1. Asininos. 2. Cavalos 3. DNA Mitocondrial 4. Bioquímica genética
5. Hibridização genética I. Título. II. Universidade Federal de Uberlândia.

CDD: 636.089

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando e Geralda (in memoriam), verdadeiros mestres, que com simplicidade e humildade, mostraram com seus exemplos, o valor da honestidade e honradez.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo de bom que possuo.

A Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Medicina Veterinária.

Ao meu orientador Dr. Maurício Machaim Franco, por quem tenho uma grande admiração, pela sua conduta profissional, ética e científica. Sou muito grato pelo seu incentivo, compreensão e grande ajuda.

Ao Prof. Antonio Vicente Mundim, pela preciosa ajuda e grandes ensinamentos.

Ao colega Prof. Robson Carlos Antunes, pela co-orientação e pelo modelo de pessoa ética.

Ao Prof. José Eugênio Diniz Bastos, pela amizade e coleguismo.

Aos Professores das disciplinas de Pós-Graduação de Ciência Animal: Daise A. Rossi, Frederico Ozanam C. e Silva, Alessandra A. Medeiros, Mara Regina B. M. Nascimento, Evandro de Abreu Fernandes, Anna Correia Lima, Ednaldo C. Guimarães, Carina Ubirajara Silva, Ricarda M. Santos, que dão suas valiosas contribuições ao Programa.

A Médica Veterinária Giovanna Faria Moraes, pela contribuição, amizade e paciência.

A Médica Veterinária Thainara Christie Ferreira Silva, pela grande ajuda.

Ao Dr. Eduardo de Oliveira Melo, pela preciosa colaboração.

À doutoranda Anelise dos Santos Mendonça, pela imensa ajuda.

Aos meus filhos João Paulo e João Henrique por estarem sempre presentes em minha vida, e também por ajudarem na realização deste trabalho.

A minha esposa Alzira, pela compreensão e apoio em todos os momentos de nossas vidas.

A todos os meus familiares, que torcem sempre pela minha vitória em todos os sentidos.

A todos os colegas de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU.

Ao Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, com toda a equipe, em particular, à Dra. Renata Lima de Miranda e ao Felipe, pela grande colaboração.

A EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela contribuição de pessoal e equipamentos.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Célia Regina Macedo, pela atenção e paciência.

Aos proprietários: Euler Miranda (Fazenda Coqueiros), Luis Felipe Haddad (Haras Tarumã), Osvando Antonio Pimenta (Fazenda Beira Céu), que de modo gentil ofereceram seus animais para a realização deste estudo.

A todos que, indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os equídeos possuem grande importância econômica, sendo amplamente utilizados em propriedades rurais, lazer e esporte. Os híbridos (muare e bardoto) são animais pouco estudados e que podem ser confundidos devido à grande semelhança fenotípica entre eles. Além disso, a interpretação do perfil bioquímico sérico dos híbridos e asininos geralmente é feita utilizando-se erroneamente valores de referência para equinos. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: 1) desenvolver um teste rápido e preciso, baseado na avaliação do DNA mitocondrial de bardoto e muare, para diferenciá-los, por meio de um PCR-Multiplex; 2) caracterizar o perfil bioquímico sérico de bardoto e jumentos da raça Pêga e investigar a influência da idade e do sexo nos componentes bioquímicos séricos destes animais. Para o desenvolvimento do teste molecular para a identificação de muare e bardoto, três *primers* específicos para a região D-loop do DNA mitocondrial foram desenhados e uma PCR multiplex foi desenvolvida e validada utilizando amostras de DNA de 77 animais (equinos, asininos, muare e bardoto) de diferentes origens. DNA mitocondrial de origem asinina gera um amplicon específico de 689 pares de base e o de origem equina um de 620 pares de base. Assim, o teste permite identificar com precisão a origem materna dos híbridos, o que é suficiente para determinar se o animal é um muar ou um bardoto. Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos de bardoto foram utilizadas amostras de sangue de 15 animais, sendo oito machos com idade entre 14 e 84 meses e sete fêmeas com idade entre 6 e 84 meses. Verificou-se que a relação albumina globulina A:G, cálcio e relação Ca:P apresentaram valores superiores para animais com idade inferior a 30 meses. Os resultados mostraram que com relação ao perfil bioquímico sérico de bardoto há diferenças para idades, mas não para sexo. Para jumentos foram analisadas amostras sanguíneas de 123 animais da raça Pêga, dos quais 29 eram machos com idade entre 8 dias e 10 anos e 94 fêmeas entre 2 dias e 12 anos de idade. Entre as faixas etárias, houve diferença estatística para proteínas totais, albumina, colesterol, triglicérides, creatinina, fósforo, cálcio, relação Ca:P, magnésio, AST, fosfatase alcalina e GGT. O sexo influenciou nos valores de proteínas totais, globulinas, triglicérides, relação A:G, fósforo, cálcio e CK.

Nota-se que os parâmetros bioquímicos séricos de jumentos da raça Pêga foram influenciados pela idade e pelo sexo. Em conclusão, os resultados obtidos nesse trabalho podem ser utilizados por produtores, criadores e médicos veterinários, sendo importantes para a pesquisa, a clínica e o agronegócio de equídeos.

Palavras chave: Bardoto. Bioquímica sérica. DNA mitocondrial. Asno. *Equus caballus* x *Equus asinus*. Jumento Pêga.

ABSTRACT

The horses have great economic importance, being widely used in farms, leisure and sport. Hybrids (mules and hinnies) are poorly studied animals and can be confused due to the great phenotypic similarity between them. Additionally, analysis of serum biochemical profile of hybrids and donkeys is generally performed using the standard equine erroneously. In this context, the objectives of this study were: 1) to develop a rapid and accurate test based on the evaluation of mitochondrial DNA hinnies and mules, to differentiate them through a PCR-Multiplex; 2) characterize the serum biochemical profile hinnies and donkeys the Pêga breed and investigate whether there is influence of age and sex on serum biochemical components of these animals. For the development of molecular test to identify mules and hinnies three primers specific for the D-loop mtDNA region were designed and a multiplex PCR was developed and validated using DNA samples from 77 animals (horses, donkeys, mules and hinnies) from different sources. Mitochondrial DNA asses rise generates a specific amplicon of 689 base pairs and a source of equine 620 base pairs. Thus, the test allows to accurately identify maternal origin of the hybrid, which is sufficient to determine whether the animal is a mule or hinny. For the evaluation of serum biochemical parameters of hinnies blood samples from 15 animals were used, eight males aged between 14 and 84 months and seven females aged 6 to 84 months. It was found that the albumin globulin ratio A:G, calcium and Ca: P ratio higher values for animals aged less than 30 months. The results showed that with respect to the serum biochemical profile hinnies was differences in age, but not to sex. To asses were analyzed blood samples from animals of the handle class 123, of which 29 were males aged between 8 days and 10 years and 94 females between 2 days and 12 years of age. Among the age groups, there was statistical difference in the total protein, albumin, cholesterol, triglycerides, creatinine, phosphorus, calcium, Ca:P ratio, magnesium, AST, alkaline phosphatase and GGT. Sex influenced the values of total protein, globulin, triglycerides, ratio A:G, phosphorus, calcium and CK. Note that if the serum biochemical parameters of donkeys Pêga breed were influenced by age and sex. In conclusion, the results obtained in this work can be used by farmers, breeders and veterinarians, are important for research, clinical and agribusiness equines.

Key word: Hinny. Serum biochemical. Mitochondrial DNA. *Equus asinus*. *Equus caballus* x *Equus asinus*. Pêga breed donkey.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Principais diferenças fenotípicas e comportamentais entre muare e bardotos.....	17
--	----

CAPÍTULO 2

Table 1. The origin and breed of the animals used in this study.....	36
---	----

CAPÍTULO 3

Quadro 1. Parâmetros bioquímicos séricos avaliados com respectivas metodologias utilizadas para análise clínica.....	41
Quadro 2. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de bardotos machos e fêmeas de acordo com as faixas etárias.....	42
Quadro 3. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de bardotos de acordo com o sexo.....	43

CAPÍTULO 4

Quadro 1. Parâmetros bioquímicos séricos avaliados com respectivas metodologias utilizadas para análise clínica.....	52
Quadro 2. Médias e desvios padrão das proteínas e metabólitos de jumentos da raça Pêga de acordo com as faixas etária.....	53
Quadro 3. Médias e desvios padrão dos minerais e enzimas séricas de jumentos da raça Pêga de acordo com as faixas etárias.....	54
Quadro 4. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de jumentos da raça Pêga de acordo com o sexo.....	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cruzamento entre *Equus asinus* x *Equus caballus*.....15

Figura 2. Híbridos *Equus asinus* x *Equus caballus*.....19

Figura 3. mtDNA de equino e distribuição das diferentes regiões e genes mitocondriais.....21

CAPÍTULO 2

Figure 1. Pictures of representative equids: (A) donkey (Pêga); (B) horse (Mangalarga Marchador); (C) mule; (D) hinny.....36

Figure 2. Agarose electrophoresis of Multiplex-PCR amplicons from eight representative animals. (M) Molecular marker 100 bp ladder (Invitrogen). mtDNA D-loop amplicons:(1,2) horse; (3,4) donkey; (5,6) mule; (7,8) hinny; (9) PCR negative control.....37

Figure 3. Alignment of mtDNA D-Loop sequences. (A) donkey x hinny; (B) horse x mule; (C) horse x hinny; (D) donkey x mule.....37

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	12
1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	13
2.1. Características e peculiaridades de jumentos e híbridos.....	13
2.2. DNA mitocondrial.....	20
2.3. Perfil bioquímico.....	22
Referências.....	24
 CAPÍTULO 2 – Quick method for identifying horse (<i>Equus caballus</i>) and donkey (<i>Equus asinus</i>) hybrids.....	32
Abstract.....	32
1. Introduction.....	32
2. Material and methods.....	33
3. Results and discussion.....	34
References.....	35
 CAPÍTULO 3 - Variações fisiológicas, influência da idade e sexo no perfil bioquímico sérico de bardotos.....	38
Abstract.....	38
Resumo.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos.....	40
3. Resultados.....	42
4. Discussão.....	43
5. Conclusão.....	45
Referências.....	46
 CAPÍTULO 4 - Perfil bioquímico sérico de jumentos da raça Pêga no estado de Minas Gerais.....	48
Abstract.....	48
Resumo.....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e métodos.....	51
3. Resultados.....	52
4. Discussão.....	55
5. Conclusão.....	59
Referências.....	60
ANEXOS.....	63
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais.....	63
ANEXO B - Normas da Revista GMR para submissão do artigo: Quick method for identifying Horse (<i>Equus caballus</i>) and Donkey (<i>Equus asinus</i>) hybrids.....	64
ANEXO C - Aceite da revista Genetics and Molecular Research, do artigo Quick method for identifying Horse (<i>Equus caballus</i>) and Donkey (<i>Equus asinus</i>) hybrids.....	67
ANEXO D - Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira para submissão dos artigos: Variações fisiológicas, influência da idade e sexo no perfil bioquímico sérico de bardotos e Perfil bioquímico sérico de jumentos da raça Pêga no Estado de Minas Gerais.....	68
ANEXO E – Depósito da sequência parcial da região mitocondrial D-loop de asininos e eqüinos.....	70
ANEXO F - Sequência do genoma mitocondrial de Asininos e Equinos.....	72

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Os equídeos estão presentes em uma herança de importância social, cultural e econômica, além de exploração científica, ensino e pesquisa. São figuras fundamentais no desenvolvimento da humanidade, atuando em atividades de trabalho, guerras, na comunicação dos povos e no desempenho do agronegócio (PEREIRA et al., 2015). Mesmo com um rebanho considerável em número de animais, nota-se uma redução gradual desse efetivo, motivado pela substituição, principalmente dos animais empregados nos serviços de tração e mesmo de locomoção, pelos veículos automotrizes como tratores, carros, além de outros (ALMEIDA, 2009).

A estimativa da população de jumentos em 2000 era de 44 milhões no mundo, sendo que a China possui a maior população com 11 milhões e o Brasil com cerca de 1,5 milhões de animais (STARKEY; STARKEY, 2000). Em 2007, segundo Almeida (2009) o número total de jumentos no Brasil era 1.163.316. O rebanho asinino nacional em 2014 era de pouco mais de 900 mil animais (IBGE, 2014). Segundo a FAO (2011), a população mundial de muares é de 11.206.674, e o Brasil possui o terceiro maior rebanho, com 1.269.200 animais, superado apenas pelo México com 3.200.000 e China com 2.697.000.

Apesar do número de animais significativo, as pesquisas referentes à composição genética e bioquímica de asininos e muares são escassas, reforçando a necessidade de mais estudos (AL-BUSADAH; HOMEIDA, 2005; McLEAN et al., 2016). Aluja et al. (2001) afirmam ser necessário que os profissionais da área da Medicina Veterinária dêem a esses animais a devida importância, para que haja a conservação dos mesmos.

Quando se analisa o perfil bioquímico de jumentos e muares, os valores de referência utilizados geralmente são de equino, o que não é uma comparação válida devido às diferentes características entre essas espécies (ALUJA et al., 2001; GIRARDI et al., 2013; McLEAN et al., 2016). Além disso, o estudo de técnicas de identificação genética, análise de parentesco, domesticação, distribuição geográfica e diversidade genética, é possível através de pesquisas com DNA mitocondrial

(mtDNA) (XU et al., 1996; IVANKOVIC et al., 2002; JANSEN et al., 2002; KEYSER-TRACQUI et al., 2005; ALMEIDA, 2009; CHEN et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi determinar as variações fisiológicas dos constituintes bioquímicos séricos nos asininos da raça Pêga (*Equus asinus*) e de bardotos (*Equus caballus* x *Equus asinus*) em boas condições de saúde, para contribuir com o padrão bioquímico sérico dessa raça e desses híbridos, respectivamente, verificando se há diferenças dos componentes bioquímicos entre faixas etárias e entre sexos. Com o intuito de obter uma técnica que possa ser utilizada para fornecer informações confiáveis para criadores e compradores sobre a origem dos híbridos, objetivou-se também com este trabalho desenvolver um teste para a identificação da origem do mtDNA (asinino ou equino) para determinar de forma rápida e precisa se o animal é um muar ou bardoto.

2. Revisão de Literatura

2.1 Características e peculiaridades de jumentos e híbridos

Os jumentos pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Mammalia*, ordem *Perissodactyla*, família *Equidae*, gênero *Equus*, espécie *Equus asinus*, (ARANGUREN et al., 2002; GRINDER et al., 2006).

O termo jumento é originado do latim *Jumentum*, e significa “aquele que se deixa amansar e domesticar”. Há indícios na literatura ressaltando que os romanos acreditavam que o jumento era oriundo da Ásia, por isso o termo *Asinus*, que em português se tornou asno (ARAÚJO, 2010). Para Aranguren-Mendez et al. (2004), Beja-Pereira et al. (2004) e Araújo (2010), os asnos ou jumentos têm origem africana, mais especificamente na região da Núbia, bacia do rio Nilo, onde também foram domesticados, em torno de 4.000 aC. Esses animais chegaram à Europa pelos povos etruscos no ano 2.000 antes de Cristo (aC), porém somente em 400 aC, houve uma maior difusão deles. Os autores atribuem como responsáveis pela formação desses animais duas espécies de asnos, o da Núbia (*Equus asinus africanus*) e o da Somália (*Equus asinus somaliensis*). Ainda, ressaltam que há desencontros de informações sobre a origem do jumento doméstico, pois, há citações da existência de espécies africanas, europeias e asiáticas, entretanto, pela

utilização de testes de DNA, foi comprovada a origem africana do jumento (*Equus asinus*).

Os jumentos são importantes para a produção de muares, usados nas fazendas em vários tipos de trabalhos, nos esportes e lazer (JORDANA et al., 1998). Também continua sendo importante animal para carga, sela, produção de muares, animal de companhia, produtor de carne e leite para consumo humano (SALIMEI et al., 2004; CHENOLL et al., 2007; POLIDORI et al., 2008; SGORBINI et al., 2013; LAUS et al., 2015), além do uso desses animais nos países subdesenvolvidos como tração de implementos agrícolas nas lavouras de subsistência (STARKEY; STARKEY, 2000; KUGLER et al., 2008). Pesquisadores afirmam, que o leite de jumenta pode ser utilizado por crianças alérgicas ao leite de vaca, pois assemelha mais ao leite humano que o de vaca (CARROCCIO et al., 2000; CALDIN et al., 2005).

Dentro do importante mercado equídeo, destacam-se também os muares, híbridos do cruzamento entre *Equus asinus* x *Equus caballus* (TRUJILLO et al., 1962, ARAÚJO; MOYA-ARAÚJO, 2015) e os bardotos que pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Mammalia*, ordem *Perissodactyla*, família *Equidae*, gênero *Equus*, espécie *Equus caballus* x *Equus asinus* (híbrido) (HAMERTON et al., 1969 e 1971; KOPP et al., 1988). Sendo híbridos, os muares e os bardotos (Figura 1) herdam dos pais características desejáveis como vigor, inteligência, longevidade, resistência física e a doenças (PROOPS et al., 2012, McLEAN et al., 2016). Possuem uma grande capacidade de conversão alimentar, são mais restritivos e passam maior tempo sem ingestão de água, além de suportarem carga de até 2/3 do seu peso, em longos percursos (ARAÚJO, 2010), com grande adaptabilidade em mais diversas condições de clima e topografia (OLIVEIRA, 2004; RIBEIRO et al., 2004).

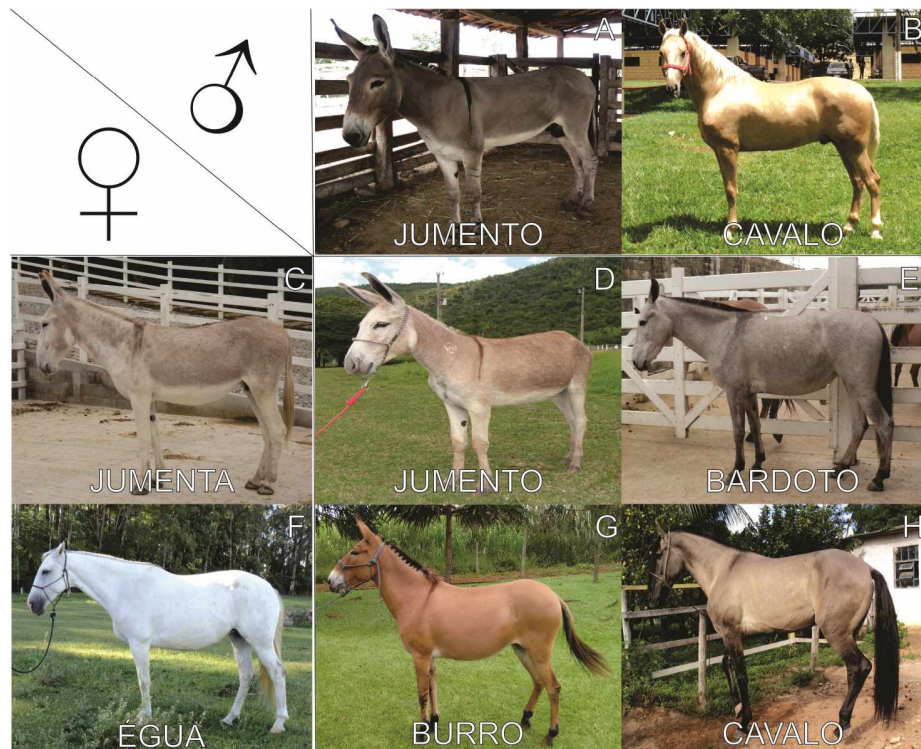


Figura 1 - Cruzamentos entre *Equus asinus* x *Equus caballus*: (A) Jumento x (C) Jumenta = (D) Jumento; (A) Jumento x (F) Égua = (G) Burro; (B) Cavallo x (C) Jumenta = (E) Bardoto; (B) Cavallo x (F) Égua = (H) Cavallo.

A mais antiga inscrição de híbridos equídeos foi encontrada em uma tumba na cidade de Tebas no Egito em 1400 aC., onde aparecia uma parelha de bardotos puxando um carro. Tal afirmação de que esses animais eram bardotos é que no Egito havia poucos garanhões que eram utilizados para cobrição de numerosas jumentas, e a citação mais antiga que se tem notícia sobre estes animais é datada de 1800 aC. na cidade de Ur, no sudoeste asiático (ARAÚJO, 2010). Trujillo et al. (1962), ressaltam que Aristóteles definiu esses animais híbridos como estéreis. Na literatura não há informações claras sobre a classificação dos bardotos, sabendo-se apenas que os mesmos são animais híbridos, assim como os muares.

Por serem usadas várias raças de equinos e asininos para a produção de muares e bardotos, torna-se difícil a caracterização, distinção ou padronização entre esses animais, devido à grande variabilidade genética nas suas formações (McLEAN et al., 2016). O cruzamento mais utilizado é o de macho asinino cobrir a fêmea equina dando origem ao luar, e menos frequente é a produção de bardotos (ARAÚJO, 2010; GOSÁLVEZ et al., 2010). O fator limitante para produção deste híbrido é o pouco interesse do garanhão equino em cobrir a jumenta, juntamente

com baixa taxa de concepção, ao contrário do garanhão asinino que cobre com certa facilidade a égua, levando ainda em consideração que o ambiente uterino de jumentas e éguas é diferente. (TADESSE et al., 2004; McLEAN, 2014). Um dos motivos para a baixa taxa de natalidade no cruzamento de cavalos com jumentas é que o garanhão equino tem maior dificuldade para detectar o cio na jumenta e não a cobre com a mesma facilidade e frequência que o garanhão jumento cobre a égua (TADESSE et al., 2004; SMITH, 2009). Devido ao número ímpar de cromossomos dos híbridos, isso os tornam quase na totalidade das vezes, inférteis (ZHAO et al., 2006).

Apesar de apresentarem desejo sexual e realização de monta, em se tratando de esterilidade, pouco se sabe sobre machos, tanto burros como bardotos, por serem castrados muitas vezes na primeira semana ou ainda dentro do primeiro mês de vida. As fêmeas, mulas e bardotas entram em cio e produzem hormônios sexuais, e as bardotas com maior incidência que as mulas, embora raras vezes, podem ser férteis e dar crias quando acasaladas com garanhões tanto equino ou asinino (ARAÚJO, 2010). Segundo Bernirschke (1969), se a estrutura dos cromossomos parentais for muito variada, possivelmente a sinapse na primeira divisão meiótica fica comprometida, não havendo formação dos gametas (TAYLOR; SHORT, 1973; CHANDLEY et al., 1974). Neste sentido, Allen e Short (1997) afirmam que a falta de produção de espermatozóides nos burros, e uma grande diminuição na produção de ovócitos nas fêmeas mulas e bardotas ao nascimento, é devido a incompatibilidade entre os cromossomos paternos e maternos, o que leva a um bloqueio ou diminuição parcial na meiose. Bernirschke (1967) e Chandley et al. (1974) notaram em seus estudos que as falhas nas sinapses, que são notadas nos espermátócitos, e as diferenças no cariótipo (número de cromossomos) de equinos ($2n=64$; 26 metacêntricos) e asininos ($2n=62$; 38 metacêntricos) são responsáveis pelo não pareamento desses cromossomos na meiose.

Os bardotos, sendo produto do cruzamento entre o macho *Equus caballus* (64 cromossomos) e a fêmea *Equus asinus* (62 cromossomos) (Figura 1), possuem 63 cromossomos e, portanto, são estéreis (GUO et al., 2008). Há relatos de Trujillo et al. (1962 e 1969), de machos bardoto com 62 cromossomos e também com 64 cromossomos. Segundo Short (1997), e relatos da American Donkey and Mule Society, a probabilidade de uma mula ter prole é de um em um milhão, e desde o ano de 1527 foram confirmadas apenas 60 mulas férteis e nenhum macho, burro ou

bardoto tiveram prole. Não foram encontrados relatos de casos semelhantes para bardotas.

Por falta de informações sobre caracterização racial de bardotos, estes muitas vezes são confundidos, e adquiridos como burros ou mulas. Portanto, interferem nas estatísticas sobre o real efetivo do rebanho desses animais. Técnicos e criadores têm dificuldades na identificação desses animais pelo fenótipo, e acabam por fazer comparações do burro como parecido com o cavalo e o bardoto assemelhando ao jumento (BERNIRCHKE et al., 1964; McLEAN, 2014). Trabalhos mais recentes mostram semelhanças mais próximas entre a mãe égua e a cria muar, ao contrário de outros estudos nos quais muares e bardotos não possuem semelhanças com seus progenitores, sugerindo que mais pesquisas deverão ser realizadas para maiores esclarecimentos de diferenças fisiológicas e bioquímicas entre bardotos e muares (McLEAN e WANG, 2013 e McLEAN et al., 2014).

Há diferença entre os cruzamentos que geram os muares e bardotos, e estes possuem características distintas que são apresentadas no quadro 1 e figura 2.

Quadro 1 - Principais diferenças fenotípicas e comportamentais entre muares e bardotos.

Muar	Bardoto
Cabeça “pesada” e comprida lembrando a do pai (jumento).	Cabeça curta, proporcional à do pai (cavalo).
Orelhas longas, menores que a do jumento com implantação vertical ou lateralizadas.	Orelhas mais longas que a do cavalo, e mais curtas que a do muar, com implantação vertical.
Olhos pequenos, com arcada orbitária mais saliente.	Olhos maiores que os do muar, com arcada supra-orbitária saliente.
Narinas pequenas, pouco dilatadas.	Narinas muito dilatadas esboçando uma falsa narina.
Crina e cauda com pelos mais ralos lembrando a cauda do jumento.	Crina e cauda longas com pelos volumosos e longos, lembrando a cauda do cavalo.
A cauda comporta-se entre as nádegas sem apertar.	Tendência a recolher a cauda entre as nádegas, como nos asininos.

Os cascos são semelhantes aos do asinino, porém maiores.	Os cascos são semelhantes aos dos muares, porém menores e de talões mais baixos e menos “duros”.
Presença de castanhas nos membros anteriores. Pode faltar uma ou duas castanhas nos membros posteriores.	Presença de castanhas geralmente nos quatro membros, como no equino.
Possui cinco vértebras lombares como no asinino, logo possui a coluna lombar mais rígida e forte.	Possui seis vértebras lombares como no cavalo. Logo, maior tendência ao andamento marchado.
Tendência à marcha áspera.	Tendência à andadura.
Flexiona o pescoço com mais facilidade.	Pescoço mais rígido, com maior dificuldade para flexionar e menos sensível ao comando de rédeas
Sua voz lembra o zurrar do jumento.	Sua voz lembra mais o relinchar do cavalo.
Porte maior, lembrando a mãe (égua).	Porte menor, lembrando a mãe (jumenta).
O período de gestação é de 11,5 meses.	O período de gestação é de 12 meses, como nos jumentos.
Constituição melhor definida com formas mais regulares e esbeltas, pernas mais compridas. Suporta condições adversas, sem exaurir.	Constituição mais fraca, menos resistente, entra em exaustão mais fácil que o muar. Pernas mais curtas e ancas mais arredondadas. Geralmente são menores, peito mais estreito e pescoço mais longo.
O parto da égua, para o nascimento do muar, é mais fácil do que o nascimento do potro equino. O muar geralmente é de porte menor que o cavalo.	O parto para o nascimento do bardoto tem certa dificuldade, por ser a jumenta de menor porte que a égua e dimensões menores da bacia pélvica da jumenta
Tendência a agitar a cauda (cabear).	Difícilmente agita a cauda.
Tendência a corcovear.	Difícilmente corcoveia.
Maior disposição e rendimento em terrenos acidentados	Mostra pouca disposição em andamentos em terrenos acidentados.

