



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Carolina Leite Martins

**Validação de quatro marcadores genéticos sugestivos para displasia do quadril canino
em uma população de raças variadas a partir de amostras de mucosa oral**

Florianópolis

2022

Carolina Leite Martins

**VALIDAÇÃO DE QUATRO MARCADORES GENÉTICOS SUGESTIVOS PARA
DISPLASIA DO QUADRIL CANINO EM UMA POPULAÇÃO DE RAÇAS
VARIADAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Glauber Wagner

Coorientadores: Profa. Dra. Patrícia Hermes Stoco

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Carolina Leite
Validação de quatro marcadores genéticos sugestivos para
displasia do quadril canino em uma população de raças
variadas a partir de amostras de mucosa oral / Carolina
Leite Martins ; orientador, Glauber Wagner, coorientador,
Patrícia Hermes Stoco, 2022.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. . 2. Displasia Coxofemoral. 3. Marcadores genéticos.
4. Genoma canino. I. Wagner, Glauber. II. Stoco, Patrícia
Hermes. III. Toledo e Silva, Guilherme de IV.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em . V. Título.

Carolina Leite Martins

Validação de quatro marcadores genéticos sugestivos para displasia do quadril canino em uma população de raças variadas a partir de amostras de mucosa oral

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Priscila de Oliveira Moraes, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ricardo Ruiz Mazzon, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Glauber Wagner
Orientador

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Glauber Wagner
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmão por todo o suporte e paciência que tiveram comigo. Dedico também aqueles que são a fonte do mais puro e sincero amor: os cães.

AGRADECIMENTOS

À UFSC, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, à agência de fomento CAPES e aos Laboratórios de Protozoologia e Bioinformática, pela infraestrutura, suporte técnico e financeiro. Assim como ao LAMEB e a todos os funcionários do CCB por também contribuírem na execução deste trabalho, seja auxiliando nos experimentos ou proporcionando um ambiente de trabalho limpo e seguro.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Glauber Wagner e Prof.^a Dr.^a Patrícia Hermes Stoco, que confiam em mim desde a época da monitoria de parasito e por terem acreditado na minha capacidade a ponto de me convidarem para iniciar uma pesquisa nova. Agradeço também por todos os ensinamentos e por todo o esforço que tiveram comigo em momentos tão difíceis para vocês. Prof.^a Patrícia obrigada pela bioinformática de WordPad e por ser sempre tão solícita e gentil, saiba que tenho você como meu exemplo profissional e pessoal! Prof. Glauber, obrigada por todo suporte e amparo, desde os momentos *online* até os presenciais, e pela oportunidade de participar de outros projetos de pesquisa. E, ao meu co-orientador, Guilherme de Toledo e Silva, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos professores, Prof.^a Dr.^a Priscila de Oliveira Moraes, Prof.^a Dr.^a Andrea Rita Marrero, Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon e Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, por aceitarem o convite de fazerem parte da defesa deste trabalho, contribuindo ainda mais no resultado final desta pesquisa.

Aos professores do Laboratório de Protozoologia, Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, Prof. Dr. Mario Steindel e Prof.^a Dr.^a Patrícia Flávia Quaresma, pela contribuição na execução deste trabalho através dos ensinamentos nos seminários e no meu crescimento profissional. Aos professores do PPGBTC, por todo o suporte e ensinamento, em especial à Prof.^a Dr.^a Gislaine Fongaro pela oportunidade de participar do curso da ISO 9001 que muito agregará no meu currículo profissional.

À Medica Veterinária Amanda Adriana por ter aceitado participar desta pesquisa. Aos tutores e cães que participaram deste estudo, que foram os elementos chave deste trabalho. Um agradecimento especial às minhas cachorras Kika (*in memorian*), Shiva e Paçoca e às cachorras da Prof.^a Patrícia, Vita, Rayza e Lua, por toda fofura e por serem as maiores doadoras de células de bochecha para a padronização da extração com o *swab*.

Aos meus amigos tristes e imbatíveis da bioinfo, Day, Gui, Vilmar, Renato, Tati, Karin, Maiara, Eric, Jaime e Fernando, vocês conseguiram tornar esta jornada mais leve e

engraçada! Obrigada também por todas as ideias de gráficos/figuras que saíram durante nossas pausas com e sem café. Amigos, somos todas máquinas de vencer!

Escrevo estes agradecimentos diretamente de Caxambu/MG para agradecer minhas colegas e amigas da Proto Bea, Ana Paula, Ana Cláudia, Bibiana, Lary, Amábilli, Marilene, Giovana, Luiza e Luisa, por terem me recebido de braços abertos e por terem me auxiliando nas inúmeras PCRs da vida. Sem vocês os cafezinhos não teriam tanta graça! À minha amiga Amanda pelos pagodes de sexta e pelos momentos de apoio de que tudo daria certo.

Às minhas amigas Alice, Mirella, Letícia, Hellen, Victória e Bea por sempre me incentivarem, escutarem e me ampararem. Alice, obrigada pelos chocalatinhos e cafezinhos no meio tarde quando meus experimentos não davam certo.

À minha psicóloga que não me permitiu surtar durante o ano final do mestrado e me fez acreditar que eu tinha capacidade suficiente para finalizar o mestrado e iniciar o doutorado.

Aos meus pais, Ramos e Simone, e ao meu irmão, Ramon, por nunca terem me deixado desistir e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por me proporcionarem um estudo digno, pelo suporte e por todo afeto. Eu amo muito vocês e esta conquista também é de vocês! À minha querida família, obrigada pelo incentivo e por todo amparo durante estes anos.

E, a todos àqueles que contribuíram de forma indireta, seja me incentivando ou só perguntando como estava a pesquisa sem nem entender o que eu realmente estudava, meus mais sinceros obrigada! Vocês também fazem parte desta conquista!

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.”
(CURRIE, Marie)

RESUMO

A displasia do quadril canino (DQC) é uma doença ortopédica complexa com alta prevalência em cães, sobretudo nos de grande porte. A DQC tem como característica a frouxidão excessiva da articulação do quadril provocando instabilidade e desgaste da cartilagem articular. Embora a etiologia não seja compreendida, estudos indicam que apresenta um padrão de herança poligênica influenciada por fatores ambientais. A maior parte dos marcadores genéticos sugestivos para a DQC foi encontrada em estudos com apenas uma raça e podem variar entre as populações caninas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo identificar associações do fenótipo DQC com quatro marcadores genéticos já descritos na literatura, bem como comparar a variabilidade genética entre as populações estudadas na literatura com a população do presente estudo. Os marcadores selecionados compreendiam: região intergênica no CFA1 entre os genes *NOX3* e *ARID1D* (genes associados com a degradação da cartilagem e com a frouxidão articular, respectivamente - SNP BICF2P468585); região próxima ao gene *NOG* no CFA9 (afeta o desenvolvimento articular - SNP BICF2G630834826); região intergênica no CFA28 entre os genes *NANOS1* e *CACUL1* (regula positivamente uma proteína colagenolítica e associado ao ciclo celular, respectivamente - SNP BICF2P1046032); e o gene *FBN2* no CFA11 (proporciona estabilidade mecânica e propriedades elásticas aos tecidos conjuntivos). Foram incluídos 25 cães de raças variadas com (20 cães) e sem (5 cães controle) displasia clinicamente detectável, confirmados por exame clínico e radiográfico. Os tutores preencheram um questionário sobre o cotidiano dos cães com o intuito de relacionar os efeitos ambientais com o fenótipo displásico. As coletas das amostras de DNA da mucosa oral foram padronizadas e otimizadas com dois *swabs* visando uma abordagem não invasiva e simples. O DNA extraído foi amplificado por PCR para cada marcador e sequenciado pelo método de Sanger. A variabilidade genética foi realizada após a análise de similaridade das sequências obtidas por sequenciamento e também a partir de sequências disponíveis nos bancos de dados. Em relação ao porte, 60% são de porte médio, 16% de porte grande, 12% de porte pequeno e 12% de porte gigante. Não foram encontradas associações significativas para o marcador BICF2P468585 com o fenótipo displásico. O genótipo homozigoto A foi encontrando apenas em cães displásicos para o marcador BICF2G630834826 e o genótipo homozigoto contendo a base C apenas em cães displásicos para o marcador BICF2P1046032. Para este último marcador, foi identificada a inserção de um nucleotídeo A próximo à região do SNP em cães que apresentavam a base A na posição do SNP. Para o marcador *FBN2*, o genótipo homozigoto mutante foi encontrado em cães displásicos, podendo estar relacionado com o fenótipo displásico. A frequência dos alelos encontrada, através das análises de similaridade, foi semelhante às encontradas pelo estudo. Por conta do número amostral, não foi possível realizar maiores inferências sobre estes marcadores na população estudada. No entanto, as particularidades encontradas poderão ser exploradas com um número amostral maior, para que futuramente seja possível desenvolver um teste de diagnóstico precoce e preciso.

Palavras-chave: Displasia coxofemoral. Marcadores genéticos. Genoma canino.

ABSTRACT

Canine hip dysplasia (CHD) is a complex orthopedic disease with a high prevalence in dogs, mainly in large dog breeds. CHD is characterized by the laxity of the hip joint, it causes instability and wear of the articular cartilage. Although the etiology is not well understood, some studies indicate the influences of polygenic inheritance and environmental factors. In literature, most of the suggestive markers for DQC were found only in a few dog breeds with variation among canine populations. Therefore, this study aimed to identify associations of the CHD phenotype with four suggestive genetic markers: the intergenic region on chromosome 1 between NOX3 and ARID1D genes (genes associated with cartilage degradation and joint laxity, respectively – SNP BICF2P468585); the region close to the NOG gene on chromosome 9 (affects joint development – SNP BICF2G630834826); the intergenic region on chromosome 28 between NANOS1 and CACUL1 genes (upregulates a collagenolytic and cell cycle-associated protein, respectively – SNP BICF2P1046032); and inside the gene coding to fibrillin 2 on chromosome 11 (provides mechanical stability and elastic properties to connective tissues). Twenty-five dogs of mixed breeds with (20 dogs) and without (5 control dogs) clinically detectable dysplasia, confirmed by clinical and radiographic examination, were included. The tutors filled out a questionnaire about the dog's daily life in order to relate environmental effects with the dysplastic phenotype. The collections of DNA samples from the oral mucosa were standardized and optimized with two swabs aiming at a non-invasive and simple approach. The extracted DNA was amplified by PCR for each marker and sequenced by Sanger. Genetic variability was performed after analyzing the similarity of the sequences obtained by sequencing and also from sequences available in the databases. Regarding size, 60% are medium-sized, 16% large, 12% small and 12% giant. No significant associations were found for the marker BICF2P468585 with the dysplastic phenotype. The homozygous genotype A was found only in dysplastic dogs for the marker BICF2G630834826 and the homozygous genotype containing the base C only in dysplastic dogs for the marker BICF2P1046032. For this marker, the insertion of an A nucleotide near the SNP region was identified in dogs that had the A base at the SNP position. For the FBN2 marker, the homozygous mutant genotype was found in dysplastic dogs, which may be related to the dysplastic phenotype. The frequency of alleles found through similarity analysis was similar to those found by the study. Due to the sample size, it was not possible to make further inferences about the markers in the population studied. However, the particularities found can be explored with a larger sample number, so that in the future it is possible to develop an early and accurate diagnostic test.