Menor tendência a empacar.	Maior tendência a empacar.
Ao ser golpeado na anca, desloca para frente e tende a agitar a cauda.	Ao ser golpeado na anca, desloca lateralmente e com a cauda recolhida entre as nádegas.
As mulas possuem menor fecundidade.	As bardotas são mais férteis.

Adaptado da Fonte: Araújo (2010).



Figura 2 – Híbridos *Equus asinus* x *Equus caballus*: (A) Burro; (B) Bardoto; (C) Mula; (D) Bardota.

Com relação ao comportamento e temperamento desses híbridos, há diferenças como as relatadas por Curley e Mashoodh (2010), Proops et al. (2012). As mulas e burros optam pela companhia de equinos ou de outros muares, já os bardotos têm preferência à companhia de asininos ou outros bardotos. Esses mesmos autores atribuíram esse comportamento devido ao fato de muares serem criados na companhia da mãe que é uma égua e os bardotos serem criados e acompanhados pela mãe que é uma jumenta.

2.2 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) é de grande importância em estudos filogenéticos e por isso se tornou de grande interesse para os geneticistas evolutivos (WILSON et al., 1985). O mtDNA abriu novas perspectivas com relação ao estudo da genética de populações, pois este é transmitido uniparentalmente, ou seja, é uma herança apenas materna e essencialmente haplóide (ALMEIDA, 2009; SATO; SATO, 2013).

O genoma mitocondrial é mais fácil de purificar e caracterizar do que qualquer outro segmento do DNA nuclear, o que o faz um dos componentes mais conhecidos do DNA eucariótico. Isso ocorre devido ao grande número de cópias do mtDNA e por ocorrer em uma organela fora do núcleo (WILSON et al., 1985). Além disso, ele é pequeno e não possui íntrons e sequências repetitivas como ocorre no DNA nuclear (WILSON et al., 1985).

Além da contribuição apenas materna, o mtDNA apresenta outras particularidades. Ele é formado por uma fita dupla de DNA circular, na maioria dos animais, possui 16 kilobases (kb); apresenta ausência de recombinação, com algumas exceções; é um marcador extranuclear que possui poucos genes, totalizando 37, sendo 13 codificadores de proteínas, 22 genes para RNA transportador e 2 para as subunidades ribossomais e possui uma região controle denominada de região D-loop, a qual não codifica proteína (WILSON et al., 1985; BOORE, 1999; ARIAS et al., 2003; ALMEIDA, 2009; SATO; SATO, 2013). Nos equinos o tamanho do mtDNA é de 16.660 pb e nos jumentos 16.670 pb (XU; ÁRNASON., 1994; XU et al., 1996). A Figura 3 mostra a estrutura do mtDNA de equino, com a distribuição das diferentes regiões e genes mitocondriais.

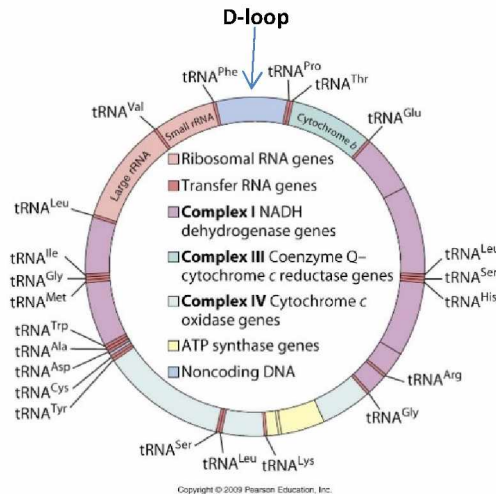


Figura 3.- mtDNA de equino e distribuição das diferentes regiões e genes mitocondriais.

Fonte: <<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/1824.jpg>>

Os genes do mtDNA possuem uma ordem muito conservada, principalmente os codificadores de proteínas e subunidades ribossômicas (ARIAS et al., 2003). Alterações nessa organização só são vistas em animais filogeneticamente distantes, como por exemplo, entre insetos e mamíferos (ARIAS et al., 2003).

A região D-loop possui características que a torna particularmente interessante. Ela possui alta taxa de variação de sequência, diferentemente da região que codifica proteínas, e ausência de recombinação. Estas duas características combinadas, associadas à herança unicamente materna, permitem o uso dessa região como uma importante ferramenta para o estudo matrilinear dentro de uma espécie (AQUADRO; GREENBERG, 1983; VIGILANT et al., 1989; BOWLING et al., 2000). Essa região controle evolui de forma muito rápida quando comparada com o DNA nuclear, além disso, é possível detectar diferenciação entre linhagens domésticas pela variação de sua sequência. Tudo isso a torna extremamente necessária nos estudos da diversidade genética, da estrutura filogenética e o método de escolha para estudos dentro de uma espécie (BRUFORD et al., 2003).

Segundo Kim et al. (1999), o sequenciamento de mtDNA apresenta melhores resultados na análise das relações filogenéticas entre raças de cavalos, pois ele detecta todos os sítios polimórficos. O mtDNA foi utilizado em vários estudos para determinar a origem e relação filogenética em várias raças de cavalo (ISHIDA et al.,

1995; KIM et al., 1999; JANSEN et al., 2002; KEYSER-TRACQUI et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2011) e jumentos (XU et al., 1996; IVANKOVIC et al., 2002; CHEN et al., 2010). Assim, o estudo do mtDNA permite identificar a origem materna (asinino ou equino) dos muares e bardotos e com isso é possível diferenciá-los.

2.3 Perfil bioquímico

O perfil bioquímico sérico é de aplicação prática na medicina veterinária, e o seu conhecimento é muito importante, pois fornece informações precisas para diagnosticar e também tratar as doenças (GONZALEZ e SILVA, 2003). Para utilização desses elementos é preciso conhecer os valores fisiológicos normais, e levar em consideração as variações que podem influenciar esses valores, como raça, espécie animal, manejo, estado de saúde, idade (SARTOR et al., 1985; PAYNE; PAYNE, 1987; CARLSON, 1994; XIMENES et al., 1994; GONZALEZ; SILVA, 2003; DUNCAN et al., 1994; LORDING, 2008).

O conhecimento desses dados é importante porque permite ao clínico veterinário, diagnosticar, tratar e avaliar a eficácia de terapia (FERNANDES, 1994). Além dos fatores mencionados, também deve ser observado o método de coleta, o ambiente e região onde os animais são criados, alimentação e os métodos empregados pelos laboratórios de análise de diagnóstico (HANDELMAN; BLUE, 1993).

A quase inexistência de referências hematológicas e bioquímicas em muares, tanto na literatura nacional como na internacional, leva os veterinários a utilizarem os parâmetros ou perfis bioquímicos de equinos para comparação com estas espécies, o que pode incorrer a erro de interpretação (ZINKL et al., 1990; JORDANA et al., 1998; ALUJA et al., 2001; MORI et al., 2003; TRACHSEL et al., 2005; VERONESI et al., 2014; McLEAN et al., 2016).

Diagnósticos de doenças são muitas vezes dependentes de testes laboratoriais que fornecem valores de referência dos perfis normais, sendo utilizados para comparação (DUNCAN et al., 1994; ETANA et al., 2011). O uso do perfil bioquímico é importante na medicina equina para determinar o estado de saúde dos animais (MUNÕZ et al., 2012). Tasker (1978), nos estudos realizados com asininos, já sinalizava a necessidade de determinação de valores de referência para a espécie, entretanto, nas décadas subsequentes, poucas pesquisas foram realizadas.

Por outro lado, existem muitos trabalhos tratando de perfil bioquímico sérico em equinos (STAMPFLI; CARLSON, 2001; MUNDIM et al., 2004; FRANCISCATO et al., 2006; LACERDA et al., 2006; CAMPELO, 2008; NOLETO, 2012) em várias regiões, com diferentes tipos de manejos na criação desses animais, sexo, raças e condições ambientais.

No Brasil a literatura é escassa, pouco se conhece sobre a bioquímica sérica em muare e jumentos e, até o momento, não foram encontradas essas informações em relação aos bardotos. Na literatura internacional foi encontrado apenas um estudo de McLean et al., 2016 sobre valores ou perfis bioquímicos em bardotos.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; ALMEIDA, L. D.; PAIVA, S. R.; SERENO, F. T. P. S.; MARIANTE, A. S. Filogeografia de raças equinas do Brasil e sua importância para programas de conservação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48, Belém. Anais... **Belém**.PA: SBZ, 2011.
- AL-BUSADAH, K. A.; HOMEIDA, A.M. Some physical variables, biochemical and hematological parameters in: Hassawi Ass. **Scientific Journal of King Faisal University**, Hofuf, v.6, n. 1,p. 145-152, 2005.
- ALMEIDA, L. D. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- ALLEN, W.R.; SHORT, R. V. Interspecific and Extraspecific Pregnancies in Equids: Anything Goes. **Journal of Heredity**, Cary, NC, v. 88, n. 5, p. 384-392, 1997.
- ALUJA, A. S.; BOUDA, J.; LÓPEZ, A. C.; CHAVIRA, H. H. Valores bioquímicos en sangre de burros antes y después del trabajo. **Veterinaria México**, v. 32, n. 4, p. 271-278, 2001.
- AQUADRO, C. F.; GREENBERG, B. D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics**, v. 103, n. 2, p. 287-312, 1983.
- ARANGUREN-MENDEZ J.; GÓMEZ M.; JORDANA J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. **Heredity**, v.89, n. 3, p. 207-211, 2002.
- ARANGUREN-MENDEZ, J. A.; BEJA-PEREIRA, A.; AVELLANET, R.; DZAMA, K.; JORDANA, J. Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish breeds (*Equus asinus*). **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.121, n. 5, p. 319-330, 2004.
- ARAÚJO, N.A. Origem histórica do Jumento doméstico, **GRAFIPRESS**, Patos de Minas MG, 2010.320 p.
- ARAÚJO, G. H. M.; MOYA-ARAÚJO, C. F. Particularidades e possíveis vantagens no uso de mulas como receptoras de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 220-222,2015.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. Apoidea Neotropica (**GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.**). **Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma**, p. 305-309, 2003.

BEJA-PEREIRA, A.; ENGLAND, P. R.; FERRAND, S. J.; BAKHIET, A. O.; ABDALLA, M. A.; MASHKOUR, M.; JORDANA, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G.; Africans Origins of the Domestic Donkey. **Science**.v. 304 p. 1781.2004

BERNIRSCHKE, K.; LOW R. J.; SULLIVAN M. M.; CARTER R. M. Chromosome study of an alleged fertile mare mule. **Journal of Heredity**. 55: 31-38.1964.

BERNIRSCHKE, K. Comparative aspects of reproductive ailure. **In: International Conference at Dartmouth Medical School**. Hanover. p. 220-221.1964.

BERNIRSCHKE, K. Sterility and Fertility Interespecific Mammalian Hybrids. **Comparative Aspects of Reproductive Failure**: p 218-234.1969.

BOORE J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**. v.27, n.8, p. 1767-1780, 1999.

BOWLING, A. T.; DEL VALLE, A.; BOWLING, M. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. **Animal Genetics**. v. 31, n. 1, p. 1 – 7,2000.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**. v. 4, n. 11, p. 900-910, 2003.

CALDIN, M.; FURLANELLO, T., SOLANO-GALEGO, I.; DE LORENZI, D.; CARLI, E.; TASCA, S.; LUBAS, G.. Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, n. 1, p. 5-12. 2005.

CAMPELO, J. A. C. S. Perfil bioquímico sérico de éguas gestantes e não gestantes das raças brasileiras de hipismo e bretão. . Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2008. 56f. **Tese** (Doutorado em Clínica Médica Veterinária). 2008.

CARLSON, G.P. Testes de química clínica; **in: Smith, B.Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. v.1. São Paulo, Manole: p. 395-423.1994.

CARROCCIO, A.; CAVATAIO . F., MONTALTO. G. Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infance: Clinical characteristic and dietary treatment. **Clin Exp Allergy**,n. 30,p 1597-603,2000.

CHANDLEY, A. C.; JONES, R. C.; DOTT, H. M.; ALLEN, W. R.; SHORT, R. V. Meiosis in interspecific equine hybrids. The male mule (*Equus asinus* x *E. caballus*), and hinny (*Equus caballus* x *E. asinus*). **Cytogenet. Cell Genet.**.. v.13, p 330-341, 1974.

CHEN, J.; SUN, Y.; MANGLAI, D.; MIN, L.; PAN, Q. Maternal genetic diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. **Livestock Science**, v. 131, n. 2, p. 272-280,2010.

CHENOLL, C.; HEREDIA, L.S.; FITO, P. Application of the systematic approach to food engineering systems (SAFES) methodology to the salting and drying of a meat product: Tasajo. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 2, p. 258-266, 2007.

CURLEY, J. P. e MASHOODH, R. Parent-of Origin and Trans-Generational Germline Influences on Behavioral Development: The Interacting Roles of Mothers, Fathers, and Grandparents. **Developmental Psychobiology**. p 1-19, 2010.

DUNCAN, J.R., PRASSE K.W., MAHAFFEY, E.A. Veterinary laboratory medicine clinical pathology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 118-122, 1994.

ETANA, K.M., JENBERE, T.S., BOJIA, E., NEGUSSIE, H. Determination of reference hematological and serum-biochemical values for working donkeys of Ethiopia. **Veterinary Research**, v.4, n.3, p. 90-94, 2011.

FAO Food and Agriculture Organization. United Nations. 2011.

FERNANDES, W.R. Alterações dos parâmetros de eletrocardiograma e crase sanguínea em eqüinos das raças Árabe e Mangalarga, bem como mestiços, submetidos a prova de enduro. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 1994.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; VEIGA, A. P. M.; MARTINS, D. B.; EMANUELLI, M. P.; OLIVEIRA, L. S. S. Atividade sérica das enzimas AST, CK e GGT em cavalos Crioulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 10, p. 1561 – 1565, 2006.

GIRARDI, A. M., MARQUES L. C., TOLEDO C. Z. P., BARBOSA J. C., MALDONADO, J.R. W., JORGE R. L. N., NOGUEIRA C. A. S. Biochemical profile of Pêga donkey (*Equus asinus*) breed: influence of age and sex. **Comp Clin Pathol**. p1718-1724, 2013.

GRINDER, M.I.; KRAUSMAN P.R.; HOFFMAN, R.S. *Equus asinus*. Mammalian species. 794: p.1-9. 2006.

GONZALEZ, F.H.D. e SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária In: **Gonzalez, F.H.D. Perfil bioquímico sanguíneo**. Porto Alegre: UFRGS, p.1-11, 2003.

GOSÁLVEZ, J., CRESPO, F.; VEGA-PLA J. L.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; CORTÉS-GUTIERREZ, E. I.; DEVILA-RODRIGUEZ, M. I.; MEZZANOTTE, R. Shared Y chromosome repetitive DNA sequences in stallion and donkey as visualized using whole-genomic comparative hybridization. **European Journal of Histochemistry** 54:10-13. 2010.

GUO, S.; LU, J.; LI, H.; YE, J.; MA, F.; WANG, Y.; LI, Q.; ZHANG, F. Mule of hinny might be natural model for studying the role of parent genomes in carcinogenesis. **Medical Hypotheses**, v. 71, n.5, p. 810-811, 2008.

- HANDELMAN, C.T.; BLUE, J. Laboratory data: read beyond the numbers. In: Veterinary Laboratory Medicine: in practice Trenton: **Veterinary Learning Systems**, p. 37-44.1993.
- HAMERTON, J. L.; GIANELLI. F. COLLINS, F.; HALLET, J.; FRYER, A. Non-random x-inactivation in the female mule. **Nature** v.222: p.1277-1278,1969.
- HAMERTON, J. L.; RICHARDSON, B. J.; GEE, PHILLIS A. Non-random X chromosome expression in female mules and hinnies. **Nature**, v. 232, p. 312-315, 1971.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal (PPM). 2014.
- ISHIDA, N.; OYUNSUREN, T.; MASHIMA, S.; MUKOYAMA, H.; SAITOU, N. Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus Equus with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalskii's wild horse and domestic horse. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 2, p. 180-188,1995.
- IVANKOVIC, A.; KAVAR, T.; CAPUT, P.; MIOC, B.; PAVIC, V.; DOVC, P. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. **Animal Genetics**, v. 33, n. 3, p. 169-177,2002.
- JANSEN, T.; FORSTER, P.; LEVINE, M. A.; OELKE, H.; HURLES, M.; RENFREW, C.; WEBER, J.; OLEK, K.. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10905-10910,2002.
- JORDANA, J.; FOLCH, P.; CUENCA, R. Clinical biochemical parameters of the endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. **Research in Veterinary Science**, London, v.64, p. 7-10, 1998.
- KEYSER-TRACQUI, C.; BLANDIN-FRAPPIN, P.; FRANCFORT, H. P.; RICAUT, F. X.; LEPETZ, S.; CRUBEZY, E.; SAMASHEV, Z.; LUDES, B. Mitochondrial DNA analysis of horses recovered from a frozen tomb (Berel site, Kazakhstan, 3rd Century BC). **Animal Genetics**, v. 36, n. 3, p. 203-209, 2005.
- KIM, K.; YANG, Y. H.; LEE, S. S.; PARK, C.; MA, R.; BOUZAT, J. L.; LEWIN, H. A. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. **Animal Genetics**, v. 30, n. 2, p. 102-108,1999.
- KOPP, E.; MAYR, B.; SCHLEGER, W. Ribosomal RNA expression in a mammalian hybrid, the hinny. **Chromosoma**, v. 96, n. 6, p. 434-436,1988.
- KUGLER, W.; GRUNENFELDER, H.P.; BROXHAM, E. Donkey breeds in Europa. St. Gallen, Switzerland: Monitoring institute for rare breeds and seeds in Europe.2008.
- LACERDA, L.; CAMPOS, R.; SPERB, M.; SOARES, E.; BARBOSA, P.; GODINHO, E.; FERREIRA, R.; SANTOS, V.; GONZÁLEZ, F. D. Hematologic and biochemical

parameters in three high performance horse breeds from southern Brazil. **Archives of Veterinary Science**. v. 11, n. 2, p. 40 – 44, 2006.

LAUS, F.; SPATERNA, A.; FAILACE, V.; PAGGI, E.; SERRI, E.; VULLO, C.; CERQUETELLA, M.; TESEI, B. Reference values for hematological and biochemical parameters of mixed breed donkeys (*Equus asinus*). **Wulfenia Journal**, Klagenfurt, Austria. v. 22, n.1, p. 294-304, 2015.

LORDING P. Erythrocytes. **Vet. Clin. Equine**. v.24: p. 225-237, 2008.

McLEAN, A. K.; W. WANG. Pilot Study comparing hematologic and serum biochemical parameters in healthy horses (*Equus caballus*) and mules. Proceedings of 2013 Equine Science Society Symposium, **Journal of Equine Veterinary Science**, May , v. 33, n. 5, p. 352-354, 2013.

McLEAN, A.K., W. WANG, F.J.; NAVAS-GONZALEZ,; RODRIGUES, J. B. Haematological and serum biochemical parameters in healthy working horses, donkeys, mules and hinnies in Portugal and Spain. **Proceedings 7th International Colloquium on Working Equid**, Royal Holloway, University of London, London, U.K..2014.

McLEAN, A.K. Comparing the physiological and biochemical parameters of mules and hinnies to horses and donkeys. Animal Science Department, North Carolina State University, Raleigh, NC USA, 2014. 11p.

McLEAN, A. K.; WANG, W.; NAVAS-GONZALES, F. J.; RODRIGUES, J. B. References intervals for hematological and blood biochemistry references values in health mules and hinnies. **Comp Clin Pathol**. DOI 10.1007/s00580-016-2276-3. 2016.

MORI, E.; FERNANDES, W.; MIRANDOLA, R.M. S.; KUBO, G. ;FERREIRA, R. R.; OLIVEIRA, J. V.; GACEK, F. Reference values on serum biochemical parameters of Brazilian Donkey (*Equus asinus*) Breed. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 23, n.8, p. 358-364, 2003.

MUNDIM, A. V.; TEIXEIRA, A. A.; GALO, J. A.; CARVALHO, F. S. R. Perfil bioquímico e osmolaridade sanguínea de equinos utilizados para trabalho em centros urbanos. **Bioscience Journal**. v. 20, n. 4, p. 135–142, 2004.

MUNÓZ, A.; RIBER, C.; TRIGO, P.; CASTEJÓN, F. Age and gender related variations in hematology, clinical biochemistry, and hormones in Spanish fillies and colts. **Research in Veterinary Science**. New York, n. 93, p. 943-949, 2012.

NOLETO, P. G.; Perfil bioquímico sérico de equinos submetidos a prova de esforço físico. Uberlândia: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012. 49f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Animal).2012.

OLIVEIRA J. Adequação da hemodiálise em equinos hígidos: Avaliação clínica e laboratorial. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 289p.2004.

PAYNE, J.M.; e PAYNE, S. The metabolic profile test. Oxford: New York; Oxford University Press, 1987, 179p.

PEREIRA L. G., REGATIERI. C., FERRAZ G. C., NETO A. Q., CURI R. A. Perspectivas do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de eqüinos de corrida da raça Quarto de Milha. **Veterinaria e Zootecnia**. v.22, n.3,p. 347-369, 2015.

POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S.; CAVALUCCI, C.; BEGHELLI, D. Quality of donkey meat and carcass characteristics. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 1222-1224, 2008.

PROOPS, L.F.; BURDEN, F.; OSTHAUS, B. Social relation in a mixed group of mules, ponies and donkeys reflect differences in equid type. **Behavioural Processes**, v. 90, p. 337-342, 2012.

RIBEIRO, C.R., MARTINS, E.A.N., RIBAS, J.A.S. & GERMINARO, A. Avaliação de constituintes séricos em equinos e muare submetidos à prova de resistência de 76 km, no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.1081-1086, 2004.

SALIMEI, E; FANTUZ, F.; COPPOLA, R. Composition and characteristics of ass's milk. **Animal Research**, v. 53, n. 1, p. 67-78, 2004.

SARTOR, F.I; JACOBSON, R.G.; KOHAYAGAWA, A.; MACHADO, M.A.; CURI, P.S. Determinações bioquímicas de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, proteínas totais, albumina, bilirubina total e direta no soro de eqüinos da raça Quarto de Milha. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 3, p. 229-239, 1985.

SATO, M. e SATO, K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **Molecular Cell Research**. v.8: p.1979-1984, 2013.

SGORBINI, M. BONELLI, F.; ROTA, A., BARAGLI, P., MARCHETTI, V., CORAZZA, M. Hematology and clinical chemistry in Amiata donkey foals from birth to 2 months of Age. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.35-39, 2013.

SHORT, R. V. An introduction to mammalian interspecific hybrids. **Journal of Heredity**. v 88 n5; p 355-357, 1997.

SMITH, C.D. The book of mules: Selecting, breeding and carring of equine hybrids. Connecticut: The Globe Pequot Press. 2009.

STAMPFLI, H. R.; CARLSON, G. P. How to use the routine serum biochemical profile to understand and interpret acid-base disorders in the horse. **AAEP Proceedings**. v. 47, p. 257-261, 2001.

STARKEY, P.; STARKEY, M. Regional and world trends in donkey populations. A resource book of the Animal Traction Network for eastern and Southern Africa (ATNESA). In: STARKEY, P.; FIELDING, D. (Eds.). Donkeys, people and development. Wageningen: **ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation** (CTA), p. 10-21,2000.

TADESSE, G.; ABAYNEH, T.; GEBREAB, F.; TEFERA, M.; WIRTU, G. A study on hinny production from local jennies (*Equus asinus*) and stallions (*E. caballus*) in Ethiopia: Normal offspring produced. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, n.2, p.192-192, 2004.

TASKER, J.B. Reference values for clinical chemistry using the Coulter Chemistry System. **Cornell Vet.** v. 4, n. 68, p. 460-479, 1978.

TAYLOR, M. J.; SHORT, R. V. Development of germ cells in the ovary of the mule and hinny. **J Reprod Fert.** V.32, p. 441-445, 1973.

TRACHSEL, D., BREHM, W., TSCHUDI, P. Reference values for hematology and clinical chemistry in donkeys. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, v. 1, p. 55-60, 2005.

TRUJILLO, J. M.; STENIUS, C.; CHRISTIAN, L. C.; OHNO, S. Chromosomes of the horse, the donkey, and the mule. **Chromosome** (Berl.) v.13, p. 243-248, 1962.

TRUJILLO, J. M.; OHNO, S.; JARDINE, J. H.; ATKINS, N. B. Spermatogenesis in a male hinny, histological and cytological studies. **Journal of Heredity**, v. 60 n.2: p.79-84, 1969.

VERONESI, M.C.; GLORIA, A.; PANZANI, S.; SFIRRO, M.P.; CARLUCCIO, A., CONTRI, A. Blood analysis in newborn donkeys: hematology, biochemistry, and blood gases analysis. **Theriogenology**, v. 82 ,p.294-303, 2014.

VIGILANT, L.; PENNINGTON, R.; HARPENDING, H.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v.86, p. 9350-9354, 1989.

WILSON, A. C.; REBECCA, L. C.; STEVEN, M. C.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p. 375-400, 1985.

XIMENES, L. A.; PINTORI, G.; CODA, S.; CUBEDDU, G.M.; PUDDU, P. Indagine su costati ematochimiche di equine anglo-arabo-sarde. **La Clinica Veterinaria**, v.107, n. 2, p. 49-51, 1994.

XU, XIUFENG; ÁRNANSON, U. The complete mitochondrial DNA sequence of horse. *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of control region. **Gene**, v. 148, n. 2 p. 357-362, 1994.

XU, X.; GULLBERG, A.; ARNANSON, U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 5, p. 438-446, 1996.

ZHAO, C. J.; QIN, Y. H.; LEE, X. H.; WU, C. Molecular and cytogenetic paternity testing of a male offspring of a hinny. **J. Anim. Breed. Genet.** v.123, p. 403-405, 2006.

ZINKL, J.G.; MAE, D.; MERIDA, G.P.; FARVER, T.B.; HUMBLE, J.A. Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). **Am J Vet Res**, v.51, n.3, p.408-413.1990.

CAPÍTULO 2

Quick method for identifying horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) hybrids.

Running Head: Method for identifying Equid hybrids.

Authors

Maurício M. Franco^{1,2,3,4}, João B. F. dos Santos², Anelise S. Mendonça³, Thainara C. F. Silva², Robson C. Antunes², Eduardo O. Melo¹

¹Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil

²Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

³Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

⁴Corresponding author: mauricio.franco@embrapa.br. Tel: +556134484693

ABSTRACT - The domestication of the *Equus* genus 5,000 to 6,000 years ago has influenced the history of human civilization. As soon as horse and donkey species had been domesticated, they were crossbred, producing humanity's first documented attempt at animal genome manipulation. Since then, the mule (male donkey X female horse) and the reciprocal cross, the hinny (male horse X female donkey) have been the most common equine hybrids in the world. Due to their hybrid vigor, the mule and hinny have been intensively used for carrying loads and people and for tilling the land, from the ancient civilizations of Egypt, Mesopotamia, China and the Roman Empire until today; they are, indeed, essential to our civilization. Despite their importance, the visual distinction of mules and hinnies is not easy due to their phenotypic resemblance. However, the distinction between these two hybrids is of pivotal importance for Equid breeders and ranchers. In this study, an easy, low-cost and fast Multiplex-PCR method was developed to distinguish the maternal origin of horse and donkey hybrids (mule and hinny), using the hyper-variable mitochondrial DNA D-loop region as a PCR target. This methodology can help breeders, ranchers, animal science professionals and researchers to manage their equine herds (donkeys, horses, hinnies, and mules) with more confidence and precision.

Key Words: Genotyping, Hinny, Mule, Multiplex-PCR

INTRODUCTION

The exact date and details of the domestication of the horse (*Equus caballus*; 2n=64) are uncertain, but recent DNA analysis data suggest multiple domestication events around 5,000 years ago (Jansen et al. 2002). The domestication of the donkey (*Equus asinus*; 2n=62) probably occurred around 6,000 years ago in North Africa (Egypt area) from the Nubian and Somalian ass (*E. a. africanus* and *E. a. somaliensis*) (Beja-Pereira et al. 2004; Rossel et al. 2008). As soon as these two species from the *Equus* genus had been domesticated, they were crossbred, producing humanity's first documented attempt at genome manipulation around 5,000 years ago (Allen and Short 1997; Short 1997). Since then, the mule (male donkey X female horse) and the reciprocal cross, the hinny (male horse X female donkey) have been the most common equine hybrids, due to the worldwide success and dissemination of horse and donkey domestication (Allen and Short 1997). The mule and hinny are sterile hybrids (2n=63), because their chromosome imbalance provokes a chromosomal disruption during meiosis (Allen and Short 1997; Short 1997). However, there are documented scientific reports of fertile mules (Rong et al. 1988; Ryder et al. 1985). Due to their hybrid vigor, the mule and hinny have been used worldwide

for carrying loads and people and for tilling the land from the ancient civilizations of Egypt, Mesopotamia, China and the Roman Empire until today; they have, indeed, become essential to human culture and development (Aranguren-Mendez et al. 2002; Chen et al. 2010; Rossel et al. 2008; Short 1975; Short 1997). In addition, due to their vigor and intelligence, mule and hinny are widely used in the management of cattle in large beef cattle ranches in Brazil, being important to the regional economy.

Despite their importance to human civilization, the visual distinction of mules and hinnies is not easy (Figure 1), even for an animal breeding specialist, due to their phenotypic resemblance (Benirschke et al. 1964; Zhao et al. 2005). The distinction between these two hybrids is of pivotal importance for Equid breeders, ranchers and associations, which keep the official pedigree of these animals.

Mammalian mitochondrial DNA (mtDNA) has a rate of nucleotide substitution one order of magnitude higher than nuclear DNA (Brown et al. 1979), and it has been extensively employed in phylogenetic and evolution studies in mammals (Bower et al. 2013; Cothran et al. 2005; Ivankovic et al. 2002; Kakoi et al. 2007; Kim et al. 1999). More specifically, the non coding D-loop region of mtDNA is one of the most frequently employed DNA regions for phylogenetic studies, due to its fast rate of evolution, with a substitution rate five times higher than the remaining mitochondrial DNA (Aquadro and Greenberg 1983; Cann et al. 1984; Walberg and Clayton 1981). Several studies on the phylogeny and evolution of the *Equus* genus using the D-loop region of mtDNA have been documented (Bower et al. 2013; Cothran et al. 2005; Ivankovic et al. 2002; Kakoi et al. 2007; Kim et al. 1999), making the D-loop region a preferred choice for DNA diversity and phylogeny analysis in horses and donkeys. The aim of this work was to develop a fast and easy method to differentiate the maternal origin of mules and hinnies, using D-loop region polymorphisms amplified by Multiplex-PCR.

MATERIAL AND METHODS

The blood samples of the 77 animals analyzed in this study (17 horses, 32 donkeys, 18 mules and 10 hinnies) were provided by Brazilian Ranchers and the Brazilian Platform of Genetic Resources (Table 1). Animals were handled according to Brazilian legislation, and the experiment was approved by the ethics committee of the Federal University of Uberlândia, Brazil (protocol n° 160/13). The hybrids were primarily scored as mule or hinny according to their breeding records, provided by their owners. The blood samples were sent to the laboratory as blind samples, so the specialist who did the PCR genotyping was unaware of the animal's identity or breed. Genomic DNA was extracted from whole blood using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Fifty nanograms of genomic DNA was used in 20µL of PCR mix (1 U Taq DNA polymerase, 800 µM dNTP mix, 1.25mM MgCl₂, 7.5pmol of each primer), and using the following conditions: 95°C for 3 min, (95°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 1min) x 36, and 72°C for 10 min. The Forward primer was designed to hybridize with a conservative region of mtDNA D-loop of horse and donkey (5'-CTGGCATCTGGTTCTTTCTT-3'). The Reverse primers were designed to hybridize a polymorphic region of D-loop in horse (5'-GGTTTGGCAAGATTGTGTG-3'), or donkey (5'-GTGTGTGAGAGTTAGGCTTC-3'), amplifying two specific fragments of 620 and 689 bp, respectively, in a Multiplex-PCR reaction. The position of each primer in the hypervariable D-loop region of mtDNA sequences are highlighted (supplementary material). The fragments were resolved in a 1.8% agarose gel. One sample of the mule D-loop amplicon (620 bp), and one of hinny amplicon (689 bp) were purified from the agarose gel with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and sequenced by Sanger method in a DNA sequencing facility (Helixxa Serviços Genômicos, Brazil). These sequences were submitted to GenBank (accession numbers KU881747 and

KU881746, respectively). The resulting sequences were aligned against GenBank reference sequences (*E.caballus* - NC_001640.1; *E.asinus*- X97337.1) using the internet based Clustal Omega software (EMBL-EBI, UK).

RESULTS AND DISCUSSION

All PCR-genotyped animals (donkeys, horses, hinnies, and mules) presented the D-loop amplicons with expected size, in 100% accordance with their breeding records (Figure 2). To confirm the PCR genotyping and amplicon identity, one amplicon from a hinny and one from a mule were sent for DNA sequencing. The alignment of the amplicons' sequences against the Genbank references confirmed their identity (Figure 3, A and B), as well as indicating the hyper-variable 3' region of D-loop, which confers specificity for this Multiplex-PCR genotyping (Figure 3, C and D).

A methodology for genotyping horse, donkey and their hybrids was presented in a previous study (Zhao et al. 2005). In Dr. Zhao's work, two Dpn II restriction sites were primer-induced in polymorphic regions of the nuclear gene *Protamine P1*, and mitochondrial *Cytochrome b*; both contain natural polymorphic Dpn II sites only in horse sequences. In this PCR-RFLP strategy, the horse's *Protamine P1* and *Cytochrome b* amplicons are cut twice by Dpn II, and the donkey's amplicons are cut only once in each gene. The final visible pattern of DNA bands (2 for horse and donkey, and 3 for their hybrids) permits the genotyping of the animals. On the other hand, our genotyping process is based on only one PCR reaction, using one target mitochondrial DNA (D-loop) sequence, with three primers and no further restriction enzyme digestion, making our process faster and cheaper. Our method only permits us to identify the maternal origin of the hybrids, differentiating mules from hinnies. However, the phenotypic (visual) differentiation of mules from horses and hinnies from donkeys is not a problem for breeders and Ranchers (Benirschke et al. 1964), according to our field experience. Therefore, the pivotal problem is to distinguish mules from hinnies, in which the method presented in this work is very effective.

We believe that the new methodology presented in this work will permit a fast, cheap, and easy way to differentiate hinnies and mules with accuracy. This methodology can help breeders, ranchers, horse associations, animal science professionals and researchers to manage their equid herds and pedigree registers with more confidence and precision.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank breeders, ranchers and The Brazilian Platform of Genetic Resources for providing the biological samples used in this study. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil and Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brazil.

REFERENCES

- Allen WR, Short RV (1997) Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes *J Hered* 88:384-392
- Aquadro CF, Greenberg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals *Genetics* 103:287-312
- Aranguren-Mendez J, Gomez M, Jordana J (2002) Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers *Heredity (Edinb)* 89:207-211 doi:10.1038/sj.hdy.6800117
- Beja-Pereira A et al. (2004) African origins of the domestic donkey *Science* 304:1781 doi:10.1126/science.1096008
- Benirschke K, Low RJ, Sullivan MM, Carter RM (1964) Chromosome Study of an Alleged Fertile Mare Mule *J Hered* 55:31-38
- Bower MA et al. (2013) Thoroughbred racehorse mitochondrial DNA demonstrates closer than expected links between maternal genetic history and pedigree records *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 130:227-235 doi:10.1111/j.1439-0388.2012.01018.x
- Brown WM, George M, Jr., Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1967-1971
- Cann RL, Brown WM, Wilson AC (1984) Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA *Genetics* 106:479-499
- Chen JX, Sun YJ, Manglai D, Min LJ, Pan QJ (2010) Maternal genetic diversity and population structure of four Chinese donkey breeds *Livest Sci* 131:272-280 doi:10.1016/j.livsci.2010.04.012
- Cothran EG, Juras R, Macijauskiene V (2005) Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among 5 maternal lines of the Zemaitukai horse breed *Genet Mol Biol* 28:677-681
- Ivankovic A, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Dovc P (2002) Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region *Anim Genet* 33:169-177
- Jansen T et al. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10905-10910 doi:10.1073/pnas.152330099
- Kakoi H, Tozaki T, Gawahara H (2007) Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations *Biochem Genet* 45:375-395 doi:10.1007/s10528-007-9083-0
- Kim KI, Yang YH, Lee SS, Park C, Ma R, Bouzat JL, Lewin HA (1999) Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism *Anim Genet* 30:102-108
- Rong R, Chandley AC, Song J, McBeath S, Tan PP, Bai Q, Speed RM (1988) A fertile mule and hinny in China *Cytogenet Cell Genet* 47:134-139
- Rossel S, Marshall F, Peters J, Pilgram T, Adams MD, O'Connor D (2008) Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3715-3720 doi:10.1073/pnas.0709692105
- Ryder OA, Chemnick LG, Bowling AT, Benirschke K (1985) Male Mule Foal Qualifies as the Offspring of a Female Mule and Jack Donkey *Journal of Heredity* 76:379-381
- Short RV (1975) The contribution of the mule to scientific thought *J Reprod Fertil Suppl*:359-364
- Short RV (1997) An introduction to mammalian interspecific hybrids *J Hered* 88:355-357
- Walberg MW, Clayton DA (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA *Nucleic Acids Res* 9:5411-5421
- Zhao CJ, Han GC, Qin YH, Wu C (2005) Differentiating among horse (*Equus caballus*), donkey (*Equus asinus*) and their hybrids with combined analysis of nuclear and mitochondrial gene polymorphism *J Anim Breed Genet* 122:285-288 doi:DOI 10.1111/j.1439-0388.2005.00535.x

Table 1. The origin and breed of the animals used in this study.

Species	Total Number	Number	Breed	Origin
Horse	17	1	Arabian ²	Federal District, Brazil
		2	Baixadeiro ^{1,2}	
		2	Breton ²	
		2	Campeiro ^{1,2}	
		2	Campolina ^{1,2}	
		2	Crioulo ^{1,2}	
		2	Lavradeiro ^{1,2}	
		1	Mangalarga Marchador ^{1,2}	
		2	Marajoara ^{1,2}	
		1	Pantaneiro ^{1,2}	
Donkey	32	19	Pêga ^{1,2}	Minas Gerais state and Federal District, Brazil
		9	Brasileiro ^{1,2}	Federal District, Brazil
		4	Nordestino ^{1,2}	Northeast and Federal District, Brazil
Mule	18	18	Pêga donkey x Mangalarga Marchador horse	Minas Gerais state, Brazil
Hinny	10	10	Mangalarga Marchador horse x Pêga donkey	Goiás and Minas Gerais states, Brazil
Total	77			

¹Brazilian locally adapted breeds²Samples provided by the Brazilian Platform of Genetic Resources - Brazilian Agricultural Research Corporation - National Centre for Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil**Figure 1.** Pictures of representative equids: (A) donkey (Pêga); (B) horse (Mangalarga Marchador); (C) mule; (D) hinny.

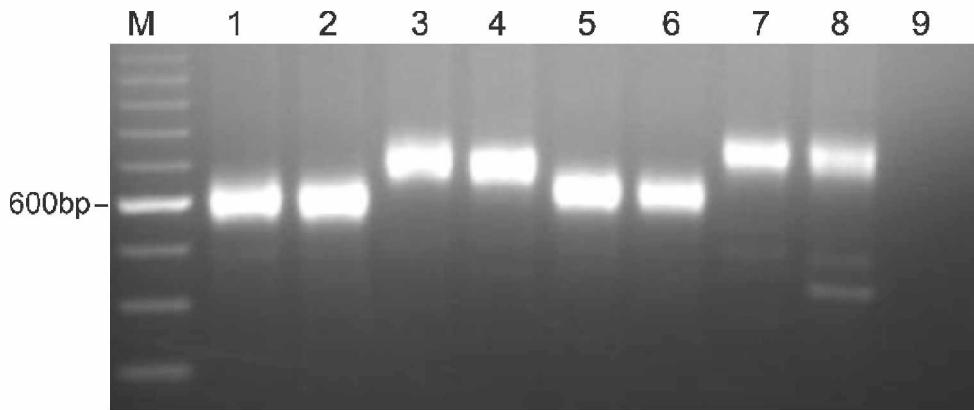


Figure 2. Agarose electrophoresis of Multiplex-PCR amplicons from eight representative animals. (M) Molecular marker 100bp ladder (Invitrogen). mtDNA D-loop amplicons: (1, 2) horse; (3,4) donkey; (5,6) mule; (7,8) hinny; (9) PCR negative control.

A		B	
Donkey	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT	Horse	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT
Hinny	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT	Mule	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT
*****		*****	
Donkey	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG	Horse	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG
Hinny	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG	Mule	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG
*****		*****	
Donkey	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC	Horse	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC
Hinny	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC	Mule	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC
*****		*****	
Donkey	AGCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC	Horse	-AGCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC
Hinny	AGCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC	Mule	CAACAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC
*****		*****	
Donkey	ACACCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGC	Horse	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
Hinny	ACACCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGC	Mule	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
*****		*****	
Donkey	GCACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCAC	Horse	CCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
Hinny	GCACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCAC	Mule	CCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
*****		*****	
Donkey	ACACCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGC	Horse	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
Hinny	ACACCCATGCGCGACACACCCACACCCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGC	Mule	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
*****		*****	
C		D	
Horse	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT	Donkey	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT
Hinny	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT	Mule	AAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCAGACATAAAGTGTGTT
*****		*****	
Horse	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG	Donkey	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG
Hinny	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG	Mule	TCATGCATTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGCGCGTCAAAG
*****		*****	
Horse	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC	Donkey	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC
Hinny	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC	Mule	GCCCGACGCGAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATC
*****		*****	
Horse	AGCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC	Donkey	A-GCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC
Hinny	AGCAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC	Mule	CAACAACCATTAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCAC
*****		*****	
Horse	GCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC	Donkey	CACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACCCATGCGC
Hinny	GCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC	Mule	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
*****		*****	
Horse	CTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGT	Donkey	GCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCAC
Hinny	GCACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCAC	Mule	CCGTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGT
*****		*****	
Horse	GCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC	Donkey	CACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGCGACACACCCACACACCCATGCGC
Hinny	GCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC	Mule	TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
*****		*****	

Figure 3. Alignment of mtDNA D-Loop sequences. (A) donkey x hinny; (B) horse x mule; (C) horse x hinny; (D) donkey x mule. GenBank references: donkey (X97337.1), and horse (NC_001640.1). Sequences of hinny and mule, this study (accession numbers KU881746 and KU881747, respectively). The asterisk in the figure represents conserved nucleotide identity between sequences.

CAPÍTULO 3

Variações fisiológicas, influência da idade e sexo no perfil bioquímico sérico de bardotos¹

João Batista F. Santos^{2*}, Mauricio M. Franco ³, Robson C. Antunes⁴, Ednaldo C. Guimarães⁵, Antonio V. Mundim⁴

Abstract-Santos J. B. F., Franco M. M., Antunes R. C., Guimarães E. C., Mundim A. V. 2016. **[Fisiologic variations, influence of age and sex in serum biochemical profile in hinny]** For evaluation of serum biochemical parameters of hinnies (*Equus caballus x Equus asinus*), for the two age groups and sex, blood samples from 15 animals were analyzed. It is used eight males aged 14-84 months and seven females aged 6-84 months in farms in the states of Minas Gerais, São Paulo and Goiás. The animals were divided by age in Group 1 (≤ 30 months) and group 2 (> 30 months), and sex in group 1 (males) and group 2 (females). For all animals were realized assay of total protein, albumin, globulin, the A: G ratio, cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, urea, calcium, phosphorus, Ca:P ratio, magnesium, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT) and creatine kinase (CK). For all the analyzed elements according to both age groups, only the ratio A:G, calcium and Ca:P ratio, were different, and these higher values for Group 1. The results of serum biochemical elements of this study, the by sex showed similar values for males and females. For it is noted that results were age effects for the analyzed elements. From what we are aware, this is the second study to characterize the serum biochemical profile hinnies providing specific biochemical parameters for this type of animal in clinical equine.

INDEX TERMS: (*Equus caballus x Equus asinus*), hinny, serum biochemical

¹

²Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, CEP: 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência: joaos@ufu.br

³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal.

⁴Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, CEP: 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁵Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia

Resumo– Para avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos de bardotos (*Equus caballus* x *Equus asinus*), referentes a duas faixas etárias e ao sexo, foram analisadas amostras sanguíneas de 15 animais. Sendo utilizados oito machos com idades de 14 a 84 meses e sete fêmeas com idades de 6 a 84 meses, de criatórios dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Os animais foram distribuídos por idade em Grupo 1 (≤ 30 meses) e Grupo 2 (> 30 meses), e pelo sexo em Grupo 1 (machos) e Grupo 2 (fêmeas). Para todos os animais foram realizadas as análises de proteínas totais, albumina, globulinas, relação A:G, colesterol, triglicérides, ácido úrico, creatinina, uréia, cálcio, fósforo, relação Ca:P, magnésio, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK). Para todos os elementos analisados de acordo com as duas faixas etárias, apenas a relação A:G, cálcio e relação Ca:P foram estatisticamente diferentes, sendo esses valores superiores para o Grupo 1. Os resultados dos elementos bioquímicos séricos do presente estudo, de acordo com o sexo, mostraram valores semelhantes para machos e fêmeas. Pelos resultados nota-se que houve efeito de idade para os elementos analisados. Pelo que é do nosso conhecimento, este é o segundo estudo que caracteriza o perfil bioquímico sérico de bardotos, fornecendo parâmetros bioquímicos específicos para esse tipo de animal na clínica de equídeos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Equus caballus* x *Equus asinus*, bardoto, bioquímica sérica.

INTRODUÇÃO

O conhecimento dos valores bioquímicos séricos é importante, pois auxiliam no diagnóstico e tratamento das doenças, permitindo o acompanhamento e conhecimento dos vários distúrbios que afetam a saúde dos animais (ROSE, 1992; GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002; BALLARIN et al., 2005). Variações hormonais, bioquímicas e hematológicas influenciam o desempenho de animais, nas mais variadas situações, principalmente em competições (MASINI et al., 2000). Devido a intensa atividade física a que são submetidos os equídeos, principalmente aqueles destinados aos esportes, sela ou tração, estes apresentam muitos sinais de exaustão, lesões musculares e também do aparelho cardiorrespiratório. Em vista disso é necessária a utilização de marcadores clínicos laboratoriais para o correto diagnóstico e tratamento dessas lesões (OVERGAARD et al., 2004., WANDERLEY et al., 2015). Os bardotos são utilizados para os mesmos tipos de trabalho ou emprego que os muares e mesmo sendo conhecidos há muito tempo, o bardoto é pouco utilizado em relação aos muares. Os bardotos pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Mammalia*, ordem *Perissodactyla*, família *Equidae*, gênero *Equus*, espécie *Equus caballus* x *Equus asinus* (híbrido) (KOPP et al., 1988). A literatura é escassa, pouco se conhece sobre os valores bioquímicos séricos em muares, e até o momento, apenas o trabalho de McLean et al. (2016) que avaliaram 11 elementos bioquímicos séricos de bardotos. Com relação a equinos, há muitos estudos em se tratando de perfil bioquímico sérico para animais de diferentes países, regiões, tipos de manejo, trabalho, sexo, raça, atividades diversas, condições ambientais (XIMENES et al., 1984; SARTOR et al., 1985; NOLETO et al., 2016). A escassez de estudos na literatura sobre muares e bardotos, principalmente em relação aos perfis bioquímicos séricos, levam muitas vezes a utilização de valores bioquímicos de outras espécies, como a asinina e a equina, que não se sabe se realmente podem ser aplicados para muares ou bardotos (McLEAN et al., 2016).

Neste contexto, devido às poucas informações disponíveis sobre a bioquímica sérica desses animais, objetivou-se nesse trabalho avaliar a influência da idade e do sexo no perfil bioquímico sérico de bardotos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras sanguíneas de 15 bardotos (*Equus caballus* x *Equus asinus*) sendo 8 machos com idade variando entre 14 a 84 meses e 7 fêmeas entre 6 a 84 meses de idade, procedentes de 8 criatórios nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. As coletas de sangue foram realizadas no período de março de 2013 a janeiro de 2015. Todos os animais foram criados em condições semi-extensivas, em pastagens de capim estrela (*Cynodon*) e grama cuiabana (*Paspalum*). Todos os machos foram castrados com idade inferior a dois meses.

Os animais foram avaliados clinicamente e apresentaram boas condições de saúde e escore corporal satisfatório. As coletas das amostras de sangue foram realizadas no mesmo ambiente onde se encontravam os animais, com contenção usando apenas cabresto, no período da tarde, por venipunção da jugular externa, com assepsia do local com algodão embebido em álcool iodado a 2% e o local seco com papel toalha descartável. Os animais foram distribuídos por idade em: Grupo 1 (≤ 30 meses; n= 9) e grupo 2 (> 30 meses; n= 6); e por sexo em grupo 1

machos (n=8) e grupo 2 fêmeas (n=7). Foram utilizadas agulhas descartáveis para coleta de sangue à vácuo 38x1,25 mm (VACUETTE®) acopladas ao adaptador vacunteiner 0,70x25 mm (VACUETTE®), para os animais de pele mais espessa. Para os animais de pele mais fina e menos musculosos usou-se agulhas de calibre 25 x 0,8 (VACUPLAST®). De cada animal foram coletados 8mL de sangue em tubos estéreis descartáveis (VACUETTE®), com ativador de coágulo. As amostras, após a coleta, foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, até o momento da centrifugação, realizada 2 horas após as coletas. As amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos a 720g, e o soro obtido foi separado em alíquotas em microtubos criogênicos para plasma de 1,8 mL (GETC 1.85®), sendo em seguida congelados a -20°C e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As análises bioquímicas séricas foram realizadas no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da UFU, em analisador automático multicanal (CHEMWELL®- Awareness Technology Inc., Palm City, USA), utilizando kits comerciais da Labtest Diagnóstica®. O analisador foi previamente calibrado com calibra H e aferido com soro de controle universal qualitol H, produzidos pela Labtest Diagnóstica®. Os parâmetros bioquímicos séricos avaliados para todos os animais estão descritos na Quadro1 abaixo.

Quadro 1: Parâmetros bioquímicos séricos avaliados com as respectivas metodologias utilizadas para análise clínica.

Parâmetros	Metodologia
Proteínas totais	Biureto
Albumina	Verde bromocresol
Globulinas	Cálculo: proteína total - albumina
Relação albumina:globulina (A:G)	Cálculo: albumina/globulina
Colesterol	Enzimático-Trinder
Triglicérides	Enzimático-Trinder
Ácido úrico	Enzimático-Trinder
Creatinina	Jaffé-modificado
Ureia	Cinético enzimático-UV
Fósforo (P)	Cinético-UV
Cálcio (Ca)	Cresolfitaleína complexona - CPC
Relação cálcio:fósforo (Ca:P)	Cálculo: cálcio/fósforo
Magnésio (Mg)	Magon sulfonado
Alanina aminotransferase (ALT)	Cinético UV-IFCC
Aspartato aminotransferase (AST)	Cinético UV-IFCC
Fosfatase alcalina (FAL)	Cinético IFCC
Gama glutamiltransferase (GGT)	Szasz modificado
Creatina quinase (CK)	Cinético UV-IFCC

Na avaliação estatística foi utilizado o Teste t Student para comparar as médias entre as faixas etárias e os sexos

Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, com o protocolo registro nº 160/13.

RESULTADOS

Os valores médios e desvios padrão para os elementos bioquímicos séricos de bardotos, de acordo com as faixas etárias e sexo, estão apresentados nos quadros 2 e 3.

Quadro 2. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de bardotos de acordo com as faixas etárias.