Keywords: Hip dysplasia. Genetic markers. Canine genome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação anatômica da articulação esquerda do quadril canina. A ilustração traz os principais ossos e estruturas constituintes da articulação. 16
- Figura 2 - Comparação radiográfica em vista ventrodorsal com extensão do quadril, a) quadril normal (grau A) e b) quadril displásico severo (grau E). As setas em vermelho indicam a articulação coxofemoral. Na figura b é possível ver a subluxação da cabeça femoral para fora do acetábulo mais evidente do lado direito.....17
- Figura 3 - Radiografias de cães jovens e idosos que apresentam displasia coxofemoral. Em a) é apresentada uma radiografia ventrodorsal de um cão jovem (entre quatro e oito meses) e em b) uma radiografia ventrodorsal de um cão idoso com o aparente desenvolvimento de osteoartrite.....19
- Figura 4 - Imagem radiográfica de um quadril canino indicando a aferição do Ângulo de Norberg. A letra ‘a’ indica a linha entre os pontos centrais de cada cabeça femoral e a letra ‘b’ a linha entre o centro da cabeça femoral e o aspecto craniolateral e dorsal da borda acetabular. O ângulo formado entre as duas linhas é então medido e retornar o valor de ângulo de Norberg.....21
- Figura 5 – Comparação radiográfica de cães displásicos em vista ventrodorsal com extensão do quadril, evidenciando as articulações de diferentes indivíduos de grau C (imagens A e D), grau D (imagens B e E) e grau E (imagens C e F)22
- Figura 6 – Radiografia de um cão após (a) artroplastia total do quadril e (b) remoção da cabeça femoral, do lado esquerdo do quadril. A seta indica a prótese implantada substituindo a articulação coxofemoral.....24
- Figura 7 – Distribuição dos cães utilizados neste estudo por faixa etária e sexo.....41
- Figura 8 – Imagens radiográficas do quadril de cães participantes do estudo, incluindo indivíduos representantes dos graus A, B, C, D e E. Os graus A e B representam as articulações saudáveis, grau C - displasia leve, grau D - displasia moderada e o grau E - displasia severa.....42
- Figura 9 – Resultado representativo das amplificações por PCR dos quatro marcadores utilizados nesse estudo utilizando a amostra de DNA do cão 1.....47
- Figura 10 – Alinhamento das sequências de cães controle e displásicos, para os quatro marcadores: (A) marcador BICF2P468585; (B) marcador BICF2G630834826; (C) marcador

BICF2P1046032; e (D) marcador FBN2. A sequência consenso da região do <i>amplicon</i> demonstra a variação na posição do SNP.....	49
Figura 11 – Cromatograma representando o genótipo heterozigoto T/G do cão C3 (analisado a partir do sequenciamento com o iniciador antissenso) para o marcador BICF2P1046032 e uma possível inserção T na posição 158.....	50
Figura 12 – Mapa de calor representando quantitativamente (frequência absoluta) os genótipos encontrados para cada marcador. Nota-se que para os marcadores FBN2 (A) e BICF291046032 (C) há cães heterozigotos, diferentemente encontrado para os marcadores BICF2G630834826 (B) e BICF2P468585 (D).....	51
Figura 13 – Figura representativa das variações para os marcadores BICs dos cães estudados e das sequências de duas montagens diferentes do cão Tasha. Com relação as sequências NR, estão representadas as bases mais frequentes para cada marcador. De forma semelhante, a frequência encontrada entre os cães do estudo para cada marcador também está representada. O dendrograma na parte superior da tabela representa o agrupamento dos cães de acordo com o cálculo de distância euclidiana entre os genótipos encontrados.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais marcadores sugestivos para a displasia do quadril canino identificados nas principais raças estudadas através de amostras de sangue.....	28
Quadro 2 – A avaliação e a pontuação do grau de displasia de quadril em cães são realizadas com base nas radiografias e levam em conta a medida do ângulo de Norberg, o grau de subluxação, a forma e a profundidade do acetábulo e nos sinais de osteoartrite. A pontuação da FCI é dividida em cinco graus, sendo grau A – quadril normal; grau B – próximo ao normal; grau C – displasia leve; grau D – displasia moderada; e grau E – displasia severa	34
Quadro 3 – Lista de iniciadores utilizados para amplificação dos quatro marcadores genéticos utilizados neste estudo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos cães controle e afetados avaliados neste estudo. Cada animal recebeu uma identificação e seus dados estão organizados por raça, porte, sexo, peso, idade e grau de displasia. Os cães estão ordenados por grau de displasia (A-E).....	35
Tabela 2 – Prevalência raça-específica entre cães sem e com displasia distribuídos por grau.....	43
Tabela 3 – Percentual de cães controles e afetados com displasia de quadril de acordo com porte e em relação aos graus de displasia.....	44
Tabela 4 – Respostas obtidas dos questionários aplicados aos tutores sobre o ambiente e estilo de vida que podem influenciar no fenótipo displásico. As respostas foram separadas entre cães displásicos e controle.....	44
Tabela 5 – Respostas obtidas dos questionários aplicados aos tutores sobre o estado geral dos cães. Foi utilizada a escala de 0 a 2 (onde, 0 ruim, 1 bom e 2 ótimo) para todas as perguntas, exceto a escala de dor (0 muita dor, 1 dor moderada e 2 nenhuma dor).....	46
Tabela 6 – Concentrações de DNA obtidas das amostras testes na padronização de extração dos <i>swabs</i> em diferentes tempos e com e sem tampão de preservação.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação

ARID1B – Domínio de interação 1B rico em AT

BMP – Proteína morfogenética óssea

BVA/KC – *British Veterinary Association/The Kennel Club* – Associação Britânica Veterinária/ O Clube Kennel

CACUL1 – Domínio culina 1 associado ao CDK2

CBRV – Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária

CDKs – Ciclinas e cinases dependentes de ciclina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina

CFA – Cromossomo de *Canis lupus familiaris*

CIIC – Clivagem do colágeno tipo II

COL2A1 – Colágeno tipo II

COL1A1 – Colágeno tipo I

CSS – Síndrome de Coffin-Siris

CTX-I – C-telopectídeo ligado a degradação de colágeno tipo I

CTX-II - C-telopectídeo ligado a degradação de colágeno tipo II

DDQ – Displasia do Desenvolvimento do Quadril

DQC – Displasia do Quadril Canino

FBN2 – Fibrilina 2

FCI – *Fédération Cynologique Internationale* – Federação Cinológica Internacional

KS – Sulfato de queratano

LD – Desequilíbrio de ligação

LMW – *Low molecular weight* – Baixo peso molecular

MT1-MMP – Metaloproteinase de matriz do tipo 1 de membrana

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NANOS1 – Dedo de zinco tipo C2HC 1 da família *nano*

NR – Não redundantes

OFA – *Orthopedic Foundation for Animals* – Fundação Ortopédica para Animais

OMIA – *Online Mendelian Inheritance in Animals* – Herança Mendeliana Online em Animais

Pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIICP – C-proptídeo do procolágeno tipo II

PGE2 – Prostaglandina 2

QTL – *Loci* de características quantitativas

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNP – Polimorfismos de nucleotídeo único

SRD – Sem Raça Definida

TRIO – Fator de troca de nucleotídeos guanina trio Rho

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VDR – Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DISPLASIA DO QUADRIL CANINO	15
1.1.1	Prevalência da doença	17
1.1.2	Diagnóstico	18
1.1.3	Estratégias conservativas e cirúrgicas visando o bem-estar animal	22
1.2	GENÉTICA CANINA.....	25
1.2.1	Estudos com marcadores genéticos.....	26
1.3	USO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DA DQC	29
1.4	MÉTODOS DE COLETA UTILIZADOS EM ESTUDOS GENÔMICOS DE CÃES	29
2	JUSTIFICATIVA	30
3	HIPÓTESE.....	32
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	33
5.2	ANIMAIS	33
5.3	GRUPOS CLÍNICOS	35
5.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
5.5	EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
5.6	AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	37
5.7	SEQUENCIAMENTO	38
5.8	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	39
5.8.1	Análise dos <i>loci</i>.....	39
5.8.2	Análise da variabilidade das sequências.....	39

5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6	RESULTADOS	41
6.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS E QUADRO CLÍNICO DOS CÃES	41
6.2	PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DOS <i>SWABS</i>	46
6.3	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS MARCADORES	47
6.4	ANÁLISE DE VARIABILIDADE DOS MARCADORES EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS	51
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE 1 – Termo de consentimento	76
	APÊNDICE 2 – Questionário aplicado aos tutores	80
	APÊNDICE 3 – Identificação e dados gerais dos cães participantes do estudo	82
	APÊNDICE 4 – Resultado da análise de similaridade, através do BLAST, das sequências gênicas disponíveis para cada marcador. Na coluna da direita estão descritos os cães correspondentes das IDs encontradas no NCBI. Nota-se que os sete cães encontrados correspondem a cinco raças.....	83
	APÊNDICE 5 – Associação dos SNPS com a displasia por grau. As frequências para cada marcador foram calculadas levando em consideração o grau de displasia.	84

1 INTRODUÇÃO

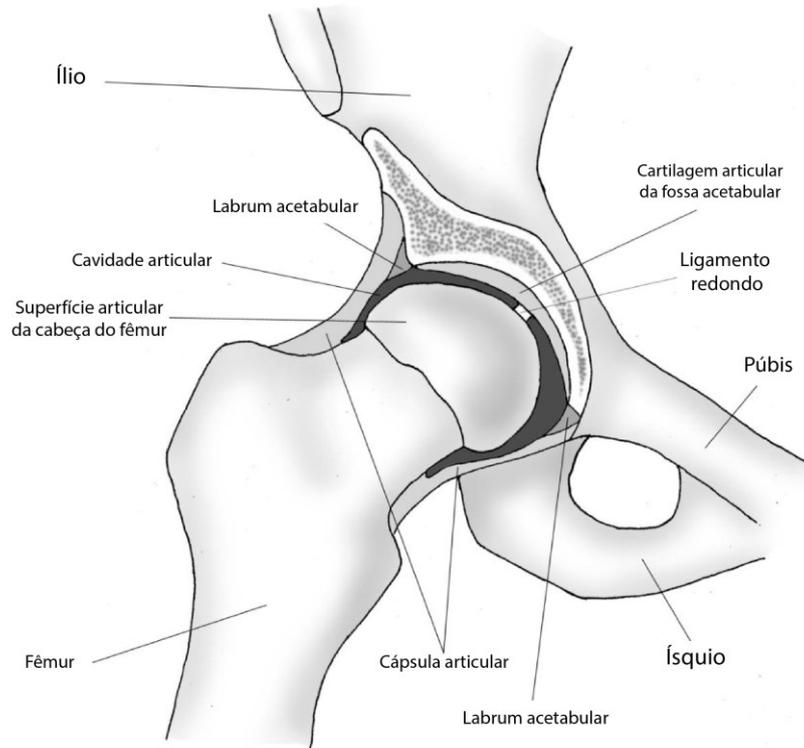
Há cerca de 15.000 anos os cães foram domesticados a partir de seu ancestral, provável lobo do pleistoceno (*Canis cf. lupus*) (THALMANN; PERRI, 2018). O grande número de raças de cães, com características específicas e com uma enorme variedade fenotípica, foi possível a partir da seleção artificial de cães (*Canis lupus familiaris*) pelos humanos (ANDRÉ et al., 2017).

No entanto, o aparecimento de características indesejadas também pode ocorrer devido a seleção acidental de regiões próximas a alelos selecionados para as características esperadas (ANDRÉ et al., 2017). Até o momento, mais de 800 doenças foram listadas no banco de dados de Herança Mendeliana Online em Animais (OMIA) (OMIA, 2022), dentre as quais, algumas doenças ortopédicas, como a displasia do quadril canino (OMIA 000473-9615) (KÖK; ATALAY, 2018).

1.1 DISPLASIA DO QUADRIL CANINO

A articulação do quadril é formada por duas estruturas principais: o acetábulo e a cabeça do fêmur. O ílio, o púbis e o ísquio são três ossos da pelve que formam o acetábulo. A forma esferoidal da articulação é aprofundada por uma banda fibrocartilaginosa, denominada de labrum acetabular, ligado à borda acetabular. A cabeça do fêmur é lisa e quase hemisférica e apresenta uma cavidade circular no meio chamada de fôvea que serve como fixação do ligamento redondo. A congruência formada pela cabeça arredonda do fêmur com o acetábulo, bem como a cápsula articular e ligamentos, formam a articulação funcional do quadril (Figura 1) (KÖNIG; LIEBICH; MAIERL, 2007).

Figura 1 – Representação anatômica da articulação esquerda do quadril canina. A ilustração traz os principais ossos e estruturas constituintes da articulação.



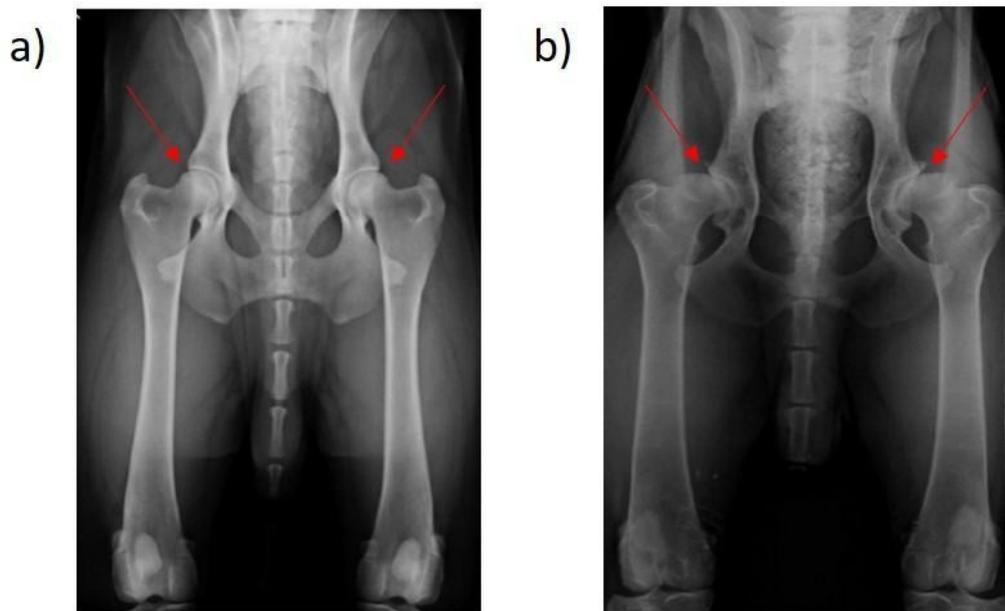
Fonte: Adaptado de Grundström, 2014.

A displasia coxofemoral ou displasia do quadril canino (DQC) foi descrita em 1935 pelo Dr. Gary Schnelle. Além de acometer cães, ela tem sido observada em bovinos, equinos, gatos, coelhos e dingos (BRASS, 1989). A DQC tem como característica a frouxidão excessiva da articulação do quadril, identificada pela subluxação da cabeça femoral para fora do acetábulo e a malformação das articulações do quadril (Figura 2). A doença provoca instabilidade e desgaste da cartilagem articular, levando ao desenvolvimento de osteoartrite secundária (doença articular degenerativa) (FLÜCKIGER, 2007; ZHU et al., 2009). Além disso, a frouxidão dos tecidos moles associada com as tensões anormais nos ossos e tecidos moles da articulação, provoca artrite e remodelação da articulação (GUILLIARD, 2014).

Embora a etiologia da DQC não seja bem compreendida, o conhecimento atual indica que ela apresenta um padrão de herança poligênica influenciada por fatores ambientais (BARTOLOMÉ et al., 2015; IMPELLIZERI; TETRICK; MUIR, 2000). Estudos de associação

genômica tem sido explorados a fim de compreender os mecanismos genéticos e moleculares desta desordem ortopédica, visando o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais precisas e precoces (GUO et al., 2011).

Figura 2 - Comparação radiográfica de cães em vista ventrodorsal com extensão do quadril, a) quadril normal (grau A) e b) quadril displásico severo (grau E). As setas em vermelho indicam a articulação coxofemoral. Na figura b é possível ver a subluxação da cabeça femoral para fora do acetábulo mais evidente do lado direito.



Fonte: Adaptado de ANDRÉ et al., 2017.

1.1.1 Prevalência da doença

A DQC é uma doença ortopédica complexa com alta prevalência em cães de grande porte, como Pastores Alemães, Goldens Retrievers e Labradores Retrievers (COOPMAN et al., 2008). A condição foi reportada em mais de 177 raças, sendo a DQC a doença ortopédica mais comum em cães, com uma prevalência que varia de 1,6 a 71,8%, nas raças puras, de acordo com a Fundação Ortopédica para Animais (OFA, 2021). Embora com menor frequência, também pode ocorrer em cães de raças menores (GUILLIARD, 2014). Afeta cães independentemente de serem cães de raça definida ou não definida (RETTENMAIER et al., 2002; BELLUMORI et al., 2013). A prevalência da DQC em uma população de cães puros e

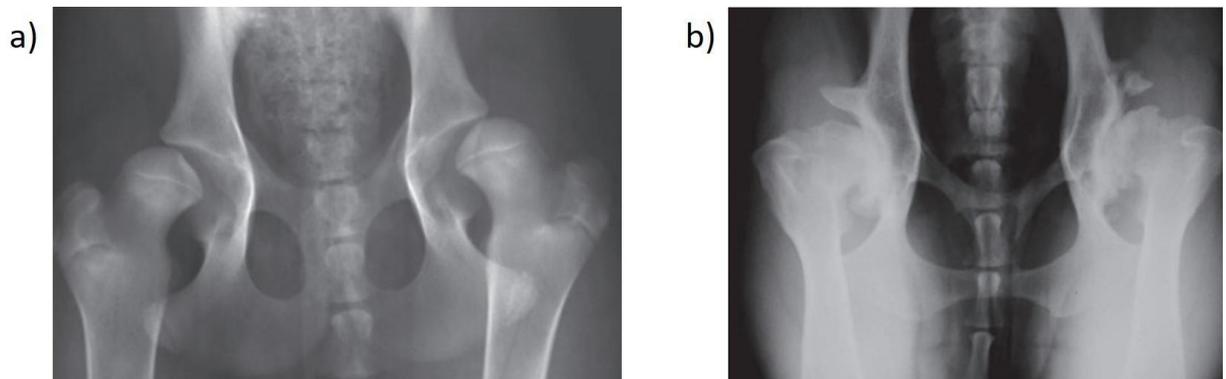
mestiços de um hospital veterinário foi de 19,3%, sendo 17,7% em cães sem raça definida e 19,7% em cães de raça definida (RETTENMAIER et al., 2002).

Fatores de risco estão associados com o aumento no risco de desenvolver a DQC, como o alto peso ao nascer, a castração realizada antes dos seis meses do diagnóstico (VAN HAGEN et al., 2005), exercícios de impacto e alojamento (KRONTVEIT et al., 2012). Filhotes que utilizaram escadas durante o período de desmame (em torno dos três meses de idade) apresentaram risco aumentado para desenvolver DQC, mas a prática de exercícios ao ar livre em terreno macio ou moderadamente acidentado pode diminuir o risco, uma vez que proporciona o fortalecimento da musculatura pélvica (KRONTVEIT et al., 2012).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da DQC pode ser obtido a partir do histórico médico, palpação do quadril e dos sinais clínicos (SMITH, 1998). Os sinais clínicos são variáveis, podendo muitas vezes os cães serem assintomáticos ou apresentarem sinais leves, mas, por outro lado, cães severamente afetados podem ter redução na qualidade de vida se não tratados (ANDERSON, 2011). Os sinais clínicos costumam ser classificados de acordo com a idade do animal (Figura 3). Cães mais jovens tendem a ter episódios agudos de claudicação dos membros pélvicos, que acabam sendo acentuados em momentos de exercícios de alto impacto, além de apresentarem dificuldade em caminhar, levantar, correr e subir escadas. Já os cães mais idosos tendem a ser relutantes em se exercitar, frequentemente transferem o peso para seus membros torácicos devido ao desconforto da articulação e podem apresentar uma atrofia muscular do membro pélvico de forma leve a grave (FRY; CLARK, 1992), além do desenvolvimento de osteoartrite (ANDERSON, 2011). Entretanto, acredita-se que há um estágio intermediário que pode durar meses a anos, onde nenhum sinal clínico é observado, e os cães caminham e correm durante esta fase sem dor (FRY; CLARK, 1992).