Elementos	Grupo 1 (\leq 30meses) (n = 9)	Grupo 2 (>30meses) (n = 6)	Geral (G1 e G2) (n = 15)
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Proteínas totais (g/dL)	8,10 \pm 0,76a	8,71 \pm 1,52a	8,34 \pm 1,14
Albumina (g/dL)	3,25 \pm 0,60a	2,68 \pm 0,32a	3,02 \pm 0,57
Globulinas (g/dL)	4,85 \pm 0,99a	6,04 \pm 1,45a	5,32 \pm 1,29
Relação A:G	0,71 \pm 0,25a	0,46 \pm 0,09b	0,61 \pm 0,24
Colesterol (mg/dL)	59,12 \pm 14,52a	103,25 \pm 74,43a	76,77 \pm 50,99
Triglicérides (mg/dL)	50,03 \pm 26,17a	70,72 \pm 85,81a	58,31 \pm 55,96
Ácido úrico (mg/dL)	1,38 \pm 0,30a	1,80 \pm 0,57a	1,59 \pm 0,45
Creatinina(mg/dL)	1,15 \pm 0,23a	1,03 \pm 0,23a	1,10 \pm 0,23
Ureia (mg/dL)	38,25 \pm 27,70a	19,58 \pm 8,98a	30,79 \pm 23,60
Cálcio (mg/dL)	12,89 \pm 0,77a	11,47 \pm 1,15b	12,32 \pm 1,15
Fósforo (mg/dL)	3,74 \pm 1,03a	4,07 \pm 0,57a	3,87 \pm 0,87
Relação Ca:P	3,64 \pm 0,81 a	2,86 \pm 0,44 b	3,33 \pm 0,78
Magnésio (mg/dL)	2,61 \pm 0,20a	2,81 \pm 0,32a	2,70 \pm 0,27
ALT (U/L)	20,33 \pm 16,61a	38,33 \pm 39,62a	27,57 \pm 28,31
AST (U/L)	209,11 \pm 82,43a	304,17 \pm 91,90a	247,13 \pm 96,80
FAL (U/L)	257,35 \pm 69,51a	250,32 \pm 106,57a	254,51 \pm 82,65
GGT (U/L)	30,74 \pm 8,82 a	22,57 \pm 7,61 a	32,13 \pm 14,21
CK (U/L)	217,44 \pm 139,66a	373,08 \pm 211,29a	279,70 \pm 182,53

DP= desvio padrão; A:G=Relação albumina: globulina; Ca:P= Relação cálcio: fósforo; ALT=Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase; FAL= Fosfatase alcalina; GGT= Gama glutamil transferase; CK= Creatina quinase.

(a,b) Médias na mesma linha seguida de letras diferentes, indicam diferença significativa ($p < 0,05$), entre as faixas etárias, de acordo com o teste t Student.

Comparados os valores dos elementos bioquímicos séricos de bardotos de acordo com as faixas etárias (Quadro 2), nota-se que os valores da relação A:G, Ca e relação Ca:P foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) nos animais do Grupo 1 (\leq 30 meses de idade) comparados aos do Grupo 2 (>30 meses de idade). Os demais elementos foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) para os dois grupos etários estudados. No quadro 3 encontram-se os valores dos elementos bioquímicos séricos de bardotos de acordo com o sexo.

Quadro 3. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de bardotos de acordo com o sexo.

Elementos	Machos(n=8)	Fêmeas (n=7)
	Média± DP	Média ± DP
Proteínas totais (g/dL)	8,68 ± 1,21a	7,96 ± 1,00a
Albumina (g/dL)	2,98 ± 0,43a	3,06± 0,74a
Globulinas (g/dL)	5,70 ± 1,38a	4,90 ± 1,14a
Relação A:G	0,55 ± 0,17a	0,67 ± 0,30a
Colesterol (mg/dL)	54,70 ± 22,82a	66,29 ± 15,61a
Triglicérides (mg/dL)	37,61 ± 19,52a	53,39 ± 28,68a
Creatinina (mg/dL)	1,09 ± 0,26a	1,12± 0,21a
Ureia (mg/dL)	34,45 ± 26,68a	28,89 ± 21,47a
Ácido úrico (mg/dL)	1,66 ± 0,53a	1,49 ± 0,32a
Fósforo (mg/dL)	3,63 ± 0,74a	4,14 ± 0,98a
Cálcio (mg/dL)	12,26 ± 1,05a	12,38 ± 1,35a
Relação Ca:P	3,50 ± 0,80a	3,12 ± 0,75a
Magnésio (mg/dL)	2,71 ± 0,22a	2,66 ± 0,32a
ALT (U/L)	39,37 ± 34,45a	14,00 ± 9,24a
AST (U/L)	236,62 ± 116,92a	259,14 ± 72,50a
FAL (U/L)	277,57 ± 93,77a	228,21 ± 64,51a
GGT (U/L)	27,37 ± 6,74a	37,57 ± 18,80a
CK (U/L)	329,90 ± 217,67a	222,33 ± 123,53a

DP= desvio padrão

Os resultados do quadro 3 mostram que os valores de todos os elementos bioquímicos séricos avaliados, foram semelhantes para machos e fêmeas ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

As informações referentes ao perfil bioquímico sérico específico de muare são escassas na literatura, e de bardotos, apenas o estudo de McLean et al. (2016). Portanto, no presente artigo confrontou-se os resultados com estudos anteriores, realizados com jumentos (*Equus asinus*) e muare (*Equus asinus* x *Equus caballus*).

Os valores médios de triglicérides, creatinina, AST, GGT e CK dos bardotos do presente estudo mantiveram próximo ou dentro dos limites fisiológicos encontrados por McLean et al. (2016), enquanto que fósforo e magnésio foram superiores aos encontrados pelos referidos pesquisadores. Atribui-se essas diferenças às variações fisiológicas às diferentes faixas etárias, manejo, fatores ambientais e metodologias utilizadas pelos pesquisadores. Quando confrontados os valores dos elementos bioquímicos séricos dos bardotos por faixa etária (quadro 2) com os valores obtidos para jumentos (Zinkl et al., 1990; Girardi et al., 2013; Garba et al., 2015; Laus et al., 2015 e Burden et al., 2016) e muare (Rabelo et al., 2004; Simenew et al., 2011 e Dias, 2014), observa-se que os valores médios da maioria dos

elementos analisados mantiveram próximo e/ou dentro de limites relatados nestes estudos, embora alguns elementos apresentam valores ligeiramente discrepantes. O número de animais amostrados, as condições geográficas, manejo, alimentação, estação do ano, condições fisiológicas dos animais, metodologias e equipamentos utilizados nas análises podem ter contribuído para as poucas diferenças observadas entre os valores dos parâmetros bioquímicos dos animais deste estudo e os da literatura confrontados (Caldin et al., 2005; McLean et al., 2016).

A semelhança da maioria dos valores dos elementos bioquímicos séricos dos bardotos jovens comparados com os adultos (quadro 2) condiz com os resultados do estudo de French e Patrick (1995), que avaliaram amostras de sangue de 4000 jumentos e observaram que os valores dos constituintes bioquímicos avaliados não foram influenciados pela idade. Concordam em parte com Dias (2014), que avaliando o perfil bioquímico sérico de 248 muas de 40 propriedades de nove localidades do estado de São Paulo, observou valores semelhantes ($p>0,05$) para albumina, creatinina, triglicérides, colesterol, magnésio, GGT e CK nas três faixas etárias analisadas. Discordam dos resultados encontrados pelo pesquisador acima referido de diferença significativa ($p<0,05$) nas concentrações séricas de proteínas totais, ureia, fósforo, AST e FAL entre as faixas etárias estudadas. Stanišić et al. (2015), avaliando o perfil bioquímico de jumentos jovens com menos de três anos de idade e adultos com mais de três anos da raça Balkan, observaram valores semelhantes para todos os parâmetros avaliados, exceto para fosfatase alcalina, a qual foi significativamente superior nos jumentos com idade inferior a três anos. Valores semelhantes para as concentrações de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, colesterol, triglicérides, ALT, GGT e CK em jumentos com idade variando de seis meses a 24 anos foram observados no estudo de Laus et al. (2015), com redução significativa nas concentrações da AST e FAL com o evoluir da idade. Mais de uma variável bioquímica sérica diferindo entre populações de jumentos jovens e adultos foi observado em estudos anteriores (Jordana et al., 1998; Mori et al., 2003; Caldin et al. 2005; Pitel et al., 2006; Dias, 2014; Girardi et al., 2013).

O maior valor observado para a relação A:G nos bardotos com até 30 meses de idade é decorrente de, embora não estatisticamente significativa ($p>0,05$), da maior concentração de albumina e menor de globulinas neste grupo de animais comparado ao outro grupo.

O encontro de concentrações séricas de cálcio superior nos bardotos com até 30 meses de idade, contradiz os achados de estudos anteriores que não detectaram diferença significativa para este mineral entre as diferentes faixas etárias de jumentos e muas (Caldin et al., 2005; Sgorbini et al., 2013; Dias, 2014) e também o encontro de concentrações de cálcio inferiores nos jumentos da raça Pêga com até um ano de idade, estudados por Girardi et al. (2013). A concentração de cálcio sérico maior nos bardotos com até 30 meses de idade é provavelmente, conforme afirmam Herosimczyk et al. (2011), resultado dos altos requerimentos pelos bardotos em crescimento, uma vez que o cálcio é responsável pela estimulação do crescimento de osteoblastos e, assim todo o desenvolvimento do esqueleto. O período de crescimento ósseo nos equídeos é intenso nas fases neonatal e juvenil.

O maior valor da relação Ca:P nos bardotos com até 30 meses de idade é justificado pelo valor do cálcio sérico estatisticamente maior e a menor concentração de fósforo sérico neste grupo de animais, embora não estatisticamente significativa.

Com relação ao sexo, a semelhança dos valores dos elementos bioquímicos séricos dos bardotos machos e fêmeas do presente estudo condiz com os achados de estudos anteriores que também observaram valores semelhantes para bardotos machos e fêmeas (McLean et al., 2016) e jumentos machos e fêmeas (Zinkl et al., 1990; French, Patrick, 1995; Jordana et al., 1998; Laus et al., 2015). Corrobora com Al-Busadah e Homeida (2005) que relataram ser a atividade enzimática, perfil metabólico e concentrações séricas de minerais semelhantes para jumentos machos e fêmeas. Estudando muare no Brasil, Dias (2014) encontrou valores semelhantes para machos e fêmeas nas concentrações séricas de albumina, creatinina, triglicérides, magnésio, ferro, AST, GGT e CK. Ao contrário, Pitel et al. (2006) afirmaram ser os valores de creatinina superiores nos machos, e Etana et al. (2011) encontraram valores do metabólito superior nas fêmeas. A semelhança dos valores dos elementos bioquímicos séricos para bardotos machos e fêmeas neste estudo é atribuída às semelhantes condições de criação, idades e estado reprodutivo dos animais. Esses híbridos quase totalmente estéreis, tanto machos quanto fêmeas, não têm uma demanda relacionada a eventos reprodutivos, na qual a fêmea não fica gestante, consequentemente não produz leite, não amamenta, não tem o desgaste físico e estresse no cuidado com a cria. Sabemos que nas espécies férteis, esses períodos têm grande influência nos componentes bioquímicos séricos, com flutuações nas concentrações desses elementos.

Como foi encontrado na literatura apenas um trabalho sobre o perfil bioquímico de bardotos, em especial com avaliação da influência da idade e sexo, este trabalho torna-se um dos pioneiros em disponibilizar dados que possam auxiliar na avaliação clínica e processos de adaptação destes animais e fornecer subsídios para futuros estudos sobre o tema.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados e nas condições que o presente estudo foi realizado, conclui-se existir influência da idade em alguns elementos bioquímicos séricos de bardotos, não sendo verificada influência do sexo. Este trabalho pode contribuir para novos estudos, relacionados à composição bioquímica sérica desses híbridos, por ser um dos pioneiros em disponibilizar dados para servir como valores de referência na clínica de equídeos.

REFERÊNCIAS

- Al-Busadah K. A. & Homeida A.M. 2005. Some physical variables, biochemical and haematological parameters in Hassawi ass. Scientific Journal of King Faisal University, 6 (1): 145-152.
- Balarin M.R.S., Lopes R.S. & Kohayagawa A. 2005. A avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamilttransferase e lactato desidrogenase em equinos Puro Sangue Inglês submetidos a exercícios de diferentes intensidades. Semina: Ciências Agrárias, 26: 211-218.
- Burden F.A., Hazell-Smith E., Mulugeta G., Patrick V., Trawford R. & Brooks Brownlie H.W. 2016. Reference intervals for biochemical and haematological parameters in mature domestic donkey (*Equus asinus*) in the UK. Equine vet. Educ., 28 (3): 134-139.
- Caldin M., Furlanello T., Solano-Galego L., De Lorenzi D., Carli E., Tasca S. & Lubas G. 2005. Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). Comp Clin Pathol, 14 (1): 5-12.
- Dias D. C. 2014. Hematologia e bioquímica sérica em muare. (Dissertação Mestrado). Universidade de São Paulo. 102p.
- Etana K.M., Jenbere T.S., Bojia E. & Negussie H. 2011. Determination of reference hematological and serum-biochemical values for working donkey of Ethiopia. Veterinary Research, 4 (3): 90-94.
- French J.M. & Patrick V.H. 1995. Reference values for physiological, haematological and biochemical parameters in domestic donkeys (*Equus asinus*). Equine Vet. Educ., 7 (1): 33-35.
- Garba U.M., Sackey A.K.B., Idris L.A. & Esievo K.A.N. 2015. Baseline vital, haematological and serum biochemical parameters of donkeys. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 7 (3): 94-98.
- Girardi A. M., Marques L. C., Toledo C. Z. P., Barbosa J. C., Maldonado Jr W., Jorge R. L. N., & Nogueira C. A. S. 2013. Biochemical profile of the Pêga donkey (*Equus asinus*) breed: influence of age and sex. Comp Clin Pathol., 23 (4): 941-947.
- González F.H.D. & Scheffer, J. F. S. 2002. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais. In: 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Anais, p. 5-17.
- Herosimczyk A., Lepczyński A., Dratwa-Chalupnik A., Kurpińska A., Klonowska A. & Syrzyczak W. F. 2011. Age-related changes of selected blood biochemical indicators in dairy calves during their first week of life. Folia Biologica (Kraków), 59 (1): 25-30.
- Jordana J., Folch P. & Cuenca R. 1998. Clinical biochemical parameters of the endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. Res Vet Sci, 64 (1): 7-10.
- Kopp E., Mayr B., & Schleger W. 1988. Ribosomal RNA expression in a mammalian hybrid, the hinny. Chromosoma, 96: 434-436.
- Laus F., Spaterna A., Faillace V., Paggi E., Serri E., Vullo C., Cerquetella M. & Tesei B. 2015. Reference values for hematological and biochemical parameters of mixed breed donkey (*Equus asinus*), Wulfenia Journal, 22 (1): 294-304.

- Masini A.P., Baragli P., Tedeschi D., Lubas G., Martelli F., Gavazza A. & Sighieri C. 2000. Behaviour of mean erythrocyte volume during submaximal treadmill exercise in horse. *Comp. Haematol.* 10: 38-42.
- McLean A. K., Wang W., Navas-Gonzalez F. J., Rodrigues J. B. 2016. Reference intervals for hematological and blood biochemistry reference values in healthy mules and hinnies. *Comp Clin Pathol.* DOI 10.1007/s00580-016-2276-3.
- Mori E.; Fernandes W R.; Mirandola R. M. S.; Kubo G.; Ferreira R. R.; Oliveira J. V.; Gacek F. Reference values on serum biochemical parameters of brazilian donkey (*Equus asinus*) breed. *Journal of Equine Veterinary Science.* V. 23, n. 8, p. 358-364.
- Noieto P. G.; Santos J. B. F.; Rocha F. M.; Fasano P. E.; Guimarães E. G. & Mundim A. V. 2016. Effect of a 130-km Endurance Ride on the Serum Biochemical Profile of Mangalarga Marchador Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 39: 7-11.
- Overgaard K., Fredsted A., Hyldal A., Ingemann-Hansen T., Gissel H. & Clausen T. 2004. Effects of running distance and training on Ca²⁺ content and damage in human muscle. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 36: 821-829
- Pitel P., Moulin M., Valette J.P., Dumontier S., Petit L., Fortier G. & Courouc -Malbanc A. 2006. Approche des valeurs h matologiques et biochimiques chez deux races asines. *Pratique V t rinaire  quine* , 38 (149): 19- 25.
- Rabelo S. S. A., Mota R. A., Nascimento Sobrinho E. S., Cunha A.P., Silva Neto J. B., Teixeira M. N., Soares P. C., Carneiro A. S., Vasconcelos A. T. & Silva F. J. 2004. Aspectos hematológicos e bioquímicos em muarees naturalmente infectados pela *Bulkholderia mallei*. *Ciênc.vet. tr p.* 7 (2 e 3): 98-105.
- Rose R.J. 1992. Current therapy in equine medicine. Saunders: Philadelphia, 857p
- Sartor F. I.; Jacobson R. G. S.; Kohayagawa M. A.; Machado M. A. & Curi O. S. 1985. Determinações bioquímicas de fosfatase alcalina, aspartato-aminotransferase, alanino aminotransferase, proteínas totais, albumina e bilirrubina total e direta no soro de eqüinos da ra a Quarto de Milha. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 37: 229-239.
- Simenew K., Gezahegne M., Getachew M., Wondyefraw M., Alemayehu L. & Eyob I. 2011. Reference values of clinically important physiological, hematological and serum biochemical parameters of apparently healthy working equids of Ethiopia. *Global Veterinaria*, 7 (1): 01-06.
- Sgorbini M., Bonelli F., Rota A., Baragli P., Marchetti V. & Corazza M. 2013. Hematology and clinical chemistry in: Amiata donkey foals from birth to 2 months of age. *J. Equine Vet. Sci.*, 33: 35-39.
- Stanisic L., Dimitrijevic V., Simeunovic P., Lakic N., Radovic I., Ivankovic A., Stevanovic J. & Stanimirovic Z. 2015. Morphological, biochemical and hematological characterization of endangered Balkan donkey breed. *Acta Veterinaria*, 65: 125-136.
- Wanderley E.K, Bem B.S.C., Melo S.K.M., Gonzalez J.C., Manso H.E.C.C.C., Manso Filho H.C. Hematological and biochemical changes in Mangalarga Marchador horses after a four-beat gait challenge in three different distances. *J Equine Vet Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.009>.
- Ximenes L. A.; Pintori G.; Coda S.; Cubeddu G. M. & Puddu P. 1984. Idagine su costanti ematochimiche di equine anglo-arabo-sarde. *La Clinica Veterinária*, 107: 49-51.
- Zinkl J. G., Mae D., Guzman Merida P., Farver T. B, & Humble J. A. 1990. Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *Am. J. Vet. Res.*, 51 (3): 408-413.

CAPÍTULO 4

Perfil bioquímico sérico de jumentos da raça Pêga no estado de Minas Gerais¹

João Batista F. Santos^{2*}, Mauricio M. Franco³, Robson C. Antunes⁴, Ednaldo C. Guimarães⁵, Antonio V. Mundim⁴

Abstract - Santos J. B. F., Franco M. M., Antunes R. C., Guimarães E. C., Mundim A. V. 2016. **[Serum biochemical profile of Pêga breed donkeys in the state of Minas Gerais]**

For the evaluation of serum biochemical parameters of donkeys (*Equus asinus*) of Pêga breed, for the different age groups and sex, blood samples of 123 animals were analyzed, 29 males aged 8 days to 10 years and 94 females (15 lactating) 2 days to 12 years, in two farms in the south central region of the state of Minas Gerais. The animals were divided into 5 groups according to age: Group 1 (≤ 6 months); Group 2 (7-12 months); Group 3 (13-48 months); Group 4 (49-72 months) and Group 5 (≥ 73 months). According to the sex, they were divided into two groups, males and females. For all animals were assay of the analysis of total protein, albumin, globulin, the A:G ratio, cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, urea, phosphorus, calcium, Ca:P ratio, magnesium, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT) and creatine kinase (CK). There were no significant differences for the globulins elements, uric acid, urea and relationship A:G between age groups. Group 4 showed the highest values for total protein when compared to animals in groups 1 and 2. In the group 2, animals showed albumin levels lower than groups 3 and 4. Group 1 animals had cholesterol levels higher than those in group 2 and 4, and similar to the other groups. Higher phosphorus serum concentration was observed in group 1. The calcium was significantly lower in group 2. The Ca:P ratio was higher for the group 5. The magnesium values were significantly higher in animals older than 49 months (groups 4 and 5). The value of AST was lower for the group 1. The FAL enzyme was significantly higher in younger animals until to 12 months, followed by gradual decrease with advancing age. The values of GGT are higher in donkeys to six months, followed by decreasing values for subsequent groups. No differences were found between genders for albumin, cholesterol, creatinine, urea, uric acid, Ca:P ratio, magnesium, ALT, AST and alkaline phosphatase. Females had higher values for total proteins, globulin and triglycerides. Males showed higher values for ratio A:G, phosphorus, calcium and CK. The results note that age and sex can influence serum biochemical values of the donkeys of Pêga breed.

INDEX TERMS: Donkey, (*Equus asinus*), Pêga breed, serum biochemical.

¹

² Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, CEP: 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência: joaos@ufu.br

³ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal.

⁴ Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, CEP: 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia

Resumo - Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga, quanto às diferentes faixas etárias e sexo, foram analisadas amostras sanguíneas de 123 animais, sendo 29 machos com idades de 8 dias a 10 anos e 94 fêmeas (15 lactantes) de 2 dias a 12 anos, de dois criatórios na região centro-sul do estado de Minas Gerais. Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com as idades: Grupo 1 (≤ 6 meses); Grupo 2 (7-12 meses); Grupo 3 (13-48 meses); Grupo 4 (49-72 meses) e Grupo 5 (≥ 73 meses). De acordo com o sexo, foram divididos em dois grupos, machos e fêmeas. Para todos os animais foram realizadas as análises de proteínas totais, albumina, globulinas, relação A:G, colesterol, triglicérides, ácido úrico, creatinina, ureia, fósforo, cálcio, relação Ca:P, magnésio, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK). Não foram encontradas diferenças significativas para os elementos globulinas, ácido úrico, ureia e relação A:G entre as faixas etárias. O Grupo 4 apresentou maiores valores para proteínas totais quando comparados aos animais dos grupos 1 e 2. Os animais do Grupo 2 mostraram valores de albumina inferiores aos grupos 3 e 4. Os animais do Grupo 1 apresentaram valores de colesterol superiores aos do grupo 2 e 4, e semelhante aos demais grupos. Maior concentração sérica de fósforo foi observada nos animais do grupo 1. O cálcio apresentou valor significativamente menor no grupo 2. A relação Ca:P foi maior para o grupo 5. Os valores do magnésio foram estatisticamente superiores nos animais com idade superior a 49 meses (grupos 4 e 5). O valor da AST foi menor para o grupo 1. As enzimas FAL apresentaram valor significativamente maior nos animais mais jovens até 12 meses, seguida de redução gradual com o avançar da idade. Os valores da GGT foi maior nos jumentos com até seis meses de idade, seguido de valores decrescentes para os grupos subsequentes. Não foram encontradas diferenças entre os sexos para albumina, colesterol, creatinina, ureia, ácido úrico, relação Ca:P, magnésio, ALT, AST e fosfatase alcalina. As fêmeas tiveram valores maiores para proteínas totais, globulinas e triglicérides. Os machos mostraram maiores valores para relação A:G, fósforo, cálcio e CK. Pelos resultados nota-se que a idade e o sexo podem influenciar nos valores bioquímicos séricos dos jumentos da raça Pêga.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Equus asinus*, jumento Pêga, bioquímica sérica, asno.

INTRODUÇÃO

O rebanho asinino brasileiro é o sétimo maior do mundo, constituído de 902.716 animais (IBGE 2014). Os jumentos (*Equus asinus*) são importantes para a produção de muares, usados nas fazendas em vários tipos de trabalhos, nos esportes e lazer. Desde o início da colonização, esses animais desempenharam papel relevante no desenvolvimento do meio rural, principalmente na interiorização da civilização brasileira. O jumento continua sendo importante animal para carga, sela, produção de muares, animal de companhia e produtor de carne e leite para consumo humano (Jordana & Folch 1998, Araújo 2010, Sgorbini et al. 2013, Laus et al. 2015), além do uso desses animais nos países subdesenvolvidos como tração de implementos agrícolas nas lavouras de subsistência (Starkeys & Starkeys 2000, Kugler et al. 2008). Carroccio et al. (2000), afirmam que o leite de jumenta é utilizado por crianças alérgicas ao leite de vaca.

O uso do perfil bioquímico é importante na medicina equidea para determinar o estado de saúde dos animais (Duncan et al. 1994, Etana et al. 2011, Munõz et al. 2012). Tasker (1978), nos estudos realizados com asininos, já sinalizava a necessidade de determinação de valores de referências de análises laboratoriais para asininos, entretanto, nas décadas subsequentes, poucas pesquisas foram realizadas nesta espécie. Isto reforça a necessidade de mais estudos sobre esses animais (Al-Busadah & Homeida 2005). Na rotina de muitos médicos veterinários, os valores bioquímicos séricos encontrados em equinos são utilizados para comparação com asininos. Essa comparação é errônea, visto às diferenças existentes entre essas espécies (Zinkl et al. 1990, Trachsel et al. 2005, Veronesi et al. 2014). Objetivou-se neste trabalho avaliar as variações dos constituintes bioquímicos séricos nos asininos da raça Pêga em boas condições de saúde, quanto ao sexo e em diferentes faixas etárias para contribuir com o padrão bioquímico sérico dessa raça.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras sanguíneas de 123 jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*), sendo 29 machos com idades de 8 dias a 10 anos e 94 fêmeas (15 lactantes) com idades de 2 dias a 12 anos, procedentes de 2 criatórios na região Centro-Sul do Estado de Minas Gerais, sendo as coletas realizadas no período de março de 2014 a fevereiro de 2015. Todos os animais eram destinados somente para reprodução e criados em condições semi-extensiva, em piquetes de capim Tifton, recebendo suplementação de feno do capim Tifton, ração concentrada comercial e sal mineral à disposição nos piquetes e nas baias onde ficam os reprodutores. O manejo alimentar, sanitário, reprodutivo e condições de criação nas propriedades eram semelhantes. Durante a coleta das amostras de sangue os animais foram avaliados clinicamente e apresentaram boas condições de saúde e escore corporal satisfatório. As coletas foram realizadas no ambiente onde se encontravam os animais, com contenção usando apenas cabresto. Nenhum dos animais estava em jejum. As coletas de sangue foram feitas no período da tarde, por venipunção da jugular externa, após assepsia do local com algodão embebido em álcool iodado a 2% e secado o local com papel toalha descartável. Os animais foram distribuídos por idades em 5 grupos: Grupo 1, até 6 meses (8 fêmeas e 7 machos); Grupo 2, de 7 a 12 meses (20 fêmeas e 8 machos); Grupo 3, de 13 a 48 meses (23 fêmeas e 8 machos); Grupo 4, de 49 a 72 meses (16 fêmeas e 3 machos); Grupo 5, ≥ 73 meses (27 fêmeas e 3 machos).