Figura 3 - Radiografias de cães jovens e idosos que apresentam displasia coxofemoral. Em a) é apresentada uma radiografia ventrodorsal de um cão jovem (entre quatro e oito meses) e em b) uma radiografia ventrodorsal de um cão idoso com o aparente desenvolvimento de osteoartrite.



Fonte: ANDERSON, 2011

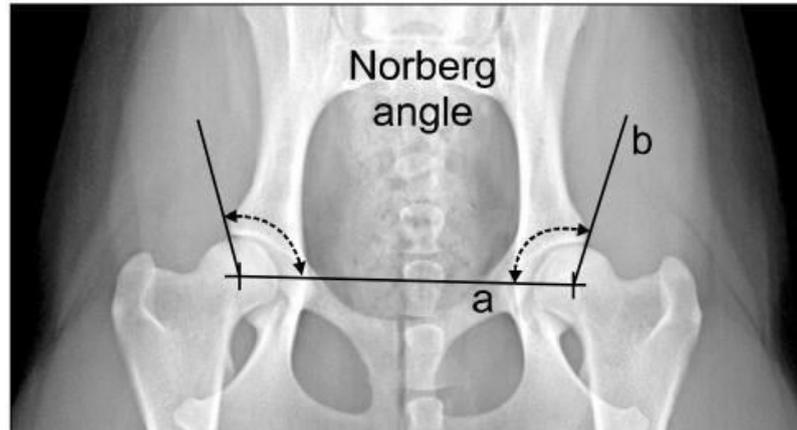
Mesmo tendo a claudicação como o sinal clínico mais comum, o diagnóstico definitivo só pode ser obtido a partir de radiografias da pelve (BUTLER; GAMBINO, 2017). Casos graves de displasia podem ser diagnosticados em cães com menos de três a quatro meses de idade e em casos excepcionais de cães com idade entre 14 dias e um mês após o nascimento (HENRICSON; NORBERG; OLSSON, 1966). O Programa de Melhoramento de Quadril da Universidade da Pensilvânia, mais conhecido como método PennHIP, estabelecido em 1993, conseguiu estimar, com base na medida da frouxidão passiva da articulação do quadril, a suscetibilidade à DQC em cães a partir de quatro meses (GUILLIARD, 2014).

Mesmo com a possibilidade de diagnosticar com idades inferiores a um ano, os principais sistemas de pontuação mundiais estabelecem idades mínimas para a certificação oficial. A idade mínima de um ano para a maioria das raças e de dezoito meses para raças gigantes são condições exigidas na triagem oficial do *British Veterinary Association/The Kennel Club* (BVA/KC) e da *Fédération Cynologique Internationale* (FCI) (FCI, 2016; TKC, 2020). Por parte da *Orthopedic Foudation for Animals* (OFA), os quadris são certificados oficialmente somente após vinte e quatro meses de idade (OFA, 2020). No Brasil, o Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV) realiza a avaliação preliminar a partir dos doze meses, mas somente certifica definitivamente a partir dos vinte e quatro meses de idade (CBRV, 2020).

Além da idade mínima estabelecida pelos principais sistemas de pontuação para atestar o diagnóstico, as avaliações dos exames radiográficos, bem como os parâmetros que devem ser analisados, são padronizados. Cada organização apresenta um comitê científico que analisa características displásicas com a finalidade de categorizar os níveis de displasia (do quadril normal ao nível mais severo). O sistema de pontuação utilizado nos Estados Unidos e no Canadá é o da OFA; Na Grã-Bretanha, Irlanda, Austrália e Nova Zelândia, o sistema utilizado é o do BVA/KC; Já, na América do Sul, na Ásia e na maioria dos países europeus, o sistema de pontuação da avaliação fenotípica é o da FCI (FLÜCKIGER, 2007).

Durante a avaliação da FCI são levados em conta: (i) a medida do Ângulo de Norberg (AN); (ii) o grau de subluxação, que inclui a forma e a profundidade do acetábulo; e, (iii) os sinais de osteoartrite (FLÜCKIGER, 2007). O AN é medido a partir de uma linha reta entre a cabeça do fêmur direita e esquerda, seguido de uma linha que começa no centro da cabeça femoral e é traçada até a intersecção entre a margem acetabular craniolateral e dorsal do acetábulo (Figura 4) (COMHAIRE; SCHOONJANS, 2011). A pontuação final é classificada em cinco graus, variando desde o grau A, que reflete uma articulação normal do quadril, até o grau E que indica a forma mais grave da doença (FLÜCKIGER, 2007). Com relação aos valores de AN utilizados pela FCI, o AN próximo de 105° é encontrado em quadris com grau A, entre 100° e 105° grau B, próximo de 100° grau C, mais de 90° grau D e menos de 90° em quadris com grau E (FLÜCKIGER, 2007). O grau de displasia é determinante para compreender a gravidade e o início da osteoartrite (GUILLIARD, 2014).

Figura 4 - Imagem radiográfica de um quadril canino indicando a aferição do Ângulo de Norberg. A letra 'a' indica a linha entre os pontos centrais de cada cabeça femoral e a letra 'b' a linha entre o centro da cabeça femoral e o aspecto craniolateral e dorsal da borda acetabular. O ângulo formado entre as duas linhas é então medido e retorna como o valor do ângulo de Norberg.



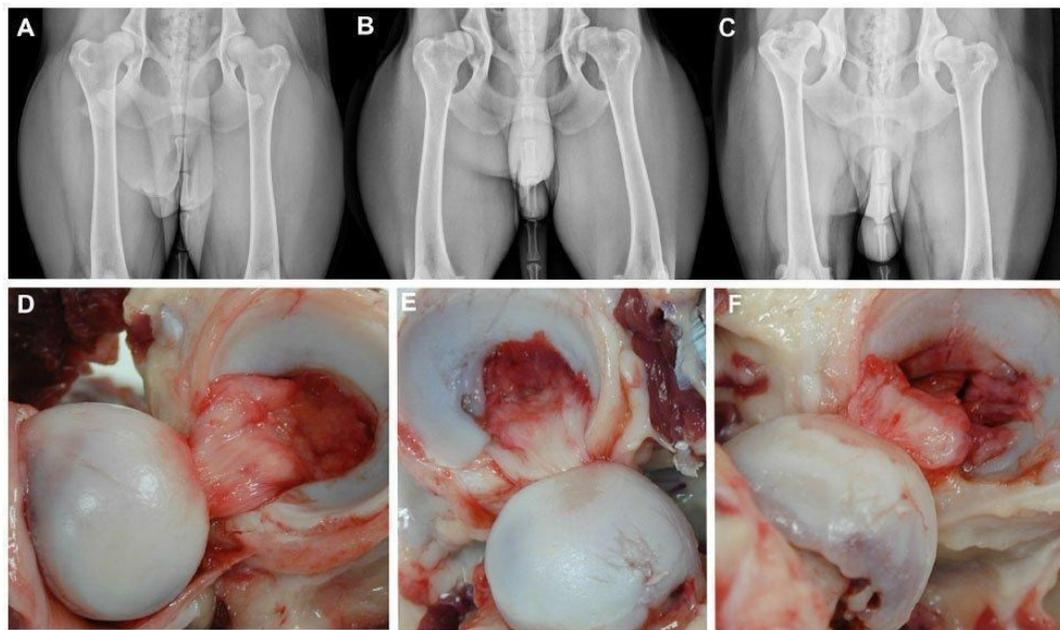
Fonte: PINNA; PIZZUTI; CARLI; 2013.

A articulação do quadril se desenvolve a partir de quatro ossos: o ílio, púbis, ísquio e pequenos ossos acetabulares. Ao nascer, a articulação é composta principalmente por cartilagem e as porções mineralizadas radiograficamente não retornam a verdadeira forma da articulação. O acetábulo e a cabeça femoral não são visíveis radiograficamente, apenas o ílio e o ísquio são visíveis por já estarem mineralizados. A idade no momento da radiografia é fundamental para evitar falsos negativos, pois somente a partir de três a quatro meses que a articulação começa a ter uma forma radiográfica mais normal (HENRY, 1992).

A radiografia ventrodorsal (Figura 5) com extensão do quadril é a posição mais utilizada para avaliar quadris e analisar os sinais de osteoartrite. A radiografia deve incluir toda a pelve e a posição da patela deve estar visível (HENRY, 1992). Para tal, o cão é colocado simetricamente na posição de decúbito dorsal, para que não haja rotação da pelve, e os membros inferiores são puxados para trás até que o joelho e os jarretes estejam completamente estendidos, com os fêmures paralelos entre si e girados medialmente (para dentro) até que as patelas fiquem centralizadas dorsalmente. Como trata-se de uma posição específica, os cães devem ser sedados com anestesia geral para minimizar qualquer tipo de desconforto ao animal (BUTLER; GAMBINO, 2017) e tornar o posicionamento mais fácil e com menos movimento (HENRY, 1992).

Entretanto, é dificultoso posicionar os cães de forma correta, especialmente em cães com a musculatura mais desenvolvida e em animais que não estão sob anestesia geral durante o exame, que acabam contraindo a musculatura ao desencadear uma resposta à dor (HENRY, 1992). Estas problemáticas acabam acarretando um diagnóstico falso-negativo ao mascarar a subluxação articular. Isto porque a extensão dos membros pélvicos pode provocar alterações na cápsula articular, forçando a entrada da cabeça femoral no acetábulo, fazendo com que quadris displásicos pareçam normais (SMITH; BIERY; GREGOR, 1990). Além disso, não é recomendada a radiografia de fêmeas que estão no estro, podendo ser necessário repetir o exame caso a radiografia mostre uma subluxação leve (HENRY, 1992).

Figura 5 – Comparação radiográfica de cães displásicos em vista ventrodorsal com extensão do quadril, evidenciando as articulações de diferentes indivíduos de grau C (imagens A e D), grau D (imagens B e E) e grau E (imagens C e F).



Fonte: Schachner; Lopez; 2015.

1.1.3 Estratégias conservativas e cirúrgicas visando o bem-estar animal

A preocupação com o bem-estar animal tem impulsionado o Mercado Pet mundial. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) a população de cães no Brasil em 2020 era de 55,9 milhões. Adicional a isso, o Mercado Pet nacional movimentou R\$ 27,02 bilhões em 2020 e passou a ocupar a 7ª colocação na indústria mundial de insumos *pet* (alimentação, higiene, acessórios, equipamento e

medicamentos veterinários), com participação de 3,9% do faturamento mundial, passando na frente de países como Itália e Austrália (ABINPET, 2022). Além disso, de acordo com os dados atualizados e divulgados pelo Instituto Pet Brasil, o gasto mensal médio é de R\$338,76 com cães, enquanto que com gatos gira em torno de R\$196,56 (IPB, 2019).

Procedimentos para promover o bem-estar animal têm sido propostos visando a redução ou eliminação da dor, sejam eles através do melhoramento ou restauração da função do membro ao normal. Para determinar o tipo de intervenção, alguns fatores são levados em conta, como a idade, a gravidade dos sinais clínicos e a gravidade dos graus de subluxação e de osteoartrite.

O tratamento conservativo a longo prazo inclui a aplicação de cinco princípios no tratamento: (i) o controle de peso; (ii) controle nutricional; (iii) suplementação nutricional com ácidos graxos ômega-3 e glucosamina/condroitina; (iv) exercícios aliados com a reabilitação física; e (v) uso de anti-inflamatórios (SCHULZ, 2013). Aproximadamente 75% dos cães jovens tratados a longo prazo de forma conservativa conseguem retornar a função clínica aceitável após a maturidade (SCHULZ, 2013).

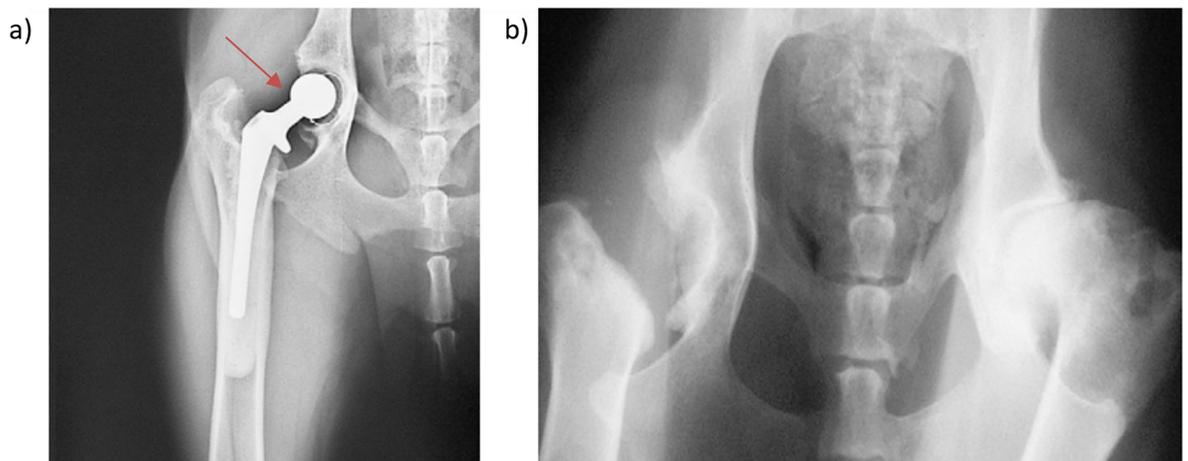
Fatores como disponibilidade de equipamentos, custo, severidade da DQC, idade e condição do cão, são levados em consideração para a escolha da técnica cirúrgica a ser utilizada. As intervenções cirúrgicas visam prevenir ou limitar o desenvolvimento da displasia, bem como a subsequente osteoartrite (ANDERSON, 2011). A cirurgia é indicada quando o tratamento conservativo não é eficaz ou quando o tutor visa o retardamento da DQC e no aumento da probabilidade funcional da articulação a longo prazo (SCHULZ, 2013). Existem diversas técnicas como a sinfisiodese púbica juvenil, osteotomia pélvica, artroplastia total do quadril, excisão da cabeça e colo do fêmur e denervação coxofemoral.

A sinfisiodese púbica juvenil é realizada em filhotes entre quinze e vinte semanas de idade com a finalidade de alterar o crescimento da pelve e o grau de ventroversão do acetábulo. É uma cirurgia minimamente invasiva e considerada como preventiva. O procedimento consiste em fechar precocemente a sínfise púbica a partir de um eletrocautério (DUELAND et al., 2001). No entanto, como nesta idade grande parte dos filhotes não apresentam sinais clínicos visíveis, um diagnóstico precoce, como a técnica PennHip, é importante para triar cães com evidência palpável e radiográfica de frouxidão articular para a realização da técnica. Outra técnica utilizada é osteotomia pélvica tem o objetivo de girar axialmente e lateralizar o acetábulo a fim de aumentar a cobertura dorsal da cabeça femoral. Este procedimento é indicado para cães

jovens de raças de trabalho e para interromper ou retardar a progressão da osteoartrite (SCHULZ, 2013).

Já a artroplastia total do quadril (Figura 6a) é indicada apenas em casos em que a articulação coxofemoral não pode ser reparada e como uma última opção de intervenção. O procedimento consiste na remoção e substituição da articulação, sendo realizada apenas por cirurgiões experientes e treinados. Recomenda-se também a redução do peso corporal em cães com sobrepeso para retardar a necessidade da cirurgia, bem como diminuir os riscos e complicações após o procedimento. A excisão da cabeça e colo femoral é um procedimento com o intuito de limitar o contato ósseo entre a cabeça do fêmur e o acetábulo, permitindo a formação de uma falsa articulação fibrosa (Figura 6b). Ele é realizado após a falha dos tratamentos conservativos e quando há restrições financeiras, médicas ou de tamanho impossibilitam outras intervenções. Como a articulação formada por uma fibrose pseudoartrose é instável, a função articular pós-operatória é imprevisível. Mesmo sendo indicada para raças menores, o procedimento pode ser realizado em raças grandes e gigantes que não obtiveram êxito em outras formas de tratamento (SCHULZ, 2013).

Figura 6 – Radiografia de quadril de um cão após (a) artroplastia total do quadril e (b) remoção da cabeça femoral, do lado esquerdo do quadril. A seta indica a prótese implantada substituindo a articulação coxofemoral.



Fonte: Schulz, 2013.

Por fim, com o intuito de minimizar a dor, a denervação da articulação do quadril tem sido considerada um tratamento paliativo, uma vez que apresenta poucas complicações potenciais, mas com possível progressão de osteoartrite (ANDERSON, 2011). A técnica

consiste na remoção simples do periósteo da borda craniolateral destruindo os ramos articulares do nervo dorsal do glúteo e do nervo ciático (SCHMAEDECKE; SAUT; FERRIGNO, 2008).

Além dos tratamentos propostos, são crescentes os esforços para reduzir a sua prevalência. Os primeiros esforços começaram com a triagem fenotípica pelos programas seletivos de reprodução, cujo objetivo é maximizar o emparelhamento de alelos favoráveis a partir da criação de cães fenotipicamente normais. Para isso, a condição displásica do cão é estimada a partir da avaliação fenotípica (radiografias) do quadril (SMITH, 1998). Desde 1960, há tentativas de reduzir a incidência da DQC na Finlândia. Na maioria das raças, a seleção tem sido malsucedida e foi constatado que a proporção de cães fenotipicamente displásicos continuou alta durante a execução do programa Finlandês Kennel Club “Criação contra doenças hereditárias de cães” (MÄKI; LIINAMO; OJALA, 2000). Genovois et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes com os dados fenotípicos de 15 raças na França, ao verificar que apenas seis raças tiveram alguma melhora significativa na redução da prevalência da doença.

O baixo êxito desses programas pode ser explicado pela ausência de informações dos genótipos de cães reprodutores com base nas radiográficas convencionais, por conta disso, animais displásicos ainda são usados para fins de reprodução (FLÜCKIGER; FRIEDRICH; BINDER, 1999). Além disso, alguns alelos principais podem ser recessivos (MÄKI et al., 2004) e cães com fenótipo radiográfico normal podem ser portadores de alguns genes envolvidos no fenótipo displásico e transmiti-los aos seus filhos, tornando ineficaz a abordagem fenotípica para selecionar cães reprodutores (MÄKI; LIINAMO; OJALA, 2000).

1.2 GENÉTICA CANINA

O genoma de referência de *Canis lupus familiaris* tem um tamanho estimado em 2,4 Gb e é organizado em 38 pares de cromossomos autossomos e dois cromossomos sexuais (X e Y) e está disponível na base de dados do NCBI na versão CanFam 3.1 (GCA_000002285.2). Recentemente, foi disponibilizada uma versão mais atualizada do genoma canino realizada por meio do sequenciamento PacBio. Esta versão se encontra no banco de dados NCBI sob o código de acesso <GCA_000002285.4>. Ambos os genomas disponíveis são referentes a um indivíduo fêmea da raça Boxer identificada como Tasha. Além disso, estima-se que o genoma do cão contém 20.257 genes codificantes (ENSEMBL, 2020a), sendo esse um número inferior ao observado para camundongos (22.519 genes codificantes) (ENSEMBL, 2020b).

A partir do estudo publicado por Lindblad-Toh et al. (2005), a diversidade genética canina poderia ser explorada por diversos fatores, tais como: (i) a disponibilidade da sequência

do genoma canino, que cobre aproximadamente 99% do genoma eucromático; (ii) um mapa de mais de 2,5 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) derivados da comparação parcial de sequências de 11 raças de cães com uma sequência de referência (uma fêmea da raça Boxer); (iii) e o avanço das ferramentas genômicas. Deste modo, foi proposto um painel de 172.115 SNPs para utilização em genotipagem canina, com alta qualidade e previsibilidade, preenchendo lacunas deixadas pelo projeto genoma canino (VAYSSE et al., 2011).

O sequenciamento do genoma canino impulsionou também a identificação de marcadores e de microarranjos de DNA, e conseqüentemente a produção de produtos biotecnológicos para detecção destes marcadores. A tecnologia do microarranjo de DNA utiliza pequenas lâminas de vidro com sondas (sequências de DNA) correspondentes a centenas de milhares de marcadores distribuídos por todo o genoma, que são utilizados para identificar os alelos dos marcadores e para a obtenção de um perfil de indivíduos testados. Entretanto, a técnica é trabalhosa e cara, o que faz com que os tamanhos amostrais necessitem ser relativamente pequenos (ROSA; ROCHA; FURLAN, 2007). A versão de microarranjo de DNA atualmente usada, comercializada pela empresa Illumina, contém 170.000 marcadores de SNPs (VAYSSE et al., 2011) e outra versão contendo 600.000 marcadores está sendo desenvolvida pela empresa Affymetrix (ANDRÉ et al., 2017).