Foram utilizadas agulhas descartáveis para coleta de sangue à vácuo 38x1,25 mm (VACUETTE®) acopladas ao adaptador vacunteiner 0,70x25 mm (VACUETTE®) para os animais de pele mais espessa. Para os animais de pele mais fina e menos musculosos usou-se agulhas de calibre 25x0,8 mm (VACUPLAST®), também com adaptador. De cada animal foram coletados 8 mL de sangue em tubos estéreis descartáveis (VACUETTE®) de 8mL com ativador de coágulo. As amostras, após a coleta, foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável, até o momento da centrifugação, realizada 2 horas após as coletas. As amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos a 720g, o soro obtido foi separado em alíquotas em microtubos criogênicos para plasma de 1,8 mL (GETC 1.85®), congelados à -20°C e transportados em caixas isotérmicas até o Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

As análises bioquímicas séricas foram realizadas no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da UFU, em analisador automático multicanal (CHEMWELL®- Awareness Technology Inc., Palm City, USA), utilizando kits comerciais da Labtest Diagnóstica®. O analisador foi previamente calibrado com calibra H; e aferido com soro de controle universal qualitol H, produzidos pela Labtest Diagnóstica®. Os parâmetros bioquímicos avaliados com respectivas metodologias estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros bioquímicos séricos avaliados com respectivas metodologias utilizadas para análise.

Parâmetros	Metodologia
Proteínas totais	Biureto
Albumina	Verde bromocresol
Globulinas	Cálculo: proteína total - albumina
Relação albumina:globulina (A:G)	Cálculo: albumina / globulina
Colesterol	Enzimático-Trinder
Triglicérides	Enzimático-Trinder
Ácido úrico	Enzimático-Trinder
Creatinina	Jaffé-modificado
Ureia	Cinético enzimático-UV
Fósforo (P)	Cinético-UV
Cálcio (Ca)	Cresolfitaleína complexona - CPC
Relação cálcio:fósforo (Ca:P)	Cálculo: cálcio / fósforo
Magnésio (Mg)	Magon sulfonado
Alanina aminotransferase (ALT)	Cinético UV-IFCC
Aspartato aminotransferase (AST)	Cinético UV-IFCC
Fosfatase alcalina (FAL)	Cinético IFCC
Gama glutamiltransferase (GGT)	Szasz modificado
Creatina quinase (CK)	Cinético UV-IFCC

UV = ultravioleta. IFCC = International Federation of Clinical Chemistry

Na avaliação determinou-se as médias e os desvios padrão, aplicando o teste de normalidade verificando que os dados não apresentavam distribuição normal, deste modo foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para verificar as diferenças dos elementos entre os grupos de idade e o teste de Man-Whitney para os sexos, ambos com nível de significância de 5%.

O trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, com o protocolo registro nº 160/13.

RESULTADOS

Os resultados da análise estatística para proteínas, metabólitos, minerais e enzimas séricas avaliados, de acordo com as faixas etárias estão apresentados nos quadros 2 e 3. Comparados os valores de proteínas e metabólitos séricos entre as faixas etárias (Quadro 2), não houve diferenças significativas para globulinas, ácido úrico, ureia e relação A:G.

Quadro 2. Médias e desvios padrão das proteínas e metabólitos de jumentos da raça Pêga, de acordo com as faixas etárias.

Elementos	Grupo 1 (≤ 6 meses) (n = 15)	Grupo 2 (7 - 12 meses) (n = 28)	Grupo 3 (13 - 48 meses) (n = 31)	Grupo 4 (49 - 72 meses) (n = 19)	Grupo 5 (≥ 73 meses) (n = 30)
Prot. T (g/dL)	7,40 ± 1,45 ^c	7,42 ± 0,76 b,c	7,76 ± 0,88 a,b,c	8,10 ± 0,74 a	7,94 ± 0,84 a,b
Alb. (g/dL)	2,61 ± 0,42 a,b	2,32 ± 0,75 b	2,70 ± 0,37 a	2,83 ± 0,71 a	2,77 ± 0,90 a,b
Glob. (g/dL)	4,79 ± 1,54 a	5,20 ± 0,92 a	5,09 ± 0,95 a	5,46 ± 0,78 a	5,15 ± 0,93 a
Rel. A: G	0,59 ± 0,22 a	0,51 ± 0,41 a	0,54 ± 0,14 a	0,54 ± 0,18 a	0,59 ± 0,40 a
Col. (mg/dL)	103,73 ± 32,36 a	74,43 ± 24,38 b	83,42 ± 29,74 a,b	70,68 ± 16,91 b	77,07 ± 10,15 a,b
Trigl. mg/dL)	72,93 ± 45,92 b,c	70,9 ± 38,60 c	117,19 ± 67,22 a,b	130,31 ± 90,17 a,b,c	143,57 ± 83,93 a
Ác.úrico (mg/dL)	2,17 ± 1,33a	1,73 ± 1,46 a	1,62 ± 1,10a	1,39 ± 0,56a	2,10 ± 1,74a
Creat. mg/dL)	0,97 ± 0,08 c	1,09 ± 0,26 b,c	1,18 ± 0,16 a,b	1,28 ± 0,27 a	1,17 ± 0,16 a,b
Ureia mg/dL)	31,55 ± 10,25 a	34,13 ± 5,59 a	30,94 ± 5,27 a	27,61 ± 7,39 a	30,86 ± 6,02 a

Prot. T=Proteínas totais; Alb.=Albumina; Glob.=Globulinas; Rel. A:G= Relação albumina globulina; Col.=Colesterol; Trigl.= Triglicérides; Ác. úrico=Ácido úrico; Creat.= Creatinina.

(a, b, c) Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, indicam diferença significativa, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os animais pertencentes ao Grupo 4 apresentaram maiores valores de proteínas totais quando comparados aos animais jovens (grupos 1 e 2). Com relação à albumina, os animais do grupo 2 apresentaram valor inferior aos dos grupos 3 e 4. O colesterol apresentou valores superiores nos animais do grupo 1 em relação aos dos grupos 2 e 4. Os triglicérides e creatinina também apresentaram variações entre os grupos. O grupo de animais com idade igual e superior a 73 meses apresentaram maiores valores de triglicérides comparados aos animais dos grupos 1 e 2. Os menores valores de triglicérides foram observados nos jumentos do grupo 2, embora não diferindo estatisticamente dos valores do Grupo 1 e 4. Para a creatinina, observou-se valores significativamente menores nos animais do grupo 1 em relação aos dos grupos 3,4 e 5 que foram semelhantes entre si.

Quadro 3. Médias e desvios padrão dos minerais e enzimas séricas de jumentos da raça Pêga de acordo com as faixas etárias.

Elementos	Grupo 1 (≤ 6 meses) (n = 15)	Grupo 2 (7 - 12 meses) (n = 28)	Grupo 3 (13 - 48 meses) (n = 31)	Grupo 4 (49 - 72 meses) (n = 19)	Grupo 5 (≥ 73 meses) (n = 30)
Ca. (mg/dL)	13,46 ± 0,88 a	12,48 ± 1,25 b	13,05 ± 1,11 a	13,28 ± 0,97 a	13,21 ± 1,00 a
P(mg/dL)	6,37 ± 1,15 a	4,09 ± 0,86 b	3,56 ± 0,85 b,c	3,07 ± 1,15 c,d	2,79 ± 0,78 d
Rel. Ca:P	2,16 ± 0,44 b	3,20 ± 0,72 b	3,94 ± 1,31 a,b	4,92 ± 1,93 a,b	5,20 ± 1,97 a
Mg(mg/dL)	2,53 ± 0,29 c	2,89 ± 0,50 b	2,88 ± 0,59 b	3,21 ± 0,48 a	3,26 ± 0,55 a
ALT (U/L)	9,47 ± 3,94 a	10,18 ± 5,77 a	13,93 ± 13,26 a	11,10 ± 5,54 a	10,63 ± 5,48 a
AST (U/L)	246,33 ± 50,15 b	331,71 ± 69,12 a	377,32 ± 75,81 a	370,32 ± 93,24 a	375,30 ± 86,05 a
FAL (U/L)	354,67 ± 105,04 a	248,97 ± 53,20 a,b	219,36 ± 41,52 b,c	169,53 ± 34,75 d	184,73 ± 48,81 c,d
GGT (U/L)	78,40 ± 17,79 a	65,46 ± 26,68 b	62,63 ± 24,72 b	49,63 ± 23,01 c	54,32 ± 18,73 c
CK (U/L)	342,47 ± 345,24 a	236,48 ± 168,20 a	371,33 ± 246,83 a	232,78 ± 129,43 a	259,32 ± 117,95 a

Ca.= Cálcio; P= Fósforo; Rel. Ca:P= Relação cálcio fósforo; Mg= Magnésio; ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase; FAL= Fosfatase alcalina; GGT= Gama glutamiltransferase; CK= Creatina quinase.

(a, b, c) Médias na mesma linha seguida de letras diferentes, indicam diferença significativa entre as faixas etárias, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Com relação aos minerais e enzimas séricas, apenas os elementos ALT e CK não apresentaram diferenças significativas entre as faixas etárias avaliadas (Quadro 3). Os animais do grupo 2 apresentaram valores de cálcio significativamente inferiores aos dos demais grupos, que foram semelhantes entre si. O fósforo apresentou maior valor para os animais do grupo 1 com redução gradativa com o avançar da idade dos animais. A relação Ca:P foi semelhante entre os grupos 1, 2, 3, 4 e a do grupo 5 superior à dos grupos 1 e 2. Os animais dos grupos 4 e 5 apresentaram valores semelhantes para o magnésio, no entanto superiores aos dos demais grupos etários, sendo a menor concentração sérica observada nos jumentos do grupo 1. Com relação a enzima AST, os animais do grupo 1 apresentaram valores menores que os demais grupos. A fosfatase alcalina apresentou grande variação entre os grupos, sendo que os animais dos grupos 1 e 2 apresentaram os maiores valores, diminuindo com o avançar da idade. Os valores de GGT foram maiores para no grupo 1, apresentando redução significativa dos animais mais jovens para os mais velhos. Os resultados da comparação entre os sexos estão apresentados na tabela 4.

Quadro 4. Médias e desvios padrão dos elementos bioquímicos séricos de jumentos da raça Pêga de acordo com o sexo.

Elementos	Fêmeas	Machos	Fêmeas/Machos (Médias)
	(n = 94)	(n = 29)	(n = 123)
Prot. totais (g/dL)	7,83 ± 0,97 ^a	7,41 ± 0,72 ^b	7,73 ± 0,93
Alb. (g/dL)	2,60 ± 0,67 ^a	2,77 ± 0,77 ^a	2,64 ± 0,69
Glob. (g/dL)	5,27 ± 0,99 ^a	4,64 ± 0,90 ^b	5,12 ± 1,00
Relação A: G	0,52 ± 0,25 ^b	0,65 ± 0,41 ^a	0,55 ± 0,30
Col. (mg/dL)	81,81 ± 27,41 ^a	74,59 ± 14,93 ^a	80,11 ± 25,17
Trigl. (mg/dL)	122,55 ± 78,07 ^a	68,17 ± 32,75 ^b	109,73 ± 73,69
Creat. (mg/dL)	1,15 ± 0,21 ^a	1,12 ± 0,23 ^a	1,15 ± 0,22
Ureia (mg/dL)	30,86 ± 6,93 ^a	32,32 ± 6,42 ^a	31,21 ± 6,82
Ác. ú.(mg/dL)	1,73 ± 1,29 ^a	2,00 ± 1,19 ^a	1,79 ± 1,34
Ca (mg/dL)	12,86 ± 1,09 ^b	13,63 ± 0,98 ^a	13,04 ± 1,10
P (mg/dL)	3,60 ± 1,35 ^b	4,27 ± 1,53 ^a	3,76 ± 1,42
Rel.Ca:P	4,09 ± 1,67 ^a	3,75 ± 2,00 ^a	4,01 ± 1,75
Mag. (mg/dL)	3,04 ± 0,59 ^a	2,81 ± 0,41 ^a	2,98 ± 0,56
ALT (U/L)	11,37 ± 8,96 ^a	11,03 ± 4,82 ^a	11,29 ± 8,16
AST (U/L)	352,16 ± 83,08 ^a	340,41 ± 100,64 ^a	349,39 ± 87,24
FAL (U/L)	220,68 ± 70,45 ^a	245,18 ± 99,04 ^a	226,46 ± 78,38
GGT (U/L)	52,93 ± 27,11 ^a	71,30 ± 24,18 ^a	62,11 ± 24,06
CK (U/L)	272,54 ± 173,79 ^b	426,67 ± 254,57 ^a	308,88 ± 208,34

(a, b) Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, indicam diferença significativa pelo teste Man-Whitney ($p < 0.05$).

Nota-se na quadro 4 que as fêmeas apresentaram valores superiores aos machos para proteínas totais, globulinas e triglicérides, enquanto que os machos apresentaram valores superiores para a relação A:G, cálcio, fósforo e CK. Os demais elementos avaliados foram semelhantes entre machos e fêmeas.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo para os elementos globulinas, ácido úrico e ureia, condiz com outros estudos que não encontraram diferenças significativas para os valores séricos destes elementos entre as faixas etárias (Orlandi et al. 1997, Jordana et al. 1998, Alves 2008, Etana e al. 2011, Girardi et al. 2013, Stanisic et al. 2015). Entretanto, estudo de Caldin et al. (2005), com jumentos da raça Ragusana, da Itália, apresentou valores mais baixos para o elemento ureia nos animais jovens. Assim como relatado por Laus et al. (2015), estudando jumentos de raças mistas da Itália, nos animais do presente estudo não observou-se diferenças significativas entre sexos para os elementos albumina, colesterol, creatinina, ureia, colesterol, ALT, AST e FAL. Concentrações de ureia semelhantes para machos e fêmeas no presente estudo diferem dos achados de Alves (2008) ao relatar valores superiores nos machos. Alves (2008), estudando jumentos da raça brasileira, relata valores maiores para a relação A:G em animais mais jovens. Em contrapartida, os estudos realizados por Alberghina et al. (2013), com jumentos da raça Ragusana, assim como o resultado apresentado neste

trabalho, não encontraram diferenças significativas em animais de diferentes idades para a relação A:G. As maiores concentrações séricas de proteínas totais observadas nos animais de 49 a 72 meses de idade (grupo 4) no presente estudo condiz com Alves (2008) ao relatar serem os valores de proteínas totais maiores nos jumentos com idade superior a 18 meses. Nos estudos de Alberghina et al. (2013), os animais com idade superior a 12 meses, apresentaram os maiores valores de proteínas totais, enquanto Caldin et al. (2005) não encontraram diferença significativa para este elemento entre as faixas etárias estudadas. Os índices sugeridos como referência no trabalho de Mori et al. (2003), para proteínas totais em jumentos da raça brasileira, foram inferiores aos encontrados no presente estudo. Sugere-se estar o maior valor nas concentrações de proteínas totais nos animais dos grupos 4 e 5 em relação aos do grupo 1, relacionados ao aumento, embora não estatisticamente significativo nos valores de globulinas devido ao aumento da imunocompetência, frente aos desafios ambientais encontrados e vacinações periódicas.

O maior valor das proteínas totais encontrado nas fêmeas corrobora com Girardi et al. (2013) ao relatarem valor deste elemento superior nas fêmeas. Atribui-se a maior concentração sérica de proteínas totais e globulinas nas fêmeas do presente estudo às respostas fisiológicas das fêmeas no período puerperal e à lactação, uma vez que 15 jumentas estavam lactantes. Entretanto, existem estudos anteriores nos quais os valores de proteínas totais foram superiores em machos (Gacek et al. 1973, Mori et al. 2003, Pitel et al. 2006). Estudos de Cavalcante et al. (2012), e Laus et al. (2015) afirmaram não haver diferenças significativas entre sexo para proteínas totais.

A diferença significativa, com menor valor observado para a albumina nos jumentos do Grupo 2, opõem-se aos achados de outros pesquisadores ao afirmarem não haver diferença significativa para os valores de albumina, frente variadas faixas etárias (Girard et al. 2013, Sgorbini et al. 2013, Stanisic et al. 2015).

Tendo em vista os valores de referência apresentados por Mori et al. (2003), em geral, os resultados encontrados para os jumentos da raça Pega avaliados neste trabalho, para albumina, foram ligeiramente baixos. Contrariando os resultados dos estudos de Mori et al. (2003), Pitel et al. (2006), Girardi et al. (2013), que apontam valores de albumina superiores nos machos, as concentrações séricas de albumina nos animais deste estudo foram semelhantes para fêmeas e machos. O menor valor observado para a albumina nos animais do grupo 2 provavelmente seja devido a uma redução na ingestão de alimentos devido ao estresse pós desmama.

Os valores médios para o colesterol nos animais deste estudo são inferiores aos encontrados por Mori et al. (2003), entretanto estão de acordo com os achados de Girardi et al. (2013), que estudaram jumentos da raça Pega e também encontraram maiores valores de colesterol nos animais mais jovens. Já Chiofalo et al. (2012), estudando animais da raça Pantelaria, não encontraram diferenças significativas entre as idades para o colesterol. A maior concentração de colesterol nos jumentos do grupo 1 em relação aos do grupo 2 deve estar associada à dieta dos animais, que nesta faixa etária (até 6 meses) é predominantemente à base de leite e também à intensa atividade metabólica nesta fase de acelerado crescimento corpóreo. Segundo Carlson (1994), é comum o aumento nas concentrações de colesterol em animais lactentes. Diferente dos resultados de Girardi et al. (2013) que encontraram valores

para o colesterol superiores nos machos, no presente estudo os valores do metabólito foram semelhante para machos e fêmeas.

Os resultados encontrados para triglicérides assemelham com os dos estudos de Jordana et al. (1998), Alves (2008) e Girardi et al. (2013), que também encontraram valores mais altos nos animais mais velhos. Conforme afirmam Watson et al. (1990), os níveis séricos de triglicérides em jumentos, tendem a aumentar com o aumento do peso corporal. Entretanto, em estudo recente com jumentos dos Bálcãs, Stanisic et al. (2015), relatam não haver diferença significativa entre diferentes faixas etárias para este elemento. Ao analisar as diferenças entre sexos, o encontro de valores superiores de triglicérides nas fêmeas neste estudo, contradiz os achados de Laus et al. (2015) que observaram valores semelhantes para machos e fêmeas. A maior concentração sérica de triglicérides encontrados para fêmeas neste estudo deve ser decorrente de uma mobilização das gorduras de reservas para fornecimento de energia durante a lactação.

Os resultados encontrados para creatinina são semelhantes aos valores encontrados por Girardi et al. (2013), que também trabalhando com animais da raça Pêga encontraram valores médios inferiores aos apresentados por Mori et al. (2003), para jumentos da raça brasileira. Caldin et al. (2005), Pitel et al. (2006) e Alves (2008), relatam valores superiores aos encontrados para creatinina neste estudo, ao analisar animais jovens. Atribui-se os menores valores de creatinina nos animais com até 6 meses de idade ao menor volume de massa muscular em relação aos animais com mais de 12 meses de idade. Evans (2009) afirma que os valores de creatinina são dependentes da massa muscular do animal, assim, é de se esperar que os jumentos mais jovens, apresentem os menores níveis séricos de creatinina. A literatura apresenta valores séricos de creatinina diferindo entre machos e fêmeas, sendo que em alguns estudos (Pitel et al. 2006, Etana et al. 2011, Girardi et al. 2013, Orlandi et al. 2013), os valores são superiores para machos, e em outro (Mori et al. 2003), para fêmeas. Contrariando os estudos acima, os jumentos da raça Pêga do presente estudo apresentaram valores deste metabólito semelhantes para machos e fêmeas.

O menor valor observado para o cálcio nos animais do grupo 2, com idade entre 7 e 12 meses, condiz com Girardi et al. (2013) que observaram concentrações de cálcio sérico estatisticamente inferiores nos jumentos da raça Pêga com até 1 ano de idade. Diverge dos estudos de Caldin et al. (2005), Sgorbini et al. (2013) e Stanisic et al. (2015) que não encontraram diferenças significativas para este elemento em relação a idade. Esta menor concentração sérica de cálcio nos animais de 7 a 12 meses pode ser atribuída a uma redução no aporte do mineral na dieta e a elevada demanda em decorrência da ativa taxa de crescimento ósseo, uma vez que estes animais estavam no período de pós desmama, período este responsável por intenso estresse no animal, o que leva a uma redução na ingestão de alimentos. Estudos anteriores relatam o encontro de concentrações séricas de cálcio superiores nas fêmeas (Mori et al. 2003, Pitel et al. 2006, e Girardi et al. 2013). No entanto, nesse estudo valores significativamente maiores foram observados nos machos.

Os valores encontrados para o fósforo confirmam resultados de estudos anteriores, nos quais, os animais jovens apresentaram maiores valores em relação aos demais grupos etários (Jordana et al. 1998, Caldin et al. 2005, Alves 2008, Girard et al. 2013). Contudo, Ahmed et al. (2007) estudando jumentos egípcios e Stanisic et al. (2015), não encontraram diferença significativa para este elemento entre as faixas etárias. O incremento observado na

concentração de P nos jumentos com até 6 meses de idade (Grupo 1) com redução gradativa com o aumento da idade pode ser consequência da ação anabólica do hormônio do crescimento (GH) e do maior aporte deste elemento na dieta, uma vez que durante esta fase da vida, os jumentos tem uma dieta constituída em grande parte pelo leite materno, o qual apresenta uma relação Ca:P de 1:1. Geralmente, os níveis plasmáticos de fósforo refletem um aumento em períodos de rápido crescimento ósseo, o qual ocorre em animais jovens, e gradualmente sofre declínio com o avançar da idade (Evans 2009). Com relação ao sexo, a maior concentração de fósforo verificada nos jumentos machos, neste estudo, condiz com Girardi et al. (2013) e Orlandi et al. (2013), que também relataram valores de fósforo superiores para machos. Em contrapartida, Ahmed et al. (2007) não encontraram diferenças entre sexos para o fósforo. O encontro de menor concentração de Ca e P nas fêmeas do presente estudo é atribuído a uma grande demanda destes elementos nas fêmeas gestantes e lactantes.

O menor valor da relação Ca:P observado nos animais do Grupo 1 e 2 em relação aos do grupo 5 pode ser decorrente do comportamento do P sérico, o qual apresentou maiores valores nos animais jovens em comparação aos mais velhos. Alves (2008) estudando jumentos da raça Brasileira, aponta valores mais altos para a relação Ca:P em animais acima de 18 meses. A semelhança dos valores observados para a relação Ca:P para machos e fêmeas contradiz os achados de Orlandi et al. (2013) que encontraram valores maiores para esta relação nos machos.

Diferentemente dos achados de Caldin et al. (2005) e Girardi et al. (2013), que não encontraram diferenças significativas entre as faixas etárias para as concentrações séricas de magnésio, no presente estudo observou-se menor valor para o eletrólito nos animais com até 6 meses de idade, seguido de aumento gradativo com o avançar da idade. Em contrapartida, Alves (2008), afirma que os valores para magnésio variaram muito entre as idades, sendo o maior valor encontrado nos animais mais jovens. Assim como neste estudo, Ahmed et al. (2007) não encontraram diferenças significativas entre os sexos, enquanto Alves (2008) e Girardi et al. (2013) relataram maiores valores para os machos. As diferenças nos valores do magnésio com relação as faixas etárias pode ser atribuída à dieta dos animais, que na fase jovem é constituída em grande parte pelo leite materno, o qual apresenta menor concentração do mineral em relação às gramíneas e leguminosas.

Os menores valores encontrados para a AST nos jumentos do Grupo 1 corroboram com estudos anteriores que afirmaram ser os valores séricos dessa enzima menores nos animais mais jovens (Alves 2008, Etana et al. 2011, Girardi et al. 2013). Em oposição, Stanisic et al. (2015) relataram maior valor para AST nos animais com até 3 anos de idade. Atribui-se os menores valores da AST nos jumentos com até seis meses de idade, à menor massa muscular e menor atividade física dos animais nesta faixa etária. Com relação a influência dos sexos nas concentrações séricas dessa enzima, existem divergências na literatura. Orlandi et al. (2013) encontraram valores maiores para os machos, Girardi et al. (2013) para as fêmeas e neste estudo não houve diferenças significativas entre sexos.

A atividade da FAL apresentou grande variação entre os grupos etários neste estudo, sendo os valores significativamente maiores nos jumentos mais jovens com até 12 meses de idade, seguido de redução gradual com o aumento da idade, corroborando com os resultados obtidos em estudos anteriores (Caldin et al. 2005, Etana et al. 2011, Girardi et al. 2013, Laus et

al. 2015 e Stanisic et al. 2015). Não condizendo com Girardi et al. (2013), que relataram valores superiores para machos. Maiores valores para a FAL em animais jovens e redução com o aumento da idade é fato conhecido, sendo os altos valores observados atribuídos a alta atividade osteoblástica durante a fase de intenso crescimento (Muñoz et al. 2012). Segundo a literatura, os valores da FAL diminuem com o evoluir da idade e com o fechamento das epífises ósseas (Bauer et al. 1989, Brommer et al. 2001).

Um maior valor observado para GGT sérica nos jumentos com até seis meses de idade e uma redução significativa com o avançar da idade, corrobora com Alves (2008), que encontrou valores significativamente maiores para essa enzima nos jumentos da raça Brasileira com até seis meses de idade. Entretanto, estudos de Caldin et al. (2005) não encontraram diferenças significativas entre as idades para esse elemento, enquanto que Girardi et al. (2013) e Stanisic et al. (2015) encontraram valores mais altos para a enzima em animais com idade superior a 1 ano. Postula-se ser a maior concentração da enzima nos animais com até 6 meses de idade resultante de maior absorção da enzima pelo colostro e leite materno. Verificando a influência do sexo na concentração da GGT, a semelhança dos valores para machos e fêmeas condiz com Laus et al. (2015) que não encontraram diferenças significativas entre sexos para a enzima; no entanto difere de Alves (2008) que encontrou valores da enzima maiores nos jumentos machos da raça Brasileira.

Embora os valores da enzima CK do presente estudo fora semelhantes entre as faixas etárias estudadas, corroborando com os resultados encontrados por outros pesquisadores (Girardi et al. 2013, Stanisic et al. 2015), os machos apresentaram valores significativamente superior ao das fêmeas para esta enzima. Em contrapartida, Laus et al. (2015), estudando jumentos de raças mistas da Itália, demonstraram diferenças significativas para CK, com valores mais altos em animais jovens. Já Alves (2008) e Laus et al. (2015), não encontraram diferenças significativas entre machos e fêmeas. Os maiores valores da enzima observado nos jumentos machos podem ser atribuídos a maior massa muscular desses animais em relação às fêmeas.

Analisando-se concomitantemente os resultados encontrados neste estudo, e os dados existentes na literatura para o perfil bioquímico de jumentos, é possível notar várias diferenças entre os valores relatados. Nas avaliações são utilizadas técnicas laboratoriais com acurácias distintas, assim como diferentes temperaturas, instrumentos e reagentes (Mori et al., 2003), o que poderia levar a tais diferenças. Fatores como raça, manejo e delimitações de faixas etárias também influenciam nos valores encontrados para os perfis bioquímicos. Ressalta-se a importância de padronização das diferentes idades para a realização de estudos que envolvam análise de perfil bioquímico em diferentes faixas etárias.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho realizado com jumentos da raça Pêga e em comparações com outros estudos em diversas raças asininas verifica-se que a idade e sexo influenciam os valores bioquímicos séricos de vários elementos. Assim, é essencial considerar esses fatores quando do estabelecimento de padrões bioquímicos a serem utilizados como referências na clínica de equídeos.