1.2.1 Estudos com marcadores genéticos

Com o advento das técnicas de biologia molecular e a crescente preocupação com o bem-estar animal, diversos estudos têm procurado identificar *loci* de características quantitativas para a DQC (CHASE et al., 2004; TODHUNTER et al., 2005; MARSCHALL; DISTL, 2007; PHAVAPHUTANON et al., 2009; ZHU et al., 2009; HAYWARD et al., 2016), SNPs (FELS; DISTL, 2014; FELS et al., 2014; MIKKOLA et al., 2019a; MIKKOLA et al., 2019b) e genes (FRIEDENBERG et al., 2011; LAVRIJSEN et al., 2014) candidatos para a DQC em diferentes raças.

Os *loci* de características quantitativas, conhecido como QTL, caracterizam-se por serem regiões cromossômicas que influenciam no fenótipo de uma característica quantitativa (ZHU et al., 2009). Características quantitativas podem ser influenciadas por muitos genes e também por fatores ambientais (ROSA, 2013). O entendimento dessa região independe de as raças serem mestiças (TODHUNTER et al., 2005) ou puras (MARSCHALL; DISTL, 2007; HAYWARD et al., 2016). Dois QTLs no cromossomo (CFA) 1, associados com a frouxidão

articular, foram identificados em Cães da Água Português (CHASE et al., 2004), em Pastores Alemães (MARSCHALL; DISTL, 2007) e em Labradores (PHAVAPHUTANON et al., 2009). Entende-se também que o efeito do mesmo QTL na expressão de várias características displásicas pode fornecer evidências de que o mapeamento tem identificado locais que realmente contribuem para o fenótipo da displasia do quadril (TODHUNTER et al., 2005).

Fels et al. (2014) relataram nove SNPs associados com a DQC nos CFA3, CFA9, CFA26, CFA33 e CFA34 em Pastores Alemães. Os SNPs associados mais significativos estavam localizados nos CFA33 e CFA34 e eram próximos a genes candidatos funcionais envolvidos na regulação da formação óssea, na atividade dos osteoclastos, na proliferação e diferenciação de condrócitos. Além desses, outros três SNPs próximos a genes envolvidos na formação óssea, codificadores de proteínas envolvidas na regulação da homeostase óssea e de GTPases que atuam na proliferação e diferenciação condrogênica foram identificados (FELS; DISTL, 2014).

Em 2019, Mikkola et al. verificaram em Pastores Alemães SNPs no CFA1 e CFA9 com associações sugestivas. Um dos SNPs no CFA1 é intrônico para *NOX3* e os outros estão em uma região intergênica entre *NOX3* e *ARID1B*. Com relação aos *loci* encontrados para o CFA9, eles apresentaram diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre os casos leves e moderados a graves, e nenhuma diferença entre os casos leves e controles. Esse achado indica, segundo o grupo, que cães com displasia leve do quadril podem ter uma predisposição genética menor para o distúrbio (MIKKOLA et al., 2019a). Este *loci* é referente a uma deleção de 24 pb próxima ao gene *NOG* que foi vista em cães saudáveis e levemente displásicos, sugerindo que essa deleção pode conferir proteção contra a DQC. O produto de expressão do *NOG* é um inibidor da proteína morfogenética que afeta vários processos de desenvolvimento, inclusive o desenvolvimento articular (MIKKOLA et al., 2019a).

Um estudo subsequente do mesmo grupo associou um *locus* (BICF2P48585) no CFA1 em uma longa região intergênica entre *NOX3* e *ARID1B* (genes associados com a degradação da cartilagem e com a frouxidão articular, respectivamente), outro (BICF2G630834826) no CFA28 que apresenta *CACULI* (gene associado ao ciclo celular) e *NANOS1* (gene que regula positivamente uma proteína colagenolítica) e novamente no CFA9 (BICF2P1046032) próximo ao gene *NOG* (MIKKOLA et al., 2019b).

Mesmo com todos esses achados, tem sido ugerido que determinados QTLs não são raça específicos (MARSCHALL; DISTL, 2007), pois há discrepâncias e discordâncias entre os *loci* associados (MIKKOLA et al., 2019). Isso pode ser exemplificado pelo gene da fibrilina 2

(FBN2), localizado no cromossomo 11, cuja mutação no gene foi associada com a displasia em Labradores e em Galgos (FRIEDENBERG et al., 2011). Mas tal associação não foi observada em uma população de Labradores por Lavrijsen et al. (2014), que levantaram a hipótese de que essa discrepância pode ser causada pelas diferenças nas populações de Labradores. Outro exemplo da diferença entre as populações deriva de um teste de DNA baseado em sete SNPs, desenvolvido em Labradores Retrievers espanhóis, capaz de prever a DQC (BARTOLOMÉ et al., 2015), mas que não foi capaz de prever a doença em Labradores Retrievers dinamarqueses, pois não houve correlação entre o teste e os achados radiográficos (BRUUN et al., 2020).

Resumidamente, o quadro 1 traz as principais informações dos estudos mencionados acima, bem como o método de coleta utilizado para a identificação de cada marcador e a raça em que foi descrito.

Quadro 1 – Principais marcadores sugestivos para a displasia do quadril canino identificados nas principais raças estudadas através de amostras de sangue.

Marcadores sugestivos	CFA	Raça	Método de coleta	Referência
Dois QTLs	1	Cão D'Água Português	Amostras de sangue	Chase et al., 2004
		Pastor Alemão		Marschall; Distl, 2007
		Labrador Retriever		Phavaphutanon et al., 2009
SNPs	3, 9, 26, 33 e 34	Pastor Alemão	Amostras de sangue	Fels; Distl, 2014
				Fels et al., 2014
	1, 9			Mikkola et al., 2019a
	1, 9 e 28			Mikkola et al., 2019b
FBN2	11	Labrador Retriever e Galgo Inglês	Amostras de sangue	Friendeberg et al., 2011
		Labrador Retriever	Amostras de sangue	Lavrijsen et al., 2014

CFA: Cromossomo de *Canis lupus familiaris*

1.3 USO DE BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DA DQC

Além dos marcadores genéticos, muito se tem estudado sobre biomarcadores de diagnóstico para detectar a DQC. Desde 2001, verifica-se que os biomarcadores são importantes instrumentos para detecção precoce de doenças e para intervenções terapêuticas (DE GRUTTOLA, et al., 2001). Proteínas envolvidas na remodelação óssea, na matriz celular (AHNER et al., 2019) e o acúmulo de produtos provenientes da degradação ou síntese da cartilagem têm sido investigados para avaliar a precisão de biomarcadores (CÓRDONA-RAMÍREZ; LÓPEZ-VILLEGAS; SILVA-MOLANO, 2018).

Ahner et al. (2019) estudaram proteínas envolvidas na matriz celular e na remodelação óssea presentes no soro e na urina de cães com dois anos ou mais que foram avaliadas para serem possíveis biomarcadores. Quatro proteínas obtiveram sucesso em detectar a presença ou ausência de displasia, detectando dois biomarcadores na urina (C-telopeptídeo ligado a degradação de colágeno tipo I e II [CTX-I e II]), e dois biomarcadores no soro (MMP-9 e C-propeptídeo do procolágeno tipo II [PIICP]). Os biomarcadores de urina apresentaram maior número de diferenças entre os grupos estudados. Isso reflete um resultado atrativo, pois coletar urina para diagnóstico é menos invasivo do que a utilização de soro e a realização de radiografias (AHNER et al., 2019). Quatro biomarcadores candidatos provenientes do osso, da cartilagem ou do fluido sinovial: clivagem do colágeno tipo II (CIIC), PIICP, sulfato de queratano (KS) e prostaglandina E2 (PGE2) também apresentaram resultados satisfatórios. Devido à sua capacidade de diferenciar cães displásicos de cães normais e sua alta especificidade, foi proposto que o PIICP pode ser útil como biomarcador de diagnóstico (CÓRDONA-RAMÍREZ; LÓPEZ-VILLEGAS; SILVA-MOLANO, 2018).

No entanto, os estudos com biomarcadores ainda são sugestivos, ou seja, eles são classificados como possíveis indicadores, mas não estão consolidados para serem utilizados no diagnóstico. Além disso, o progresso na área é dificultado pela falta de conhecimento sobre os eventos biológicos mediados tanto na DQC quanto na osteoartrite (GARRIDO et al., 2018) e por conta da variabilidade individual (CÓRDONA-RAMÍREZ; LÓPEZ-VILLEGAS; SILVA-MOLANO, 2018). Portanto, estudos complementares que visem a identificação de biomarcadores que refletem a gravidade da doença se fazem necessários.

1.4 MÉTODOS DE COLETA UTILIZADOS EM ESTUDOS GENÔMICOS DE CÃES

As plataformas de genotipagem requerem quantidades suficientes de material genômico de alta qualidade. Os estudos com marcadores para DQC (Chase et al., 2004;

Marschall; Distl, 2007; Phavaphutanon et al., 2009; Friendeberg et al., 2011; Fels; Distl, 2014; Fels et al., 2014; Lavrijsen et al., 2014; Mikkola et al., 2019a; Mikkola et al., 2019b) têm obtido o material genético a partir de sangue total.

Como já mencionado, estudos populacionais envolvendo milhares de participantes são necessários para compreender os aspectos genéticos. O sangue continua sendo principal escolha de coleta, por fornecer não apenas células nucleadas, mas também agentes fisiológicos contidos no plasma (COZIER; PALMER; ROSENBERG, 2004). Entretanto, a coleta de amostras de sangue acaba não sendo viável nestes estudos, pois os participantes estão em outras localidades e pela necessidade de um profissional treinado para realizar a punção venosa, tornando a coleta de sangue dispendiosa (HANSEN et al., 2007).

O desenvolvimento e a obtenção bem-sucedida não apenas de amostras de qualidade, mas também de um grande número de amostras obtidas são fatores fundamentais em estudos com um grande número amostral. Nesse sentido, métodos de coleta não invasivos e mais baratos podem aumentar a participação dos tutores nos estudos (MITSOURAS; FAULHABER, 2009).