REFERÊNCIAS

- Ahmed A.E., Abdel-Hamid H.Y., Abdel-Rahim A.A., & Ismail M.N. 2007. The influence of age and sex on some blood parameters in healthy donkey in south Valley Egypt. Beni-Suef Veterinary Medical Journal, 5: 151-158.
- Alberghina D., Fazio A., Arfuso F., Sciano S., Zumbo A. & Piccione G. 2013. Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana Donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. Journal of Equine Veterinary Science, 33 (6): 433-436.
- Al-Busadah K.A. & Homeida A.M. 2005. Some physical variables, biochemical and hematological parameters in Hassawi Ass. Scientific Journal of King Faisal University, 6 (1): 145-152.
- Alves L.M.D. 2008. Influência da idade e do sexo sobre o perfil bioquímico sérico de jumentos da raça Brasileira. – Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia – Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica. 38f.
- Araújo N.A. 2010. Origem Histórica do Jumento Doméstico, GRAFIPRESS. Patos de Minas. MG, 320p.
- Bauer J.E., Asquith R.L. & Kivipelto, J. 1989. Serum biochemical indicators of liver function in neonatal foals. American Journal of Veterinary Research , 50: 2037-2041.
- Brommer H., Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbav, M.M. & Kessels, B. 2001. Haematological and blood biochemical characteristics of Dutch warmblood foals managed under three different rearing conditions from birth to 5 months of age. Veterinary Quartely, 23: 92-95.
- Caldin M., Furlanello T., Solano-Gallego L., De Lorenzi D., Carli E., Tasca S. & Lubas G. 2005. Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). Comparative Clinical Pathology, 14 (1): 5-12.
- Carlson G.P. 1994. Testes de química clínica. In: Smith B. Tratado de medicina interna de grandes animais. v. 1, São Paulo: Manole, p. 395-423.
- Carroccio A., Cavataio F. & Montalto G. 2000. Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infancy: Clinical characteristic and dietary treatment. Clin Exp Allergy, 30: 597-603.
- Cavalcante P.H., Silva A.C.C., Sakamoto S.M. & Soto Blanco B. 2012. Serum protein fractions in Brazilian breed donkeys using agarose gel electrophoresis. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 36 (1): 9-12.
- Chiofalo R., Liotta L., Sanzarello L. & Chiofalo V. 2012. European Federation of Animal Science, 129: 161-164.
- Duncan J.R., Prasse K.W. & Mahaffey E.A. 1994. Veterinary laboratory medicine clinical pathology. University Press, Ames, Iowa, p. 118-122. 300p.
- Etana K.M., Jenbere T.S., Bojia E. & Negussie H. 2011. Determination of reference hematological and serum-biochemical values for working donkeys of Ethiopia. Veterinary Research, 4 (3): 90-94.
- Evans G.O. 2009. Animal clinical chemistry a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. 2.ed. CRC Press, Boca Raton, 310p.
- Gacek F., Bizutti O., Perdigão de Oliveira F.R.A. & Leão J.F.S. 1973. Eletroferograma das proteínas séricas de jumentos *Equus asinus* L. normais da raça Brasileira. Boletim da Indústria Animal, 30: 161-171.

- Girardi A.M., Marques L.C., Toledo C.Z.P., Barbosa J.C., Maldonado Júnior W., Jorge, R.L.N. & Nogueira C.A.S. 2013. Biochemical profile of the Pêga donkey (*Equus asniuns*) breed: influence of age and sex. *Comp Clin Pathol.* 23 (4): 941-947.
- IBGE 2014. Produção da Pecuária Municipal (PPM). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Jordana J., Folch P. & Cuenca R. 1998. Clinical biochemical parameters of the endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. *Research in Veterinary Science*, 64 (1): 7-10.
- Kugler W., Grunenfelder H.P. & Broxham E. 2008. Donkey breeds in Europa. St. Gallen, Switzerland: Monitoring institute for rare breeds and seeds in Europe. 62p.
- Laus F., Spaterna A., Faillace V., Paggi E., Serri E., Vullo C., Cerquetella M. & Tesei, B. 2015. Reference values for hematological and biochemical parameters of mixed breed donkeys (*Equus asinus*). *Wulfenia Journal*, Klagenfurt, 22 (1): 294-304.
- Mori E., Fernandes W.R., Mirandola R.M.S., Kubo G., Ferreira R.R., Oliveira J.V. & Gacek F. 2003. Reference values on serum biochemical parameters of Brazilizan donkey (*Equus asinus*) breed. *J Equine Vet Sci*; 23: 358-64.
- Munõz A., Riber C., Trigo P. & Castejón F. 2012. Age and gender related variations in hematology, clinical biochemistry, and hormones in Spanish fillies and colts. *Res. Vet. Sci.* 93: 943-949.
- Orlandi M., Curadi M.C., Giogertti A. & Benedetti R. 2013. Caratterizzazione morfo-funzionale e fisiologica dell'asino amiatino. *Ippologia*, 24 (3-4): 11-16.
- Orlandi M., Leotta R., Berni P. & Curadi M.C. 1997. Metabolic profile in the Amiata donkey (Tuscany). *Annali della Facolta' di Medicina veterinaria di Pisa*, 50: 47-53.
- Pitel P., Moulin M., Valette J.P., Dumontier S., Petit L., Fortier G. & Coroucé-Malblanc A. 2006. Approches des valeurs hématologiques et biochimiques chez deux races asines. *Pratique Vétérinaire Équine*, 38 (149): 19-25.
- Sgorbini M., Bonelli F., Rota A., Baragli P., Marchetti V. & Corazza M. 2013. Hematology and clinical chemistry in Amiata donkey foals from birth to 2 months of Age. *J. Equine Vet. Sci.* 33: 35-39.
- Stanisic L., Dimitrijevic V., Simeunovic P., Lakic N., Radovic I., Ivankovic A., Stevanovic J. & Stanimirovic Z. 2015. Morphological, biochemical and hematological characterization of endangered Balkan donkey breed. *Acta Veterinaria*, 65 (1): 125-136.
- Starkey P. & Starkey M. 2000. Regional and world trends in donkey populations. A resource book of the Animal Traction Network for eastern and Southern Africa (ATNESA). P. 10-21 In: STARKEY P. & Fielding, D. (Eds.). *Donkeys, people and development*. ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), Wageningen: 10-21.
- Tasker J.B. 1978. Reference values for clinical chemistry using the Coulter Chemistry System. *Cornell Vet.*, 4: 460-479.
- Trachsel D., Brehm W. & Tschudi P. 2005. Reference values for haematology and clinical chemistry in donkeys. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 1: 55-60.
- Veronesi M.C., Gloria A., Panzani S., Sfirro M.P., Carluccio A. & Contri, A. 2014. Blood analysis in newborn donkeys: hematology, biochemistry, and blood gases analysis. *Theriogenology*, 82: 294-303.
- Watson T.D.J., Packard C.J., Shephard, J. & Fowler J. 1990. An investigation of relationship between body condition and plasma lipid and lipoprotein concentration on 24 donkeys. *Veterinary Record*, 127: 498-500.

Zinkl J.G., Mae D., Merida G.P., Farver T.B. & Humble J.A. 1990. Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). Am J Vet Res, 51(3):40

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais.



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –




CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 160/13, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Perfil bioquímico sérico de asininos e muare (burros e bardotos) brasileiros”, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. João Batista Ferreira dos Santos** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **14 de Março de 2014**.

(We certify that the protocol nº 160/13, about “Perfil bioquímico sérico de asininos e muare (burros e bardotos) brasileiros”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 14/03/2014).

Uberlândia, 20 de Março de 2014.


Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO B - Normas da Revista GMR para submissão do artigo: Quick method for identifying Horse (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) hybrids.



Submit your manuscript

Are you ready to submit your manuscript? Please review the submission guidelines and then refer to this checklist to ensure that you have gathered all the relevant information and that the manuscript is properly formatted.

All manuscripts must be submitted using the online submission system.

If you are sure whether your work satisfies the basic requirements for publication in GMR, we are happy to consider your paper.

Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

Article processing charge

To provide Open Access, GMR uses a business model to offset expenses - including those of peer review management, journal production, and online hosting and archiving - by article-processing charge to the authors, institutions, or funders for each article published.

The article-processing fee applied by GMR consists of: Submission Fee + Publication Fee.

[Read more](#) about submission fee and publication fee.

Authors' list

Are all authors aware of, and do they approve of, the submission of the manuscript, its content, authorship, and the order of authorship?

Do you have the following information for all authors?

First Name, Middle Names/Initials, Last Name

Work Affiliations

Email Address

Any Competing Interests

Financial Disclosure/Funding Information

All authors signed the [cover letter](#)

Genetics and Molecular Research - ISSN: 1676-5680
Rua Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista - Ribeirão Preto/SP -Brasil
Fone: +55 (16) 3620 1251 - Fax: +55 (16) 3621 1991

Acknowledgments

Have you confirmed that anyone named in the Acknowledgments section agrees to be so named?

Article file

Article file in DOC format, prepared per the [Submission Guidelines](#).

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title page

The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Title

Include a full title (no more than 150 characters) and a running title (no more than 60 characters).

Abstract

Include an Abstract of no more than 300 words.

Data

Deposition of all appropriate datasets, images, and information in the relevant repositories or submission of undeposited data as supporting information files.

Nomenclature

Standard nomenclature used throughout the manuscript file.

Abbreviations

Non-standard abbreviations defined upon first use in the text.

Genetics and Molecular Research - ISSN: 1676-5680

Rua Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista - Ribeirão Preto/SP -Brasil

Fone: +55 (16) 3620 1251 - Fax: +55 (16) 3621 1991

Figures and tables

All figures and tables called out in the manuscript in ascending numeric order upon first appearance.

Original figure files must be uploaded with high-resolution (300 - 600 dpi) TIFF format. If any of your figures is under copyright, please notify the journal office.

Equation

We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable.

References

Use [GMR style](#) for references.

We recommend that you upload all of your files in one step by creating a single .zip file, which will be automatically unpacked by the submission system.

Are you submitting a revision?

Contact us at gmr@geneticsmr.com

Help

Please contact gmr@geneticsmr.com if you have any question.

ANEXO C – Aceite da revista Genetics and Molecular Research, do artigo Quick method for identifying Horse (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) hybrids.



Ribeirão Preto, 26 de Julho de 2016

Prezados autores,

Informamos que o artigo "Quick method for identifying horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) hybrids" GMR8895, de autoria M.M. Franco,,, J.B. F. dos Santos, A.S. Mendonça, T.C.F. Silva, R.C. Antunes and E.O. Melo, foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research (GMR).

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 0,85, segundo JCR - junho 2013.

Atenciosamente,

Francine Muniz

Coordenadora editorial (Mtb 44.300)

Genetics and Molecular Research

www.funpecrp.com.br/gmr

Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

ANEXO D - Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira para submissão dos artigos: Variações fisiológicas, influência da idade e sexo no perfil bioquímico sérico de bardotos e Perfil bioquímico sérico de jumentos da raça Pêga no Estado de Minas Gerais.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativa, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico

ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser no **formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. **ABSTRACT** e **RESUMO** serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sem-pre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis**, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos**. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO E - Depósito da sequência parcial da região mitocondrial D-loop de Asininos e Equinos.

[GenBank](#)

***Equus asinus* D-loop, partial sequence; mitochondrial**

GenBank: KU881746.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS KU881746 418 bp DNA linear MAM 28-MAR-2016

DEFINITION *Equus asinus* D-loop, partial sequence; mitochondrial.

ACCESSION KU881746

VERSION KU881746.1 GI:1009022604

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Equus asinus* (ass)

ORGANISM [Equus asinus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; *Equus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 418)

AUTHORS Franco,M.M., Santos,J.B.F., Mendonça,A.S., Silva,T.C.F.,
Antunes,R.C. and Melo,E.O.

TITLE Quick method for identifying Horse (*Equus caballus*) and Donkey
(*Equus asinus*) hybrids

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 418)

AUTHORS Franco,M.M., Santos,J.B.F., Mendonça,A.S., Silva,T.C.F.,
Antunes,R.C. and Melo,E.O.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-MAR-2016) PBI, Embrapa Genetic Resources &
Biotechnology, Av W 5 Norte Final, Brasilia, DF 70770917, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..418
/organism="*Equus asinus*"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[9793](#)"

[D-loop](#)<1..>418

ORIGIN

```

1 aaataagaca tctcgatgga ctaatgacta atcagcccat gctcacacat aactgtggtt
61 tcatgcatTTT ggtatctttt tatatttggg gatgctatga ctcagctatg gccgtcaaag
121 gccccgacgc agtcaattaa attgaagctg gacttaaatt gaacgttatt actccgcac
181 agcaaccata aggtgttatt cagtccatgg taacaggaca taaagaacat gcacacccac
241 acacccatgc gcgcacacac ccacacaccc atgcgcgcac acacccacac acccatgcgc
301 gcacacaccc acacacccat gcgcgcacac accacacac ccatgcgcgc acacacccac
361 acacccatgc gcgcacacac ccacacaccc atgcgcgcac acacccacac acccatgc
```

- [GenBank](#)

***Equus caballus* D-loop, partial sequence; mitochondrial**

GenBank: KU881747.1

[FASTA Graphics PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS KU881747 407 bp DNA linear MAM 28-MAR-2016

DEFINITION *Equus caballus* D-loop, partial sequence; mitochondrial.

ACCESSION KU881747

VERSION KU881747.1 GI:1009022605

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Equus caballus* (horse)

ORGANISM [Equus caballus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; *Equus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 407)

AUTHORS Franco,M.M., Santos,J.B.F., Mendonça,A.S., Silva,T.C.F.,
Antunes,R.C. and Melo,E.O.

TITLE Quick method for identifying Horse (*Equus caballus*) and Donkey
(*Equus asinus*) hybrids

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 407)

AUTHORS Franco,M.M., Santos,J.B.F., Mendonça,A.S., Silva,T.C.F.,
Antunes,R.C. and Melo,E.O.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-MAR-2016) PBI, Embrapa Genetic Resources &
Biotechnology, Av W 5 Norte Final, Brasilia, DF 70770917, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..407
/organism="*Equus caballus*"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[9796](#)"

[D-loop](#)<1..>407

ORIGIN

1 aaataagaca tctcgatgga ctaatgacta atcagcccat gctcacacat aactgtgggt
61 tcatgcattt ggtatctttt tatatttggg gatgctatga ctcagctacg gccgtcaaag
121 gcctcgacgc agtcaactaa attgaagctg gacttaaatt gaacgttata cctccgcata
181 caacaacat aaggtgttat tcagtccatg gtaacaggac ataagaaaca agcacacctg241
tgcacctgtg cacctgtgca cctgtgcacc tgtgcacctg tgcacctgtg cacctgtgca
301 cctgtgcacc tgtgcacctg tgcacctgtg cacctgtgca cctgtgcacc tgtgcacctg
361 tgcacctgtg cacctgtgca cctgtgcacc tgtgcacctg tgcacct

Anexo F - Sequência do genoma mitocondrial de Asininos e Equinos.

Equus asinus complete mitochondrial genome

GenBank reference: X97337.1

GTTAATGTAGCTTAATGATATCAAAGCAAGGCACTGAAAATGCCTAGATGAGTATTCTACTCCATAAACACATAGGCTT
GGTCTGGCCTTTTTATTAGTTATTAATAAAATTACACATGCAAGTATCCGCACCCAGTGAGAATGCCCTCTAAATCGC
ACTCTACGATCAAAAGGAGCAGGTATCAAGCACACTACAAAGTAGCTCATAACACCTTGCTAGGCCACACCCCCACGGGA
CACAGCAGTGATAAAAATTAAGCTATGAACGAAAGTTGACTAAGTTATATTAACTAGGGTTGGTAAAATTCGTGCCAG
CCACCGCGGTACATACGATTAACCCAAATTAATAAACCTCCGGCGTAAAGCGTGTCAAAGACCCATACTAAAATAAAGTT
AAAACCCAGTTAAGCTGTAAAAGCTACAATAAAGTAAAATAAATACTACGAAAGTGACTTTAATACCTCTGACCACACGA
TAGCTAAGGCCCAAATGAGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACCAAATAGCTCACCATAACAAAGCTATTC
GCCAGAGTACTACTAGCAACAGCCTAAAACCTCAAAGGACTTGCGCGTGTCTTACATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCCGTA
ATCGATAAACCCCGATAAACCCACCATCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAACAAGG
TACCAAAGTAAGCACATCATCCAACATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACAT
TTTCTACTCTAAGAACAAGAACTCAACCCAAACGGAAGTCTCCATGAAATTAGAGACCGAAGGAGGATTTAGTAGTAAAT
TAAGAATAGAGAGCTTAATTGAATCAGGCCATGAAGCGCGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTTAAATATTACAAATCAC
AATATTACACAAAACCATGATCCAAACATATGAAAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGTATACCGGAAGGTGTACTTGG
ATAACCAAAGTGTAGCTTAAACAAAGCATCCAGCTTACACCTAGAAGATTTCACTCAGAGTGAACACTTTGAACTAAAGC
TAGCCCAAACAATACCCAACTCACTACCCTTAGTCACTTAACTAAAACATTACCAAACCATTAAGTATAGGAGATAG
AAATTTTAACTTGCGCTATAGAGAAAGTACCGTAAGGGAACGATGAAAGATGTATTAAAAGTACTAAACAGCAAAGCTT
ACCCCTTTTACCTTTTGCATAATGATTTAACTAGAATAAACTTAGCAAAGAGAACTTAAGCTAAGCACCCCGAAACCAGA
CGAGCTACCTATGAACAGTTATAAAGAACCAACTCATCTATGTCGAAAATAGTGAGAAGATTCATAGGTAGAGGTGAAA
AGCCCAACGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAGAAACAGAATCCCAGTTCAAATTTAAATTTACCTAAAAACCACTTAA
TTCTAATGTAACTTAAATTATAGTCTAAAAAGGTACAGCTTTTTAGATACAGGATACAACCTTTATTAGAGAGTAAGAA
TAAGATTAATCCCATAGTTGGCTTAAAGCAGCCATCAATTAAGAAAGCGTTCAAGCTCAACGTACACATATCTTAATC
CCAATAATAGACTCAGACTAACTCCTAATCTTATACTGGACTATTCTATCGACACATAGAAGCAATAATGTTAATATGAG
TAACAAGAATTATTTCTCCTTGATAAGCCTATATCAGAACGAATACTCACTGATAGTTAACAACAGAATAGACACAATC
CAAAACTAACCATCTATTTAGACTATTGTTAACCCAAACACAGGTGTGCACCCATAAGGAAAGATTAAGAAGTAAAG
GAACTCGGCAACACAAACCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCACCTCTAGCATTCCAGTATTAGAGGCACTGCCTGCCC
AGTGACATCTGTTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTCTAAATAGGGACTTGT
ATGAATGGCCACACGAGGGTTTTACTGTCTCTTACTTCCAATCAGTGAAATTGACCTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATAAT
CAAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAAGTATTACAAAAACAACATAACAACTAACCTCAGGGACA
ACAAAACTTTTGATTGAATCAGCAATTTGCGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAAAACAACCTCCGAGTGATTTAAATCTAG
ACTAACCAGTCAAAATACATAATCACTTATTGATCCAAACCTTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGC
AATCCTATTCCAGAGTCCATATCGACAATTAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAACCGC
TATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTGCGTTTCTATC
TATTCTACACTTTTCCAGTACGAAAGGACAAGAAAAGTAGGGCCCACTTTATAAGAAGCGCCCTCAAACCTAATAGATGA
CATAATCTAAATCTAACTAATTTATTAACCCACCGCCCTAGAACAGGGCTCGTTAGGGTGGCAGAGCCGGAATTGCGT
AAAACCTTAAACCTTTACACCCAGAGGTTCAACTCCTCTCCCTAACAAACATGTTTATAATTAACGTCTCTCTTAATTAT
CCCAATCCTGCTCGCCGTAGCATTTCTCACACTAGTTGAACGAAAAATCTTAGGCTATATACAACCTTCGCAAAGGACCCA
ACATCGTAGGCCCCCTACGGCCTACTACAGCCCATCGCTGATGCCCTTAACTATTTATCAAAGAACCACTACAACCACTA
ACATCATCAACATCCATATTATTATCGCACCAATCCTAGCCCTCACCTAGCCTTAACCATATGAATCCCCCTACCCAT
GCCATACCCACTAATTAACATAAACCTGGGAATTCTATTCTACTAGCCATATCCAGCCTAGCTGTCTACTCAATCCTTT

GATCAGGGTGAGCCTCAAACCTCAAATATGCTCTAATTGGAGCCTTACGAGCAGTAGCACAAACCATTTCGTATGAAGTA
 ACTCTAGCAATTATTCTACTCTCAGTCCTCCTAATGAGCGGATCATTACACTATCAACACTCATCATTACCCAAGAATA
 CTTATGATTAATCTTCCCATCATGACCCTTAGCCATAATATGATTTCATCTCAACATTGGCCGAAACCAACCGAGCTCCAT
 TTGACCTAACAGAGGGAGAATCAGAACTCGTCTCCGGATTCAACGTGCAATACGCAGCCGGCCCATTCGCCCTATTTTTC
 CTTGCAGAATATGCAAACATCATCATAATAAATATCTTCACAACAACCCTATTTCTTGAGCATTTCACAGCCCCCTACCT
 ACCAGAACTCTACTCAATTAATTTCTACTATAAAAAACCCTCCTTCTAACATGTTTCCTTCTATGAATCCGAGCATCTACC
 CACGATTCCGATATGATCAACTTATACACCTCTTATGAAAAAAGTTCTGCCACTTACACTAGCCCTCTGCATATGACAC
 GTCTCACTACCAATTATATTATCCAGCATCCCACCACAAACATAAGAAATATGTCTGACAAAAGAGTTACTTTGATAGAG
 TAAACATAGAGGTTCAAACCCTCTTATTTCTAGAACCACAGGAATTGAACCTGCTCCTGAGAATTCAAAATCCTCCGTG
 CTACCAAATTACACCATGTCTACAAGTAAGGTGAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCGAAAATGTTGGATTACA
 CCCTTCCCGTACTAATAAACCCCTTATCCTCACAATCATTCTAATAACAGTTTTTCTAGGAACATAATCGTTATAGCA
 AGCTCACACTGACTAATAATCTGAATCGGATTGAAATAAATCTACTAGCCATCATCCCCATCCTAATAAAAAAATATAA
 TCCTCGAGCTATAGAGGCTCCACCAAGTACTTCTTAACCCAAGCCACCGCATCCATACTCCTCATAATAGCAATCATCA
 TCAACCTTATACACTCAGGCCAATGAACAATCACAAAAGTTTTTAACCCACAGCATCCATCATCATAACTTTAGCCCTC
 GCCATAAACTTGGACTGACACCATTCATTTCTGAGTGCCCGAAGTCACACAGGGCATCTACTAACATCAGGCCTCAT
 CTTACTCATGACAAAAACTAGCCCCAATATCAATCCTATATCAAATCTCACCTCAATCAACCTAAACATCCTACTAA
 CTATAGCCGTGCTATCAATCCTAGTAGGAGGCTGAGGTGGCCTCAACCAAACCAACTACGAAAAATTATGGCATACTCG
 TCAATTGCCCATATAGGATGAATAGCAGCCATCTTAGTGTACAACCCAACACTGACAATACTAAACATACTAATTTACAT
 TATAATAACACTCACAATATTCTACTGTTTATCCACAGCTCCTCTACCACAACACTATCACTCTCACACACATGAAACA
 AAGCACCTCTAATCACCACACTAATCCTAATCACCTTGCTATCTATAGGAGGCTCCCTCCACTATCAGGATTCATACCC
 AAATGAATAATCATCCAAGAACTTACCAAAAACAGCAGCATCATTCTCCCCACCCTAATGGCTATTATAGCTCTACTCAA
 TCTCTACTTTCTACATGCGACTAACCTATTCCACCTCCCTAACTATATTCCCATCCACAAATAATATAAAAAATAAAATGAC
 AATTGAAACCAAACAAATTACCCTCCTACCCCATTAATCATCGCATCTTCCCTACTCCTCCCCCTAACCCCATACTA
 TCAATTCTGGACTAGGAATTTAGGTTAACATCCAGACCAAGAGCCTTCAAAGCCCTAAGCAAGTGTATTCACTTAATTCC
 TGCACACTAAGGACTGCAAGACTCTATCTCACATCAATTGAACGCAAATCAAACACTTTCATTAAGCTAAGCCCTTACTA
 GATTGGTGGGCTATCATCCCAGAAATTTTAGTTAACAGCTAAACACCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGC
 CGCTAAAAAAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGAATTGAAGCTGCTTCTTTGAATTTGAATTCACGTGAAATTCACC
 ACAGGACTTGATAAGAAGAGGATTCCAACCCCTGTCTTTAGATTTACAGTCTAATGCTTACTCAGCCATCTTACCTATGT
 TCATTAACCGTGACTATTTTCAACTAACCAAAAGACATCGGCACTCTGTACCTCCTATTTCGGCGCTTGAGCTGGAATA
 GTAGGAACCGCCCTAAGCCTCCTAATCCGTGCTGAATTAGGTCAACCTGGGACCCTGTGGGAGATGATCAGATCTACAA
 TGTTATTGTAAGTGGCATGCATTCGTAATAATCTTCTTCATAGTCATACCCATCATGATCGGAGGATTTGGGAAGTATGAT
 TAGTTCCCTTAATAATTGGAGCACCCGATATAGCCTTTCCCCGAATAAACAACATAAGCTTCTGATTACTTCCCCCATCA
 TTCTACTTCTTCTTGCTTCTCAATAATTGAAGCAGGCGCTGGAACAGGCTGAACCGTATATCCTCCCCCTAGCTGGAAA
 TCTAGCGCACGCAGGGGCTTCTGTTGACTTAACCATCTTCTCCCTTCACCTAGCTGGTGTATCTTCAATTTTAGGTGCCA
 TCAATTTTCAATTACCACAATCATCAACATAAAACCACCAGCCCTGTCCCAGTATCAAACCCCTCTATTGTTTTGATCCGTC
 CTCATTACGGCAGTACTCCTTCTCCTAGCTCTTCCAGTCTTAGCAGCAGGTATTACTATGCTTCTCACAGACCGTAACTT
 AAACACCACCTTCTTCGATCCTGCAGGGGGAGGGGATCCAATCCTTTACCAACACCTATTCTGATTTTTCGGACACCCGTG
 AAGTCTACATTCTCATTCTGCCAGGCTTTGGTATAATCTCACACATCGTTACATATTATTTCAGGTAAAAAAGAACCTTTC
 GGCTACATGGGTATAGTATGAGCTATAATATCCATTGGCTTCCCTAGGCTTCATCGTATGAGCTCACCACATGTTTACAGT
 AGGTATAGACGTCGATACACGAGCATATTTACATCAGCTACCATAATCATCGCCATCCCAACCGGTGTAAGATTTTA
 GCTGACTAGCTACCCTGCACGGAGGAAATATCAAATGATCTCCAGCTATACTCTGAGCTCTAGGCTTCATCTTCTTATTC
 ACAGTAGGAGGCTAACAGGAATCGTCTTGCTAACTCATCCCTAGATATTGTTCTCCACGATACTTATTATGTAGTAGC
 ACATTTCCACTACGTCCTATCCATAGGAGCAGTCTTCGCCATTATGGGAGGATTTGTTCACTGATTCCCTCTATTCTCAG
 GATATACACTCAATCAAACCTGAGCAAAAATCCACTTTACAATTATTTTCGTAGGGGTCAATATAACTTTCTTCCCACAA
 CACTTCCCTTGGCCTCTCAGGAATACCACGACGCTATTCTGACTACCCGGACGCGTATACAACATGAAACACCATCTCATC
 CATAGGATCTTTTATCTCACTCACAGCAGTAATACTAATAATCTTCATAATTTGAGAAGCATTTCGCATCCAAACGAGAAG

TGTCTACAGTAGAATTAACCTCAACTAACCTAGAATGACTACATGGATGCCCCCACCATAACCATAACATTTGAAGAACCC
 GCCTACGTAAACCTAAAATAAGAAAGGAAGGAATCGAACCCCTCTAACTGGTTTCAAGCCAATATCATAACCACTATGT
 CTTTCTCCATTAAACGAGGTATTAGTAAAAATTACATAACTTTGTCAAAGTTAAATTATAGGTAAATCCCTATATACCT
 CTATGGCCTACCCTTTCCAATTAGGATTCCAAGACGCAACATCCCCTATTATAGAAGAACTCCTACACTTCCATGACCAC
 ACGCTAATAATCGTATTCTTAATTAGCTCTCTAGTGTTATACATTATCTCATCAATACTAACGACTAAATTAACCCACAC
 CAGCACTATAGACGCCCCAAGAAGTAGAAACAATTTGAACGATTCTACCAGCCATCATCCTTATTCTAATTGCCCTCCCAT
 CCCTACGAATTCTATATATAATAGACGAGATTAACAACCCATCTCTCACAGTCAAAACAATAGGCCACCAATGATACTGA
 AGTTACGAGTATACCGATTACGAAGACCTGACCTTCGACTCCTACATGATCCCCACATCAGACTTGAAACCAGGAGAACT
 ACGTCTTCTAGAAGTCGACAACCGAGTGTTCTTCCCTATAGAAATAACTATCCGGATATTAATTTTCATCCGAAGACGTAT
 TACACTCATGAGCTGTCCCCTCCCTAGGCCTAAAAACGGACGCCATCCCTGGGCGCCTAAATCAGACAACCTCTCGTAGCC
 TCCCGACCAGGCCTTTACTATGGCCAATGCTCAGAGATTTGCGGATCAAACCACAGCTTTATACCAATTGTTCTTGAAC
 AGTTCCACTGAAATACTTCGAAGAATGATCTGCATCAATACTATAAAATCACTAAGAAGCTAATACAGCGTTAACCTTTT
 AAGTTAAAGACTGAGGGTTCAATCTCCCTCCCTAGTGATATGCCACAGTTGGATACATCAACATGATTTATTAATATCGT
 CTCAATAATCCTAACTCTATTTATTGTATTCCAACCTAAAAATTTCAAAGCACTCTTATCCAATACACCCAGAAGCTAAAA
 CAACTAAAAATAGCTAAACGCCTTACCCCTTGAGAATCAAAATGAACGAAAATCTATTGCGCTCTTTGCTACCCCAACAA
 TAATAGGCCTCCCTATTGTAATCCTAATCATTATATTCCCCAGCATCCTATTTCCCTCATCCAACCGACTAATTAACAAT
 CGCCTAATCTCAATCCAACAATGGCTAGTCCAACCTACATCAAAACAAATAATAACCATCCATAACAATAAAGGACAAAC
 CTGAACCCCTCATACTCATGTGCTAATCCTATTATTGGTTCAACAACTTATTGGGCCTACTACCCCACTCATTTACAC
 CAACAACACAACCTATCAATAAACCTAGGCATAGCCATCCCCCTGTGAGCAGGAACAGTATTCATAGGCTTTTCGTCATAAA
 ACAAAAGCAGCTCTAGCTCACTTTCTACCCCAAGGAACGCCATTTTCTCTATTCCCATAGTAATTATTGAGACTAT
 CAGTCTATTTATTCAACCAATAGCTCTAGCCGTACGGCTAACTGCTAATATTACTGCCGGACATCTTCTAATCCACCTTA
 TCGGAGGAGCAACGCTAGCCCTCATAGACATTAGCCCTCAACAGCCCTTATTACATTCATTATCCTGATTCTACTAACT
 ATCCTCGAATTTCGAGTAGCCATAATCCAAGCCTATGTATTCACTCTCCTAGTAAGTCTCTACCTACACGATAACACCTA
 ATGACCCACCAAACCCACGCCTACCACATAGTAAACCCAGCCCATGACCACTTACAGGAGCCCTATCAGCCCTCCTAAT
 AACATCAGGATTAGCCATGTGATTCCACTTTAACTCAACCCCTACTTTTAGCTCTGGGACTATTAACCAACATCCTTACCA
 TATATCAATGATGGCGAGACATCATCCGAGAAAGCACATTCCAAGGCCATCACACATCAATCGTCCAAAAAGGGCTCCGA
 TATGGTATAATCCTTTTTCATCATCTCAGAAGTCTTCTTCTCTGCTTCTTCTGAGCTTTCTACCACTCAAGCCTAGC
 TCCTACACCCGAACCTAGGCGGCTGCTGACCACCCACAGGTATCCACCCCTAAACCCCTAGAAAGTCCCTTACTCAATA
 CCTCAGTGCTCCTAGCATCAGGAGTCTCCATCACCTGAGCCCACCATAGCCTGATAGAAGGGAACCGTAAAAACATGCTC
 CAAGGCCTATTTATCACAATCTCTCTAGGCGTGTACTTCACTCTCCTTCAAGCCTCAGAATACTACGAAGCTTCATTTAC
 TATTTAGATGGGGTGTACGGATCGACATTTTTCGTAGCAACGGGATTTACGGACTACACGTAATCATCGGATCCACCT
 TCCTTATCGTATGCTTCCTACGCCAACTAAAGTTCCACTTTACATCCAGTACCATTTCGGATTCTGAAGCAGCCGCTTGA
 TACTGACACTTCGTCGACGTAGTTTGACTATTCTTATATGTCTCTATCTATTGATGAGGATCCTATTCTTTTAGTATTGA
 CCAGTACAATTGACTTCCAATCAATTAGCTTTCGGTATAATCCCGAAAAAGAATAATAAATCTCATACTAACACTCCTCAC
 CAATACATTACTAGCCTCGCTACTCGTACTCATCGCATTCTGATTACCACAACCTAAACATCTATGCAGAAAAAACAGCC
 CATAACGAATGCGGATTTGACCCAATAGGGTCAGCACGCCTCCCTTTCTCAATAAAATTTTTCTTAGTGCGGATTACATTC
 CTGCTGTTTCGACCTAGAAATCGCCCTCCTATTGCCCCCTCCATGAGCATCCCAGACAACCTGAACACTATACTTAT
 TATAGCACTAATCCTAATCTCTCTCCTAGCCATCAGCCTGGCTTACGAATGAACCCAAAAAGGGCTAGAATGAACTGAGT
 ATGGTAATTAGTTTAAACCAAAACAATGATTTGCACTCATTAACTATGATTAACCTTCATAATTACCAACATGTCACTA
 GCCCACATTAATATCTTCTTAGCATTACAGTTTCCCTCGTAGGCCTACTAATGTACCGATCCCACCTAATATCCTCACT
 CCTATGCCTAGAAGGGATAATACTGTCACTATTTCGTCATAGCAACCATAGTAGTTCTAAATACCCATTTACACTAGCCA
 GCATAATACCCATTATTTTACTAGTATTTGCTGCTTGCGAACGAGCATTAGGACTATCCTTACTAGTCATAGTCTCCAAC
 ACTTATGGAGTGGACCACGTACAAAACCTCAACCTCCTCCAATGCTAAAAATCATCATCCCTACAATCATACTTATACCC
 CTCACATGACTATCAAAAAAGAACATAATCTGAATTAACACCACAACCTACAGCCTATTAATCAGCCTTATCAGCTTATC
 CCTCCTAAACCAGCCTAACACAATAGCCTAACTTCTCACTAATATTCTTCTCTGACCCTCTATCAGCTCCACTACTAG
 TACTAACACATGGCTACTTCCATTAATACTCATAGCCAGCCAGCACCACTATCCAAGAACCCTAATCCGAAAAAAA

CTCTACATCACCATGCTAGCCATACTTCAAACCTTTCCTAATCATAACCTTTACCGCCACAGAACTAATCTCCTTCTATAT
 CCTATTTGAAGCCACATTAGTTCCAACACTAATTATCATCACCCGCTGAGGTAACCAAACAGAACGCCTAAACGCAGGCC
 TCTACTTTTCTATTCTACACGCTAGTAGGCTCCCTCCCACTCTTAGTCGCACTAATCTCTATCCAAAACCTAACAGGCTCA
 CTAAATTTCTACTAATTCAATACTGAAACCAAGCACTACCCGACTCTTGATCTAATATCTTCTTATGATTAGCATGTAT
 AATAGCGTTTATAGTTAAATGCCCCATACGGCCTTCGCCTCTGACTTCCGAAAGCCCATGTAGAAGCCCCAATCGCTG
 GGTCCATAGTGCTAGCAGCCATCCTACTAAACTAGGGGGCTACGGAATACTGCGAATTACAATAATGCTAAACCCCCAG
 ACTAATTTTATAGCCTACCCCTTCCTCATACTATCTCTATGAGGAATAATCATAACTAGCTCCATCTGCTTACGACAAAC
 TGATCTAAAATCACTCATTGCATACTCCTCTGTCAGCCATATAGCCCTAGTAATTGTAGCCGTCCTTATCCAAACACCAT
 GAAGCTATATAGGGGCCACAGCCCTAATAATTGCCCACGGTCTTACGTCATCAATACTATTTTGCCTAGCAAACCTCAAAT
 TATGAACGCACTCATAGCCGAACCATAATCCTAGCCCGCGACTTCAAACCTCTCCTTCCCCTCATAGCAGCTTGATGACT
 ATTAGCCAGCCTAACCAACCTGGCCCTCCCTCCCAGCATTAACTAATCGGAGAACTATTTCGTAGTAATATCATCATTCT
 CATGGTCAAATATCACTATCATCCTCATAGGGGCCAACATCACCATCACCGCTCTCTACTCCCTCTACATACTAATTACT
 ACACAACGAGGAAAATACACACACCATATCAACAGCATCAAACCCCTCATTTACACGAGAAAACGCACTCATAGCCCTCCA
 CATGACTCCCCTACTACTCCTATCACTTAACCCCAAAATCATCCTAGGCTTTACGTACTGTAAATATAGTTTAAACAAAA
 CGCTAGATTGTGGATCTAGAAACAGAACTCAATATTTCTTATTTACCGAGAAAGTATGCAAGAACTGCTAATTCATGCT
 TCCGCGTCTGACAAACACGGCTCTCTCAAACTTTTAAAGGATAGGAGCTATCCGTTGGTCTTAGGAGCCAAAAAATTGGT
 GCAACTCCAAGTAAAGTAATTAACATATTCTCCTCCCTCATGCTAGCCTCATTATCAGTATTAACCTCTACCAATCATAT
 CATCAATCCTCAACACCCACAAAAACAGCACGTATCCTCATCACGTAAAAAACATCATTTTCATATGCCTTCATTACCAGC
 CTAATTCCTACCATAATATTTTATTCACTCTGGACAAGAAACAATCATCTCAAACCTGACACTGAATGACCATTCAAACCCCT
 CAACTATCCCCTAAGCTTCAAACCTAGACTACTTCTCAATGATCTTTGTACCAGTAGCCCTATTTCGTAACATGATCTATCA
 TAGAATTCTCCCTATGATATATACACTCAGATCCTTACATTACTCGATTTTTTAAATACCTACTCACATTCTCTTATTACC
 ATAATAATCCTAGTCACAGCCAACAACCTCTTCCAACCTGTTTCATCGGATGAGAAGGAGTAGGCATCATATCATTCTACT
 AATCGGATGATGATATGGTGAACAGATGCCAACACTGCAGCCCTCCAAGCAATTCTATACAACCGCATCGGAGACATTG
 GTTTCATCATAGCCATAGCCTGATTCTTATTCAACACCAACACATGAGACCTACAACAAATCTTCATACTTGACCCTAAC
 CTCACCAACCTCCCCTCTTAGGTCTCCTACTAGCTGCAACTGGCAAGTCTGCCCAATTTCGGACTTCACCCATGACTTCC
 CTCGGCCATAGAAGGTCCACACAGTCTCAGCCCTACTTCACTCCAGCACAAATAGTTGTAGCAGGCGTTTTTCTACTAA
 TCCGCTTCCATCCACTAATAGAAAACAACAAAACCATCCAATCACTTACCCTATGCCTGGGGGCTATCACCACACTATTC
 ACAGCAATCTGTGCACTCACCCAAAACGACATCAAAAAAATCATCGCCTTCTCCACCTCCAGCCAACTAGGCTTAATAAT
 TGTAAACCATCGGTATTAATCAACCCCTATCTAGCATTTCTCCACATCTGCACCCACGCATTCTTCAAAGCCATATTATTCA
 TATGCTCTGGATCCATTATCCACAGCCTAAATGACGAGCAGGACATCCGAAAAACAGGCGGACTGTTTAAATGCGATACCC
 TTCACCACCACATCCCTAATTATCGGCAGTCTCGCACTCACCGGCATACCCTTCCTTACAGGCTTTTACTCCAAAGACCT
 CATCATCGAACTGCCAACACATCGTACACCAACGCCTGAGCCCTACTAATAACTCTCATCGCCACATCCCTCACAGCTG
 TCTACAGCACCCGAATTATCTTCTTCGCACTCCTGGGACAACCCCGCTTCCTCCCTCTAACCAATCAACGAAAAACAAC
 CCCTTTCTAATTAACCTCATTAAACGCCTCCTAATTGGCAGCATTTTTCGCCGGATTCTTCATCTCTAACAATATCTACCC
 TACAACCATCCCAGAAATAACCATGCCATCTACATGAACTTACCGCCCTCACGGTAACCATCCTAGGATTACACTGG
 CCCTAGAACTAAGCCTAATCACACACAACCTAAAACCTAGAACACCCACCAACATATTTAAATTCTCCAACCTCCTAGGA
 TATTACCCAACAATTATACATCGACTCCCACTCGCAAACCTATCAATAAGCCAAAAATCAGCATCACTTCTACTAGA
 CTCAATCTGACTAGAGAATCCTACCAAAATCCATCTCCCAATTTCAAATAAAGACCTCAATCCTAATTTCCACCCAAA
 AAGGCCAAATCAAATTATATTTCTCTCATTTCCTCATTACCCTCACCTGAGCATACTACTTTTTAATCTCCACGAGTAA
 CCTCTAAAATTACCAAGACCCCAACAAGCAACGACCAACAGTCACAACCACAACCCAAGCCCCATAACTATACAATGCA
 GCAACCCCTATAATCTCCTCACTAAACACTCCCGAATTTCCAATATCATAGATAGCTCAATGCCCCACACTACTAAATTT
 AAACACCACCCCACTTTCCTCACTCTTACAGGACATATAAAACCAACATAACCTCCATCAATAACCCCAAAAGAAACACTC
 CCATAACAGTCGATTAGACACCCATACCTCAGGATACTGCTCAGTAGCTATAGCCGTTGTATAACCAAAAAACAACCAAC
 ATTCTCCCAAATAAATTAAAAACACCATCAACCCCTAAAAAGGACCTCCAAAATTCATAATAATACCACAACCAACTCC
 TCCACTTACAATCAACACTAAGCCCCGTAAATAGGTGAAGGTTTTGAAGAAAAACCTACAAAACCAATAACAAAGATAA
 CGCTCAAAATAAACACAATATATGTCATCATTATTCCCACGTGGAATCTAACACGACTAATGACATGAAAAATCATCGT

TGTATTTCAACTATAAGAACACTAATGACAAACATCCGAAAATCCCACCCGCTAATTAAAATCATCAATCACTCTTTTAT
 CGACCTGCCAACCCCTCAAACATTTTCATCATGATGAACTTTGGCTCCCTCCTAGGAATCTGCCTAATCCTCCAAATCC
 TAACAGGCCTATTTCCTAGCCATACACTACACATCAGACACTACAACCTGCTTCTCATCCGTACCCATATCTGCCGAGAC
 GTTAACTACGGATGAATCATTGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCCATATTTTTTCATCTGCCTCTTTATCCACGTAGG
 GCGCGGCCTCTACTATGGCTCCTACACATTCCCTAGAAACATGAAACATTGGAATTATCCTACTTTTTCACAGTAATAGCCA
 CAGCATTTCATAGGCTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGAGCAACGGTCATTACAAACCTCCTATCAGCA
 ATCCCTACATCGGTACTACGCTCGTCGAATGAATCTGAGGTGGATTCTCAGTAGACAAAGCCACCCTTACCCGATTTTT
 TGCCTTCCACTTTTATTCTACCCTTTATCATCACAGCCCTGGTAATCGTCCATCTACTATTCTCCACGAAACAGGATCCA
 ACAACCCCTCAGGAATCCCATCTGACATAGACAAAATCCCATTCCACCCGTAACACAATTAAAGACATCCTAGGACTT
 CTCTCCTAGTCTTACTCTACTAACCCTAGTATTATTCTCCCCTGACCTCCTAGGAGACCCAGACAACCTACACCCAGC
 TAACCCCTCAGCACTCCCCCTCATATTAAGCCAGAATGGTATTTCTTATTGCTTACGCCATCCTACGCTCCATTCCCA
 ACAAACTAGGTGGTGTATTAGCCCTTATCCTTTCCATCTTAATCCTAGCACTCATCCCTACCCTACACATGTCAAAACAA
 CGAAGCATAATGTTCCGACCCCTTAGTCAATGCGTGTCTGACTCTTAGTAGCAGACTTACTAACACTAACATGAATTGG
 TGGCCAACCAGTAGAACACCCATACGTAATCATCGGCCAACTGGCCTCAATCCTCTACTTCTCCCTAATTCTCATCTTCA
 TACCACTCGCAAGCACCATCGAAAACAACCTTCTAAAGTGAAGAGTCCCTGTAGTATATCACACATTACCCTGGTCTTGT
 AAACCAGAAAAGGGGAAACATTCCCCCAAGGACTATCAAGGAAGAAGCTCTAGCTCCACCATCAACACCCAAAGCTGA
 AATTCTACTTAACTATTCCCTTGATTTCCTCCCCTAAACGACAGCAATTCATCCTCATGTGCTATGTCAGTATTAAATA
 CACCCCGCACAAACACCATATCAGCTCAACATACAATACTCTATTAATACCCTATGTACATCGTGCATTAAATTGTTTAC
 CCCATGAATAATAAGCATGTACATAATATTATTTATCTTACATGAGTACATCATATTATTGATCGTACATACCCCATCCA
 AGTCAAATCATTTCCAGCCAACACGCATATCACACCCATATTCCACGAGCTTAATCACCAAGCCGCGGGAAATCAGCAA
 TCCCTCCAATTACGTGTCCCAATCCTCGCTCCGGGCCATCTAAACGTGGGGGTTTCTACGGTGAAACTATACCTGGCAT
 CTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATTCCCACCCAACCTCGCCCATTTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGA
 CTAATCAGCCCATGCTCACACATAACTGTGGTTTTCATGCATTTGGTATCTTTTTATATTTGGGGATGCTGTGACTCAGCT
 ATGGCCGTCAAAGGCCCGACGCAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTACTCCGCATCAGCAACC
 ATAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAACAGGACATAAAGAACATGCACACCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACA
 CCCATGCGCGCACACACCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACACCCATGCG
 CGCACACACCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACACCCATGCGCGCACACA
 CCCACACACCCATGCGCGCACACACCCACACACCCACACACCCACACACCGTTAAGCAAGTAATGTAACCTTTC
 TTAGTCAAACCCCCCCCCACCCCATTAACCTCCGCAGATGTACATTTAACACAATCTTGCCAAACCCGAAAACAAGAC
 TAAACAATGCACAACACTTCACGAAGCCTAACTCTCACACACAACTACGTAACTCTACGCACTTGACAAGCCCAACA
 GAACTTCCCTCCCTCCTCTTAATACCAACATGCTACTTTAATCAATAAAATTTCCATAGACAGGTATCCCCCTAGATCTG
 ATTTCCCAAACCTACAAATCCTCTTCCCCA

mtDNAD-Loop region

Forward primer

Reverse primer

***Equus caballus* complete mitochondrial genome**

Gen Bank reference: NC001640.1

GTTAATGTAGCTTAATAATATAAAGCAAGGCACTGAAAATGCCTAGATGAGTATTCTTACTCCATAAACACATAGGCTTG
 GTCCTAGCCTTTTTATTAGTTATTAATAGAATTACACATGCAAGTATCCGCACCCCAGTGAGAATGCCCTCTAAATCACG
 TCTCTACGATTAAAAGGAGCAGGTATCAAGCACACTAGAAAGTAGCTCATAACACCTTGCTCAGCCACACCCCCACGGGA
 CACAGCAGTGATAAAAATTAAGCTATGAACGAAAGTTGACTAAGTCATATTAATAAGGGTTGGTAAATTTTCGTGCCAG
 CCACCGCGGTCTACGATTAACCCAAATTAATAAATCTCCGGCGTAAAGCGTGTCAAAGACTAATACCAAATAAAGTTA
 AAACCCAGTTAAGCCGTAAAAAGCTACAACCAAAGTAAATAGACTACGAAAGTGACTTTAATACCTCTGACTACACGAT
 AGCTAAGACCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAACTAAAATAGCTTACCACAACAAAGCTATTTCG
 CCAGAGTACTACTAGCAACAGCCTAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTACATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCCATAA
 TCGATAAACCCCGATAAACCCCAACATCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTAAACAAGGT
 ACCGAAGTAAGCACAAATATCCAACATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATT
 TTCTACCCTAAGAACAAGAAGCTTTAACCCGGACGAAAGTCTCCATGAAACTGGAGACTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAAT
 TAAGAATAGAGAGCTTAATTGAATCAGGCCATGAAGCGCGCACACACCGCCCGTACCCTCCTTAAATATCACAAATCAT
 AACATAACATAAAACCGTGACCCAAACATATGAAAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGTATACCGGAAGGTGTACTTGG
 ATAACCAAAGTGTAGCTTAAACAAAGCATCCAGCTTACACCTAGAAGATTTCACTCAAATGAACACTTTGAACTAAAGC
 TAGCCCAAACAATACCTAATTCAATTACCCTTAGTCACTTAACTAAAACATTACCAAACCATTAAGTATAGGAGATAG
 AAATTTTAACTTGGCGCTATAGAGAAAGTACCGTAAGGGAACGATGAAAGATGCATTAAAAGTACTAAACAGCAAAGCTT
 ACCCCTTTTACCTTTTGCATAATGATTTAACTAGAATAAACTTAGCAAAGAGAACTTAAGCTAAGCACCCCGAAACCAGA
 CGAGCTACCTATGAACAGTTACAAATGAACCAACTCATCTATGTCGCAAATAGTGAGAAGATTTCGTAGGTAGAGGTGAA
 AAGCCCAACGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAGAAACAGAATTTCAAGTTCAAATTTAAATTTACCTAAAACTACTCA
 ATTCTAATGTAAATTTAAATTATAGTCTAAAAAGGTACAGCTTTTATAGATACAGGTTACAACCTTCATTAGAGAGTAAGA
 ACAAGATAAACCCATAGTTGGCTTAAAGCAGCCATCAATTAAGAAAGCGTTCAAGCTCAACGACACATCTATCTTAATC
 CCAACAATCAACCCAACTAACTCCTAATCTCATACTGGACTATTCTATCAACACATAGAAGCAATAATGTTAATATGAG
 TAACAAGAATTATTTCTCCTTGATAAGCTTATATCAGAACGAATACTCACTGATAGTTAACAACAAGATAGGGATAATC
 CAAAACTAATCATCTATTTAAACCATGTTAACCCAACACAGGCATGCATCTATAAGGAAAGATTAAGAAGAAGTAAAG
 GAACTCGGCAAACACAAACCCCGCCTGTTTACCAAACATCACCTCTAGCATTTCCAGTATTAGAGGCACTGCCTGCCC
 AGTGACATCTGTTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCCCTAAATAGGGACTTGT
 ATGAATGGCCACACGAGGGTTTTACTGTCTCTTACTTCCAATCAGTGAAATTGACCTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATGAC
 TAAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAAGTATTACAAAAACAACACACAAACCTTAACCTTCAGGGAC
 AACAAAACCTTTTGATTGAATCAGCAATTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAAAACAACCTCCGAGTGATTTAAATCCA
 GACTAACCAGTCAAAATATATAATCACTTATTGATCCAAACATTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCG
 CAATCCTATTCCAGAGTCCATATCGACAATTAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAACCG
 CTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTACAGCCGGAGTAATCCAGGTTCGGTTTCTAT
 CTATTCTATACTTTTCCAGTACGAAAGGACAAGAAAAGTAGGGCCCACTTTACAAGAAGCGCCCTCAAACCTAATAGATG
 ACATAATCTAAATCTAACTAATTTATAACTTCTACCGCCCTAGAACAGGGCTCGTTAGGGTGGCAGAGCCCGAAATTGC
 ATAAAACTTAAACCTTTACACTCAGAGGTTCAACTCCTCTCCCTAACAAACATGTTTATAATTAACGTCCTCCTCCTAATT
 GTCCCAATCTTGCTCGCCGTAGCATTCCTCACACTAGTTGAACGAAAAGTCTTAGGCTATATGCAACTTCGCAAAGGACC
 CAACATCGTAGGCCCTATGGCCTACTACAACCTATTGCCGATGCCCTCAAACCTATTTATCAAAGAGCCACTACAACCAC
 TAACATCATCGACATCCATATTCATCATCGCACCAATCCTAGCCCTAACCTGGCCTTAACCATATGAATCCCTCTGCCC
 ATACCATACCCACTAATCAACATAAACCTAGGAATTCTATTCTACTAGCCATGTCCAGCCTAGCTGTCTACTCAATCCT
 TTGATCAGGATGGGCCTCAAACCTCAAATAACGCCCTAATTGGAGCTCTACGAGCAGTAGCACAAACCATCTCATACGAAG
 TAACTCTAGCAATCATCTACTCTCAGTCTCCTAATAAGCGGATCATTACATTATCAACACTTATTATTACCCAAGAA
 TACCTCTGATTAATCTTCCCATCATGACCCTTAGCCATAATGTGATTCTCAACATTAGCCGAAACCAACCGAGCTCC