Amostras obtidas por swab bucal demonstraram resultados satisfatórios ao produzir DNA canino suficiente para ensaios de genotipagem multiplex (CHANG et al., 2007). Mitsouras e Faulhaber (2009) e Yokoyama, Erdman e Hamilton (2010) obtiveram resultados semelhantes ao utilizar um kit específico (*Kit Oragene Animal*, DNA Genotek, Ontario, Canadá). Estes autores demonstraram que amostras de saliva canina resultam em rendimentos de DNA superiores àqueles obtidos de sangue e com qualidade superior ao DNA bucal, podendo ser utilizada como uma alternativa de DNA de alta qualidade para estudos de genotipagem canina. As coletas de saliva podem ser realizadas pelo próprio tutor, são estáveis por vários meses a temperatura ambiente ao ser misturada com o tampão de estabilização e pode ser enviada pelo correio sem infringir as leis de envio ou restrições éticas (YOKOYAMA; ERDMAN; HAMILTON, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Compreender a genética da DQC tem sido um grande desafio veterinário nas últimas décadas, pois mesmo havendo esforços para descobrir *loci* de risco e variantes causais, a replicação dos estudos e a validação dos mesmos são difíceis. O tamanho amostral, a complexidade e a imprecisão do fenótipo, bem como a aparente diversidade genética entre as raças, são problemáticas que dificultam a replicação dos estudos (MIKKOLA et al., 2021).

Além disso, as radiografias também apresentam limitações por refletirem apenas o fenótipo do cão, sem haver informações sobre o genótipo e nem o risco de herdabilidade da doença. Esta limitação é referente a cães fenotipicamente normais que podem carregar mutações que influenciam na expressão de características displásicas (FLÜCKIGER, 2007).

Pouco se sabe da base genética da DQC até o momento, e de acordo com os estudos, parece haver muitos genes que contribuem com um efeito pequeno ou moderado que podem variar entre as populações caninas. A compreensão as variações genéticas dentro das populações caninas, permite o entendimento da DQC e pode contribuir futuramente no desenvolvimento de ferramentas preditivas capazes de identificar o risco da DQC com poucos dias de vida do animal.

A maior parte dos marcadores sugestivos para a DQC foi verificada em estudos com um grande número amostral em apenas uma raça, sendo mais frequentes estudos com Pastor Alemão ou Labrador Retriever. Desses marcadores destacam-se três *loci* com quatro genes candidatos: um *locus* (posição 45.382.633, SNP BICF2P468585) entre os genes *NOX3* e *ARID1D* no cromossomo 1, um *locus* (posição 31.477.907, SNP BICF2G630834826) próximo ao gene *NOG* no cromossomo 9 e o terceiro *locus* (posição 29.111.565, SNP BICF2P1046032) que contém os genes *NANOS1* e *CACUL1* no cromossomo 28 (MIKKOLA et al., 2019b), e o gene da Fibrilina 2 (posição 17.311.226 – 17.551.536) no cromossomo 11 (NCBI, 2020a). Vale ressaltar que estes marcadores foram identificados a partir do mapeamento do genoma completo dos cães através de amostras de sangue.

Este trabalho se propõe a avaliar esses três *loci* e o gene da FBN2 em uma população de cães de raças variadas com e sem displasia clinicamente detectável, visando estabelecer eventuais associações com o fenótipo displásico. Para isso, buscou-se utilizar um método não invasivo para realizar a coleta das amostras. Este tipo de conhecimento pode fornecer informações importantes sobre a estrutura genética e prevalência da doença na população canina de raças variadas.

3 HIPÓTESE

Os marcadores genéticos BICF2P468585, BICF2G630834826, BICF2P1046032 e FBN2 descritos na literatura em Pastores Alemães e Labradores como sugestivos para a displasia do quadril canino podem ser validados como associados com o fenótipo displásico em uma população de cães de raças variadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar associações de quatro marcadores genéticos em uma população de cães de raças variadas com e sem displasia clinicamente detectável e comparar a variabilidade genética.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e sequenciar os quatro *loci* (BICF2P468585, BICF2G630834826, BICF2P1046032 e FBN2) das regiões sugestivas da DQC em uma população de cães de raças variadas com e sem displasia clinicamente detectável.
- Relacionar a associação genética desses *loci* com o fenótipo displásico.
- Comparar a variabilidade genética entre a população de cães de raças variadas e entre populações estudadas da literatura.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COMITÊ DE ÉTICA

A pesquisa foi submetida a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) e aprovada sob o CEUA Nº 2151280820. Por ser um estudo conduzido com animais domésticos mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica, foram entregues aos proprietários dos cães o termo de consentimento e de responsabilidade (Apêndice 1).

5.2 ANIMAIS

Foram analisados 25 cães, sendo 20 animais com displasia e 5 sem displasia clinicamente detectáveis com idade superior a sete meses. Desses 9 eram machos e 16 eram fêmeas. As amostras foram coletadas de janeiro de 2021 até maio de 2022 e o único requisito para a inclusão no estudo era o diagnóstico por raio-x, inclusive para os cães sem a doença. Dos 20 cães displásicos, 15 estavam em reabilitação física.

A avaliação e a pontuação, quanto à displasia do quadril, foram realizadas Médica Veterinária Amanda Adriana da Silva (CRMV-07024) com base nas radiografias de acordo com o método de pontuação FCI (A= sem sinais de DQC, B=quadril próximo ao normal, C=sinais leves de DQC, D=sinais moderados de DQC, E=DQC severa) (Quadro 2). Esse método certifica os quadril displásicos de acordo com a medida do ângulo de Norberg, o grau de subluxação, a forma e a profundidade do acetábulo e nos sinais de osteoartrite. Ambas as articulações são pontuadas, prevalecendo e recebendo o diagnóstico do grau de maior severidade (FLÜCKIGER, 2007). A avaliação clínica e grau de displasia dos animais foi realizada pela Médica Veterinária Amanda Adriana da Silva (CRMV-07024).

Como o número amostral estava abaixo do esperado, foi realizada a divulgação da pesquisa em mídias sociais para atingir um público maior. Dez tutores entraram em contato por *e-mail* demonstrando interesse em participar da pesquisa. Estes cães já estavam diagnosticados e pontuados pelos médicos veterinários responsáveis.

Os tutores dos animais foram consultados sobre a participação na pesquisa e preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido e um questionário de anamnese, detalhando o peso e porte, níveis de exercício, estilo de vida e nutrição e problemas de saúde concomitantes (Apêndice 2). As perguntas foram elaboradas com o intuito de relacionar os dados qualitativos obtidos com os resultados subsequentes do fenótipo displásico.

Quadro 2 – A avaliação e a pontuação do grau de displasia de quadril em cães são realizadas com base nas radiografias e levam em conta a medida do ângulo de Norberg, o grau de subluxação, a forma e a profundidade do acetábulo e nos sinais de osteoartrite. A pontuação da FCI é dividida em cinco graus, sendo grau A – quadril normal; grau B – próximo ao normal; grau C – displasia leve; grau D – displasia moderada; e grau E – displasia severa.

A	<p style="text-align: center;">Quadril normal</p> <p>A cabeça femoral e o acetábulo são congruentes. A borda acetabular craniolateral parece afiada e ligeiramente arredondada. O espaço articular é estreito e uniforme. O ângulo de Norberg é de cerca de 105°. Em excelentes articulações do quadril a borda craniolateral circunda a cabeça femoral um pouco mais na direção caudolateral.</p>
B	<p style="text-align: center;">Perto das articulações normais do quadril</p> <p>A cabeça femoral e o acetábulo são ligeiramente incongruentes e o Ângulo de Norberg é de cerca de 105° ou a cabeça femoral e o acetábulo são congruentes e o ângulo de Norberg é inferior a 105°.</p>
C	<p style="text-align: center;">Displasia leve do quadril</p> <p>A cabeça femoral e o acetábulo são incongruentes, o ângulo de Norberg é de cerca de 100° e/ou há um leve achatamento da borda acetabular craniolateral. Podem estar presentes não mais do que leves sinais de osteoartrite na borda acetabular cranial, caudal ou dorsal ou na cabeça e colo do fêmur.</p>
D	<p style="text-align: center;">Displasia moderada do quadril</p> <p>Há incongruência óbvia entre a cabeça femoral e o acetábulo com subluxação. O ângulo de Norberg é superior a 90° (apenas como referência). Achatamento da borda craniolateral e/ou sinais de osteoartrite estão presentes.</p>
E	<p style="text-align: center;">Displasia severa do quadril</p> <p>Alterações displásicas acentuadas das articulações do quadril, como luxação ou subluxação distinta, estão presentes. O ângulo de Norberg é inferior a 90°. Observa-se evidente aplanamento da borda acetabular cranial, deformação da cabeça femoral (em forma de cogumelo, achatamento) ou outros sinais de osteoartrite.</p>

Fonte: Adaptado de FLÜCKIGER, 2007.

5.3 GRUPOS CLÍNICOS

Os cães foram classificados em dois grupos: grupo controle (cães com grau A e B) e grupo afetado (cães com graus C, D e E) (Tabela 1). Animais com outros distúrbios ortopédicos, como processo degenerativo coxofemoral, foram excluídos do estudo. A identificação de cada cão e os dados de raça, porte, sexo, peso, idade e grau estão disponíveis no apêndice 3.

Tabela 1 – Características gerais dos cães controle e afetados avaliados neste estudo. Cada animal recebeu uma identificação e seus dados estão organizados por raça, porte, sexo, peso, idade e grau de displasia. Os cães estão ordenados por grau de displasia (A-E).

Grau	Identificação	Raça	Porte	Sexo	Peso	Idade	Grupo
A	C2	SRD	M	Fêmea	18 kg	7 anos	Controle
A	C3	Border collie	M	Fêmea	21 kg	5 anos	Controle
A	C4	Bulldog inglês	M	Fêmea	17 kg	11 anos	Controle
B	C1	Border collie	M	Fêmea	18 kg	11 anos	Controle
B	C5	Border collie	M	Fêmea	16,8 kg	10 anos	Controle
C	1	Border collie	M	Fêmea	20 kg	4 anos	Afetado
C	4	Border collie	M	Fêmea	19 kg	1 ano	Afetado
C	5	Pug	P	Macho	9 kg	6 anos	Afetado
C	6	Labrador retriever	G	Macho	48 kg	11 anos	Afetado
C	10	SRD	M	Fêmea	15 kg	20 anos	Afetado
C	11	Labrador retriever	G	Macho	36 kg	16 anos	Afetado
C	14	Border collie	M	Fêmea	20 kg	5 anos	Afetado
C	20	Cane corso	GG	Fêmea	50 kg	1 ano	Afetado
D	2	Golden retriever	G	Macho	35 kg	1 ano	Afetado
D	3	Pug	P	Fêmea	12 kg	12 anos	Afetado
D	8	SRD	G	Fêmea	31 kg	9 anos	Afetado
D	9	Rottweiler	GG	Macho	48 kg	13 anos	Afetado
D	12	Spitz alemão	P	Fêmea	4,2 kg	9 meses	Afetado
D	15	Rottweiler	GG	Macho	52 kg	6 anos	Afetado

D	18	American staffordshire terrier	M	Macho	25 kg	4 anos	Afetado
E	7	SRD	M	Fêmea	11 kg	4 anos	Afetado
E	13	Bulldog alemão	M	Macho	10 kg	9 anos	Afetado
E	16	Bulldog inglês	M	Fêmea	24 kg	7 anos	Afetado
E	17	Border collie	M	Macho	17 kg	2 anos	Afetado
E	19	Border collie	M	Fêmea	16 kg	7 meses	Afetado

A: Articulação normal; C: displasia leve; D: displasia moderada; e E: displasia severa; SRD: Sem Raça Definida; P: Pequeno; M: Médio; G: Grande; GG: Gigante.