ATTTGACCTAACAGAAGGAGAATCAGAACTCGTCTCTGGATTCAACGTTGAATACGCAGCCGGGCCATTTGCTCTATTCT
 TCCTAGCAGAATACGCAAACATCATCATGATAAACATCTTCACAACAACCCTATTTCTAGGAGCATTTCACAACCCCTAC
 CTGCCAGAACTCTACTCAATTAATTTACCATTAAAGCTCTCCTTCTAACATGTTTCTTCTATGAATCCGAGCATCCTA
 CCCACGATTCCGATATGACCAACTTATACACCTCCTATGAAAGAACTTCTTACCCTCACACTAGCCCTCTGCATATGAC
 ACGTCTCACTTCCAATCATACTATCCAGCATCCCACCACAAACATAGGAAATATGTCTGACAAAAGAGTTACTTTGATAG
 AGTAAACATAGAGGCTCAAACCCTCTTATTTCTAGAACTACAGGAATTGAACCTGCTCCTGAGAATTCAAAATCCTCCG
 TGCTACCGAATTACACCATGTCTTACAAGTAAGGTGAGCTAAATAAGCTATCGGGGCCATACCCCGAAAATGTTGGATTA
 CACCCCTCCCGTACTAATAAATCCCTTATCTTCACAACCTATTCTAATAACAGTTCTTCTAGGAACTATAATCGTTATAA
 TAAGCTCACACTGACTAATAATCTGAATCGGATTTGAAATAAATCTACTAGCCATTATCCCTATCCTAATAAAAAAGTAC
 AATCCCCGAACCATAGAAGCCTCCACCAAATATTTTCTAACCCAAGCCACCGCATCAATACTCCTCATAATAGCGATCAT
 CATTAACTCATACTCAGGCCAATGAACAATCACAAAAGTCTTCAACCCACAGCGTCCATCATTATAACTTCAGCTC
 TCGCCATAAACTTGGACTCACACCATTCCTTCTGAGTACCCGAAGTCACACAGGGCATCTCATTAAACATCAGGTCTC
 ATCCTACTTACATGACAAAACCTAGCCCCAATATCAATCCTATATCAAATCTCACCTCAATTAACCTAAATATCTTATT
 AACTATAGCCGTACTGTCAATCCTAGTAGGAGGCTGAGGCGGTCTCAACCAAACCAACTACGAAAAATCATAGCATACT
 CGTCAATCGCGCATATAGGATGAATAACAGCTGTCTAGTATATAACCCAACACTAACATACTAAACATATTAATTTAC
 ATTATAATAACACTCACAATATTCATACTATTTATCCACAGCTCCTCTACTACAACACTATCACTCTCCCACACATGAAA
 CAAAATACCTCTAACCACTACACTAATCTTAATTACCTTACTATCCATAGGAGGCTCCCCCACTATCAGGATTTCATAC
 CCAAATGAATAATCATTCAAGAGCTCACCAAAAATAGCAGCATCATCTCCCCACACTAATAGCCATTATAGCACTACTC
 AACCTCTACTTCTACATACGACTAACCTATTCCACCTCACTGACCATATTCCCATCCACAAACAACATAAAAAATAAATG
 ACAATTTCGAAACCAAACGAATTACTCTCTTACCCCGTTAATTGTTATATCTCCTACTCTCTCCCCCTAACCCCATAC
 TATCAATTTTGGACTAGGAATTTAGGTTAACATCCCAGACCAAGAGCCTTCAAAGCTCTAAGCAAGTGAATCCACTTAAT
 TCCTGCATACTAAGGACTGCGGAGACTCTATCTCACATCAATTGAACGCAAATCAAACCTCTTTTATTAAGCTAAGCCCTTA
 CTAGATTGGTGGGCTACCATCCACGAAATTTTAGTTAACAGCTAAATACCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCC
 CGCCGCCTAGAAAAAAGCGGGGAGAAGCCCCGGCAGAAATTGAAGCTGCTCCTTTGAATTTGCAATTCAATGTGAAAAT
 TCACCACGGGACTTGATAAGAAGAGGATTCCAACCCCTGTCTTTAGATTTACAGTCTAATGCTTACTCAGCCATCTTACC
 TATGTTTCATCAACCGCTGACTATTTTCAACTAACCAAAAGACATCGGCACCTCTGTACCTCCTATTTCGGCGCTTGAGCTG
 GAATAGTAGGAAGTGCCTAAGCCTCCTAATCCGTGCTGAATTAGGCCAACCTGGGACCCTACTAGGAGATGATCAGATC
 TACAATGTCATTGTAACCGCCCATGCATTTCGTAATAATTTCTTTATGGTCATACCCATTATAATCGGAGGATTTCGGAAA
 CTGATTAGTCCCCCTGATAATTGGAGCACCTGATATAGCTTTCCCCCGAATAAACAACATAAGCTTCTGATTACTTCCCC
 CATCATCTCTACTTCTTCTCGCTTCTCAATAATTGAAGCAGGTGCCGAACAGGCTGAACCGTATATCTCCTCTAGCT
 GGAAATCTGGCGCATGCAGGAGCCTCTGTTGACTTAACCATTTTCTCTCTCCACCTAGCTGGGGTGTCTCTGATTTTAGG
 TGCCATCAACTTTATTACCACAATCATTAAACATAAAACCACCAGCCCTATCCCAATATCAAACCCCCCTATTTCGTTTGAT
 CTGTCTTATTACGGCAGTACTCCTTCTCCTAGCCCTCCCGGTCTTAGCAGCAGGCATTACCATGCTTCTCACAGACCGT
 AACCTGAACACTACTTTCTTCGACCCCGCAGGAGGAGGGGATCCAATCCTTTATCAACACCTATTCTGATTCTTCGGACA
 CCCCAGAGTCTATATTCTTATCCTACCAGGCTTCGGTATAATCTCACACATCGTCACATACTACTCAGGTAAAAAGGAAC
 CTTTTGGCTACATGGGTATAGTGTGAGCTATAATATCCATTGGCTTTCTAGGCTTCATCGTATGGGCTCACACATGTTT
 ACAGTAGGGATAGACGTTGACACACGAGCATACTTCACATCAGCTACCATAATCATCGCTATCCCTACTGGTGTAAGG
 ATTCAGCTGACTAGCCACCCTGCACGGAGGAAATATCAAATGATCTCCAGCTATACTCTGAGCTCTAGGCTTCATCTTCT
 TATTCACAGTAGGAGGTCTAACAGGAATCGTCCTAGCTAACTCATCCCTAGATATTGTTCTCCACGATACTTATTATGTA
 GTAGCACATTTCCATTATGTCTGTCTATAGGAGCAGTCTTCGCCATTATGGGGGATTTGTACACTGATTCCCTCTATT
 CTCAGGATACACACTCAACCAAACCTGAGCAAAAATCCACTTTACAATTATATTTCGTAGGGGTAAATATAACCTTCTTCC
 CACAACATTTCTTGGCCTCTCAGGAATGCCACGACGCTATTCTGATTATCCAGACGCATATACAACATGAAATACCATC
 TCATCCATAGGATCTTTTATCTCACTTACAGCAGTGATACTAATAATTTTTCATAATTTGAGAAGCGTTCGCATCCAAACG
 AGAAGTGTCTACAGTAGAATTAACCTCAACTAATCTGGAATGACTACACGGATGCCCCCACCATAACACACATTTGAAG
 AACCCACCTACGTAAACCTAAAATAAGAAAGGAAGGAATCGAACCCCTCTAACTGGTTTCAAGCCAATATCATAACCAC
 TATGTCTTTCTCCATCAATTGAGGTATTAGTAAAAATTACATGACTTTGTCAAAGTTAAATTATAGGTTAAACCCCTATA

TACCTCTATGGCCTACCCCTTCCAAC TAGGATTCCAAGACGCAACATCCCCTATTATAGAAGAACTCCTACACTTCCACG
ACCACACACTAATAATCGTATTCCTAATTAGCTCTCTAGTATTATATATTATCTCATCAATACTAACAAC TAAATTAACC
CATAACCAGCACCATAGATGCTCAAGAAGTAGAGACAATTTGAACGATTTTACCAGCCATCATCCTTATTCTAATCGCCCT
CCCATCCCTACGAATTCTATATATAATAGATGAAATCAATAATCCGTCCCTCACAGTCAAAACAATAGGCCACCAATGAT
ACTGAAGCTACGAGTATACCGATTACGAAGACTTGACCTTTGACTCCTACATGATCCCCACATCAGACCTAAAACCAGGA
GAATTACGTCTTCTAGAAGTCGACAATCGAGTGGTTCTCCCCATAGAAATAACCATCCGAATGCTAATTTTCATCCGAAGA
CGTCCTACACTCATGAGCTGTGCCCTCCCTAGGCCTAAAAACAGACGCTATCCCTGGGCGCCTAAATCAGACAAC TCTCG
TGGCCTCTCGACCAGGACTTTACTACGGTCAATGCTCAGAGATCTGCGGATCAAACCACAGCTTTATACCAATTGTCCTT
GAACTAGTTCCTGAAACACTTCGAAGAATGATCTGCATCAATATTATAAAGTCACTAAGAAGCTATTATAGCATTAAC
CTTTTAAAGTTAAAGATTGAGGGTTCAACCCCTCCCTAGTGATATGCCACAGTTGGATACATCAACATGATTTATTAATA
TCGTCTCAATAATCCTAACTCTATTTATTGTATTTCAACTAAAAATCTCAAAGCACTCCTATCCGACACACCCAGAAGTA
AAGACAACCAAATAACAAAACACTCTGCCCTTGAGAATCAAATGAACGAAAATCTATTTCGCCTCTTTTCGCTACCCCA
ACAATAGTAGGCCTCCCTATTGTAATTCTGATCATCATATTTCCAGCATCCTATTCCCTCACCCAACCGACTAATCAA
CAATCGCCTAATCTCAATTCAACAATGGCTAGTCCAAC TTACATCAAAACAATAATAGCTATCCATAACAGCAAAGGAC
AAACCTGAACTCTTATACTCATATCACTGATCCTATT CATTGGCTCAACAACTTATTAGGCCTACTACCTCACTCATTT
ACACCAACAACACAAC TATCAATAAACCTAGGCATAGCTATTTCCCTATGGGCAGGGACAGTATTCATAGGCTTTTCGTCA
CAAAACAAAAGCAGCCCTAGCCACTTTCTACCTCAAGGGACGCCATTTTCTCATCCCCATACTAGTAATTATCGAGA
CTATCAGCCTATTTATTCAACCTGTAGCCCTAGCCGTGCGGCTAACCGCTAACATTACCGCCGGACACCTCCTAATACAC
CTCATCGGAGGGGCAACACTAGCCCTCATAAGCATCAGCCCTCAACAGCCCTTATTACGTTTATCATCCTAATTCTACT
AACTATCCTCGAATTGCGAGTAGCTATAATCCAAGCCTACGTATTCACTCTCCTGGTAAGCCTTTACTTACACGACAACA
CCTAATGACCCACCAAACCCACGCTTACCACATAGTAAACCCAGCCCATGACCACTTACAGGAGCCCTATCAGCCCTCC
TGATAACATCAGGACTAGCCATGTGATTTCACTTTAACTCAACCTTACTTCTAGCTATAGGGCTATTAAC TAACATCCTT
ACCATATATCAATGATGACGAGACATCATCCGAGAAAGCACATTCCAAGGCCATCACACATCAATCGTTCAAAAGGGACT
CCGATATGGCATAATCCTTTTTTATTATCTCAGAAGTCTTCTTCTTCTCTGGCTTCTTCTGAGCCTTTTACC ACTCAAGCC
TAGCCCCCACACCCGAAC TAGGCGGTGCTGACCACCCACAGGTATCCACCCCTTAAACCCCTAGAAAGTCCCTTACTC
AACACCTCAGTGCTCCTAGCATCTGGAGTCTCTATCACCTGAGCCCACCATAGCCTAATAGAAGGAAACCGTAAAAATAT
GCTCCAAGGCCTATTTCATCACAATTTCACTAGGCGTATACTTCAACCTTCTCCAAGCCTCAGAATACTATGAAGCCTCAT
TTACTATTTTCAGATGGAGTATACGGATCAACATTTTTTCGTAGCAACAGGGTTCCACGGACTACACGTAATTATCGGATCT
ACCTTCCTCATTGTATGTTTCTACGCCAACTAAAATTCCACTTTACATCCAGCCACCACTTCGGATTTCGAAGCAGCCGC
TTGATACTGACACTTCGTGACGTAGTCTGACTATTCTTGACGTCTCTATTTATTGATGAGGATCCTATTCTTTTAGTA
TTGACCAGTACAATTGACTTCCAATCAATCAGCTTCGGTATAACCCGAAAAAGAATAATAAACCTCATACTGACACTCCT
CACTAACACATTACTAGCCTCGCTACTCGTACTCATCGATTCTGACTACCACAAC TAAACATCTATGCAGAAAAAACCA
GCCCATATGAATGCGGATTTGACCCTATAGGGTCAGCACGCCTCCCCTTCTCAATAAAAATTTTTCTTAGTGGCCATTACA
TTTCTGCTATTTCGACTTAGAAATTGCCCTCCTATTACCCCTTCCATGAGCATCCCAAACAAC TAACCTAAACACTATACT
TATCATAGCACTAGTCCTAATCTCTTCTAGCCATCAGCCTAGCCTACGAATGAACCCAAAAAGGACTAGAATGAACTG
AGTATGGTAATTAGTTTAAACCAAAACAAATGATTTGACTCATTAACTATGATTAACCTTATAATTACCAACATGTCA
CTAGTCCATATTAATATCTTCCCTAGCATTACAGTATCCCTCGTAGGCCTACTAATGTACCGATCCACCTAATATCCTC
ACTCCTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCACTATTTCGTATAGCAACCATAATAGTCCTAAACACCCACTTCACACTAG
CTAGTATAATACCTATCATCTTACTAGTATTTGCTGCCTGCGAACGAGCTCTAGGATTATCCCTACTAGTCATAGTCTCC
AATACTTATGGAGTAGACCACGTACAAAACCTTAACCTCCTCCAATGCTAAAAATTATCATTTCCACAATCATACTTATG
CCCCTTACATGACTATCAAAAAAGAATATAATCTGAATCAACACTACAACCTATAGTCTATTAATCAGCCTTATCAGCCT
ATCCCTCCTAAACCAACCTAGCAACAATAGCCTAAACTTCTCACTAATATTCTTCTCCGATCCCCTATCAGCCCCACTTC
TGGTGTTGACAACATGACTACTGCCACTAATACTCATAGCCAGCCAACACCATCTATCTAAGGAACCACTAATCCGAAAA
AAACTCTACATCACCATGCTAACCATACTTCAAAC TTTCCTAATCATGACTTTTACCGCCACAGAAC TAATCTCCTTCTA
CATCCTATTTGAAGCCACATTAGTTCCAACACTAATTATCATCACCCGCTGAGGCAACCAAACAGAACGCCTGAACGCAG
GCCTCTACTTCCTATTCTACACACTAATAGGTTCCCTCCCCTCTTAGTTGCACTAATCTCTATCCAAAACCTAACAGGC

TCACTAAACTTCCTATTAATTCAATACTGAAACCAAGCACTACCCGACTCTTGATCCAATATTTTCCTATGACTAGCATG
 TATAATAGCATTTCATAGTCAAAATACCGGTATATGGTCTTCACCTCTGACTCCCAAAAGCCCATGTAGAAGCCCCAATTG
 CCGGATCCATAGTGCTAGCAGCCATTCTACTAAAAGTAGGAGGCTACGGAATACTACGAATTACAACAATACTAAACCCC
 CAACTAGCTTTATAGCCTACCCCTTCCTCATACTATCCCTGTGAGGAATAATCATAACTAGTTCCATCTGCTTGCGACA
 AACCGATCTAAAATCACTTATTGCATACTCCTCTGTGAGCCACATAGCCCTAGTAATCGTAGCCGCTCCTCATCCAAACAC
 CATGAAGTTATATAGGAGCTACAGCCCTAATAATCGCTCACGGCCTTACATCATCAATACTATTCTGCCTGGCAAACCTCA
 AATTACGAACGTACCCATAGCCGAACATAATCCTAGCCCGCGGGCTTCAAACACTTCTTCCCCTTATAGCAGCCTGATG
 ACTATTAGCCAGCCTAACCAACCTGGCCCTCCCTCCCAGCATTAACTAATTGGAGAGCTATTTCGTAGTAATATCATCAT
 TCTCATGATCAAATATTACCATTATCCTAATAGGAGCCAATATCACCATCACCGCCCTCTACTCCCTATACATACTAATC
 ACAACACAACGAGGGAAATACACACACCATATCAACAGCATTAACTTTCATTTACACGAGAAAACGCACTCATGGCCCT
 CCACATGACTCCCCTACTACTCCTATCACTTAACCCTAAAATTATCCTAGGCTTTACGTACTGTAAATATAGTTTAAACAA
 AAACACTAGATTGTGGATCTAGAAACAGAACTTAATATTTCTTATTTACCGAGAAAGTATGCAAGAAGTGTAAATTCAT
 GCCCCCATGTCCAACAAACATGGCTCTCTCAAACCTTTTAAAGGATAGGAGCTATCCGTTGGTCTTAGGAACCAAAAAATT
 GGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATCAACATGTTCTCCTCCCTCATACTAGTTTCACTATTAGTACTAACCCTCCCAATCA
 TATTATCAATCTTCAATACCTACAAAAACAGCAGTTCCCGCATCATGTAAAAACACTATCTCATATGCCTTCATTACT
 AGCCTAATTCCCCTATAATATTTTACTCTGGACAAGAAACAATTATCTCAAACCTGACACTGAATAACCATAACAAAC
 CCTCAAACCTATCCCTAAGCTTCAAACCTAGATTACTTCTCAATAATTTTCGTACCAGTAGCCCTATTTCGTAACATGATCTA
 TTATGGAATTCTCCCTATGATACATGCACTCAGATCCTTACATTACTCGATTTTTTAAATACTTACTTACATTCCCTCATC
 ACTATAATAATTCTAGTCACAGCTAACAACCTTTTCCAACCTGTTTCATCGGATGGGAGGGAGTAGGCATCATGTCATTCTT
 ACTAATCGGATGATGATACGGCCGAACAGATGCCAACACCGCGGCCCTTCAAGCAATCCTTTATAACCGCATCGGGGATA
 TCGGCTTCATCATGGCCATAGCCTGATTCTTCAACACCAACACATGAGACCTCCAACAAATCTTCATACTCGACCCC
 AACCTTACCAACCTCCCGCTCCTTAGGCCTCCTCCTAGCCGCAACTGGCAAATCCGCTCAATTTGGACTCCACCCATGACT
 TCCTTCAGCCATAGAGGGCCCTACACCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCCAGCACAAATAGTTGTAGCAGGCGTCTTCCTGC
 TAATCCGCTTCCATCCACTAATAGAAAACAACAAAACAATCCAGTCACTTACCCTATGCCTAGGAGCCATCACCACACTA
 TTCACAGCAATCTGCGCACTCACTCAAACGATATCAAAAAATCATTGCTTTCTCCACCTCCAGCCAACTAGGCCTGAT
 AATCGTAACCATCGGTATCAATCAACCCTACCTAGCATTCTCCACATTTGCACTCACGCATTCTTCAAAGCTATACTAT
 TTATATGTTCCGGATCCATTATCCACAGCCTAAATGACGAGCAAGATATCCGAAAAATAGGCGGACTATTTAATGCAATA
 CCCTTCACCACCACATCTCTAATTATTGGCAGCCTTGCACTCACCGGAATTCCTTTCTCACAGGCTTCTACTCCAAAGA
 CCTCATCATCGAAACCGCCAACACATCGTACACCAACGCCTGAGCCCTACTAATAACTCTCATTGCCACATCCCTCACAG
 CTGTCTACAGTACCCGAATCATCTTCTTTGCACTCCTAGGGCAACCCCGCTTCTCCTCTGACCTCAATCAACGAAAAT
 AACCCCTTTCTAATTAACCTCCATCAAACGCCTCTTAATTGGCAGCATTTTTGCGGATTCTTCATCTCCAACAATATCTA
 CCCCACAACCGTCCCAGAAATAACCATACTTACATAAACTCACCGCCCTCGCAGTAACCATCCTAGGATTTACAC
 TAGCCCTAGAATAAGCTTGATAACCCATAACTTAAACTAGAACACTCCACCAACGTATTCAAATTTCTCAACCTCCTA
 GGATACTACCCAACAATTATACACCGACTCCCACCGCTCGCTAACCTATCAATAAGCCAAAAATCAGCATCACTTCTACT
 AGACTCAATCTGACTAGAAAACATCCTGCCAAAATCTATCTCCAGTTCCAAATAAAAACCTCGATCCTAATTTCCACCC
 AAAAAGGACAAATCAAATTATATTTCTCTCATTCCTCATCACCTTACCCTAAGCATACTACTTTTTAATCTCCACGAG
 TAACCTCTAAAATTACCAAGACCCCAACAAGCAACGATCAACCAGTCACAATACAACCCAAGCCCCATAACTATACAAT
 GCAGCAGCCCCATATAATTTCTCTACTAAACGCCCCAGAATCTCCAGTATCATAAATAGCTCAAGCCCCCACACCACTAAA
 CTAAACACTACCCCACTTCTCTACTCTTCAGAACATATAAAACCAACATAACCTCCATCAACAACCCCTAAAAGAAATA
 CCCCCATAACAGTCGTATTAGACACCCATACCTCAGGATACTGCTCAGTAGCCATAGCCGTTGTATAACCAAAAAACAACC
 AACATTCTCCCAAATAAATCAAAAACACCATCAACCCCAAAAAGGACCCTCCAAAATTCATAATAATACCACAACCTAC
 CCCTCCACTTACAATCAGCACTAAACCCCATAAATAGGTGAAGTTTTGAAGAAAACCCACAAAACCTAACAACAAAAA
 TAACACTCAAAATAAACACAATATATGTCATCATTATTTCCACGTGGAATCTAACCCAGCAATGACATGAAAAATCAT
 CGTTGTATTTCAACTATAAGAACACCAATGACAAACATCCGGAAATCTCACCCACTAATTAAATCATCAATCACTCTTT
 TATTGACCTACCAGCCCCCTCAAACATTTTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCCTAGGAATCTGCCTAATCCTCCAAA
 TCTTAACAGGCCTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACACGACAACCTGCCTTCTCATCCGTCACCTACATCTGCCGA

GACGTTAACTACGGATGAATTATTCGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTATCTGCCTCTTCATTACGT
 AGGACGCGGCCTCTACTACGGCTCTTACACATTCCCTAGAGACATGAAACATTGGAATCATCTACTTTTCACAGTTATAG
 CTACAGCATTTCATGGGCTATGTCTACCATGAGGCCAAATATCCTTTTGAGGAGCAACAGTCATCACGAACCTCCTATCA
 GCAATTCCCTACATCGGTACTACCCTCGTCGAGTGAATCTGAGGTGGATTCTCAGTAGACAAAGCCACCCTTACCCGATT
 TTTTGCTTTCCACTTCATCCTACCCTTCATCATCACAGCCCTGGTAGTCGTACATTTACTATTTCTTCACGAAACAGGAT
 CTAATAACCCCTCAGGAATCCCATCCGATATGGACAAAATCCCATTCACCCATATTATACAATTAAAGACATCCTAGGA
 CTCCTCCTCCTGATCTTGCTCCTACTAACTCTAGTATTATTCTCCCCGACCTCCTAGGAGACCCAGACAACCTACACCCC
 AGCTAACCCCTCTCAGCACTCCCCCTCATATTAAACCAGAATGGTACTTCCTGTTTGCCTACGCCATCCTACGCTCCATTC
 CCAACAACTAGGCGGCGTATTAGCCCTAATCCTCTCCATCCTGATCCTAGCACTCATCCCCACCCTCCACATATCAAAA
 CAACGAAGCATAATATTCCGGCCTCTCAGCCAATGCGTATTCTGACTCTTAGTGGCAGACTTACTGACACTAACATGAAT
 CGGCGGACAGCCAGTGGAACACCCATACGTAATTATCGGCCAACTGGCCTCAATCCTCTACTTCTCCCTAATTCTCATTT
 TTATACCACTCGCAAGCACCATCGAAAACAATCTTCTAAAATGAAGAGTCCCTGTAGTATATCGCACATTACCCTGGTCT
 TGTAACACAGAAAAGGGGGAAAACGTTTCTCCCAAGGACTATCAAGGAAGAAGCTCTAGCTCCACCATCAACACCCAAA
 GCTGAAATTCTACTTAACTATTTCCTTGATTTCTTCCCCTAAACGACAACAATTTACCCTCATGTGCTATGTCAGTATCA
 GATTATACCCCCACATAACACCATAACCCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCTATGTACGTCGTGCATTAAATTG
 TCTGCCCCATGAATAATAAGCATGTACATAATATCATTTATCTTACATAAGTACATTATATTATTGATCGTGCATACCCC
 ATCCAAGTCAAATCATTTCCAGTCAACACGCATATCACAGCCCATGTTCCACGAGCTTAATCACCAAGCCGCGGGAAATC
 AGCAACCCTCCCAACTACGTGTCCCAATCCTCGCTCCGGGCCCATCCAAACGTGGGGGTTTCTACAATGAAACTATACCT
 GGCATCTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATTCCCAACCAACCTCGCCATTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACT
 AATGACTAATCAGCCCATGCTCACACATAACTGTGATTTTCATGCATTTGGTATCTTTTTATATTTGGGGATGCTATGACT
 CAGCTATGGCCGTCAAAGGCCTCGACGCAGTCAATTAAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATCAG
 CAACCATAAGGTGTTATTTCAGTCCATGGTAGCGGGACATAGGAAACAAGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
 GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
 GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
 GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
 CCCCCCTACCCCCATTAAACTCCACATATGTACATTCAACACAATCTTGCCAAACCCAAAAACAAGACTAAACAATG
 CACAATACTTCATGAAGCTTAACCCTCGCATGCCAACCATAATAACTCAACACACCTAACAATCTTAACAGAAGTTTCCC
 CCGCCATTAATAACCAACATGCTACTTTAATCAATAAAATTTCCATAGACAGGCATCCCCCTAGATCTAATTTTCTAAAT
 CTGTCAACCCTTCTCCCCC

mtDNA D-Loop region

Forward primer

Reverse primer