Os cães foram classificados de acordo com o porte (pequeno, médio, grande e gigante). Raças de porte pequeno têm menos de 10 kg, porte médio de 10 a 25 kg, porte grande de 25 a 45 kg e porte gigante de 45 a 90 kg (ROYAL CANIN, 2001).

5.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Inicialmente foi utilizado um *swab* (Isohelix™ DNA/RNA Buccal Swabs) por cão para realizar um esfregaço de células da bochecha. Posteriormente, passou-se a coletar dois *swabs* bucal por cão, na tentativa de aumentar a concentração de DNA. A técnica consiste na raspagem da mucosa bucal (face direita e esquerda, incluindo a gengiva) com *swabs* estéreis. Após a raspagem, os *swabs* foram armazenados nos próprios tubos de 5 mL que acompanhavam o *swab* em temperatura ambiente.

Visando diminuir os custos finais, outros dois *swabs* (Swab para coleta de amostras estéril ABSORVE e *Specimen Collection Swab* MML Diagnostics Packaging) também foram utilizados. Entretanto, apenas o *swab Specimen Collection Swab* (MML Diagnostics Packaging) foi utilizado para realizar a coleta das células da bochecha. Após a coleta, este era armazenado em tubo Falcon estéril de 15 mL para posterior extração de DNA.

As coletas foram realizadas pela Médica Veterinária Amanda Adriana em sua clínica veterinária de reabilitação com o consentimento prévio assinado pelos proprietários. Conforme descrito no subitem ‘6.2 Animais’, foram obtidas amostras de cães que não consultavam com a Med. Vet. Amanda Adriana para atingir um número amostral maior. Em 10 casos as coletas foram realizadas pelo próprio tutor. Ao entrar em contato com os tutores, estes foram informados sobre a pesquisa e os mesmos realizaram a coleta com o *swab*.

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Como as amostras eram provenientes de um consultório de reabilitação com horário de funcionamento restrito, foram testados tempos diferentes de coleta e armazenamento e se haveria a necessidade de utilizar tampão de preservação. Para garantir uma eficiente extração de DNA e evitar ao máximo a necessidade de realizar a coleta sanguínea, alguns passos foram otimizados.

Testou-se inicialmente o intervalo de tempo entre coleta e extração e com a ausência ou presença de PBS 1x (tampão de preservação). Foram testados cinco parâmetros: 1º - extração de DNA com intervalo de no máximo 24h da coleta com o *swab* a seco (1); 2º - extração de DNA com intervalo de no máximo três dias da coleta com o *swab* a seco (2a); 3º - extração de DNA com intervalo de no máximo três dias da coleta com o tampão (2b); 4º - extração de DNA com intervalo de no máximo sete dias da coleta com o *swab* a seco (3a); 5º - extração de DNA com intervalo de no máximo sete dias da coleta com o *swab* com o tampão (3b). Em todos os cinco momentos os *swabs* foram armazenados em geladeira.

A extração de DNA dos *swabs* das mucosas foi realizada com o Kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA) em até três dias após a coleta. Os dois *swabs* coletados por cão foram processados juntamente em uma única extração. Algumas modificações foram realizadas no protocolo do fabricante a fim de otimizar a quantidade de DNA obtido (1. Adição de tempo extra de cinco minutos na etapa inicial após a adição da solução de lise de núcleos com os *swabs* e 2. A incubação por 30 minutos a 37 °C). Após a extração, a qualidade e concentração do DNA resultante foi avaliada via espectrofotometria a 260 nm, 280 nm e 320 nm, utilizando o aparelho Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer. As amostras foram diluídas para concentração entre 50-100 ng/μL e armazenadas em freezer -20 °C.

5.6 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

As amostras de DNA extraídas foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos quatro marcadores potencialmente associados a DQC. Os iniciadores (Quadro 3) foram desenhados utilizando o genoma canino de referência CanFam 3.1 (GCA_000002285.2) e o programa PrimerSelect, de acordo com as regiões descritas por MIKKOLA et al. (2019b) para os marcadores BICs (BICF2P468585, BICF2G630834826 e BICF2P1046032). O iniciador utilizado para a FBN2 foi obtido do trabalho de FRIEDENBERG et al. (2011).

As ampliações por PCR foram realizadas em volume de 20 μ L utilizando 50-100 ng do DNA extraído, 1 μ M dos iniciadores senso e antissenso, solução tampão 1x (Promega), 0,2 mM dNTP (mix) e 0,5 U/ μ L da enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega). Para otimizar a reação do marcador BICF2P468585 foi necessário acrescentar 0,1 μ L de DMSO 100%. As reações foram incubadas em um termociclador (Applied Biosystems), sendo o DNA desnaturado a 95°C por 5 min e amplificado com 35 ciclos de 95°C por 40 seg, 60°C por 40 seg, 72°C por 45 seg.

Quadro 3 – Lista de iniciadores utilizados para amplificação dos quatro marcadores genéticos utilizados neste estudo.

Marcador	CFA	Sequência dos Iniciadores	Tamanho do produto (pb)	Referência
BICF2P468585	1	F 5'GTTGAGCCACTCAGGCATC 3'	511 pb	Mikkola et al., 2019b
		R 5'CCTGGATCATTGACTTG 3'		
BICF2G630834826	9	F 5'AGTTACCTGAGACCCAGAAC 3'	345 pb	
		R 5'CCTTGCTGTCATCTTGTCAC 3'		
BICF2P1046032	28	F 5' TTCTGGATGACTCCGTCTAG 3'	323 pb	
		R 5'GAGGTTGAATGTGGCTGATG 3'		
FBN2	11	F 5' GGCCAATGTACCAACATTCC 3'	438 pb	Friedenberg et al., 2011
		R 5' TGAAGGATCCCTTGGTGTTC 3'		

CFA: Cromossomo de *Canis lupus familiaris*

Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1%. Para visualizar os fragmentos sob iluminação ultravioleta, o gel foi submerso em uma solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) por 20 minutos e analisado posteriormente no transiluminador MacroVue UV-20 (Hoefer Pharmacia Biotech).

5.7 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares. Para verificar a qualidade das sequências a partir dos cromatogramas o software SnapGene® Viewer 6.0.2 (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>) foi utilizado.

Os fragmentos amplificados de cada região foram sequenciados pelo método de Sanger. As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo da empresa e posteriormente

enviadas. Resumidamente, os produtos de PCR foram purificados por precipitação, onde adicionou-se 100 µL de isopropanol 70% gelado e as amostras foram mantidas a -20 C por 16 horas antes de serem submetidas a centrifugação a 14.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação em rotação máxima por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi removido e após 15 minutos, para a completa evaporação do etanol, o DNA foi eluído em 15 µL de H₂O livre de nucleases. Após a eluição do DNA, as amostras foram novamente quantificadas via espectrofotometria, utilizando o aparelho Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer e diluídas para que tivessem entre 30-60 ng/µL. As amostras foram enviadas para sequenciamento em temperatura ambiente.

5.8 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

5.8.1 Análise dos *loci*

As sequências geradas foram submetidas ao programa Pred-Phrap-Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) para atribuição de qualidade e limpeza dos cromatogramas (phred ≥ 30), determinação das bases (*basecalling*) e obtenção das sequências consenso, a partir do agrupamento das sequências, chamadas de *reads* (senso e antisenso).

As sequências obtidas para cada marcador foram alinhadas através do software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) com as regiões correspondentes no genoma de referência CanFam 3.1 para os marcadores BICs. Os marcadores analisados foram: (i) marcador BICF2P468585, no cromossomo 1, base A ou a base C no *locus* 45,382,633; (ii) marcador BICF2G630834826, cromossomo 9, base A ou G no *locus* 31,477,907; (iii) marcador BICF2P1046032, cromossomo 28, base C ou A no *locus* 29,111,565 (obtidos de MIKKOLA et al., 2019b); (iv) gene FBN2, cromossomo 11, deleção de 7 pb (TACTTTA) entre os pb 189-195 no íntron 30 (obtido do estudo de FRIEDENBERG et al., 2011). Os alinhamentos gerados pelo Clustal Omega foram visualizados no programa software Jalview 2.11.2.4 (WATERHOUSE, 2009).

5.8.2 Análise da variabilidade das sequências

Para comparar as variações de SNPs com outras sequências disponíveis no banco de dados, foi realizada uma análise de similaridade através do algoritmo BLASTn (versão 2.9.0; CAMACHO et al., 2009). Foram utilizadas sequências das montagens Dog10K_Boxer_Tasha (GCA_000002285.4), CanFam3.1 (GCA_000002285.2). Ambos os genomas são referentes ao mesmo cão: uma fêmea da raça Boxer, identificada como Tasha. O sequenciamento faz parte

do Projeto de Sequenciamento do Genoma Canino liderado pelo Broad Institute, localizado no Massachusetts, Estados Unidos. A raça boxer foi escolhida entre uma análise de 60 raças, por ser uma das raças com menor variação em seu genoma (LINDBLAD-TOH et al., 2005). Desde então, algumas versões (CanFam 1.0, CanFam 2.0 e CanFam 3.1) já foram disponibilizadas.

Foram utilizadas também sequências nucleotídicas de *Canis lupus familiaris* obtidas da base de dados não redundante (NR) do NCBI – totalizando 232.931 sequências gênicas de cães. A partir deste conjunto, foi realizada uma etapa de remoção de sequências curtas (abaixo de 200 nucleotídeos), retornando 224.900 sequências, as quais foram utilizadas para análises *a posteriori*. O único parâmetro modificado durante a execução da análise de similaridade foi o valor de e correspondente a 1×10^{-5} .

A frequência do conjunto de dados CanFam 3.1 e Dog10K_Boxer_Tasha foi determinada pela maior similaridade dos genótipos presentes no genoma. Com relação ao conjunto de dados do NCBI, a frequência dos marcadores foi determinada a partir do número de sequências identificadas para cada genótipo de cada marcador, observando os SNPs para cada posição determinada, o genótipo homocigoto selvagem ou homocigoto mutante (com deleção) ou heterocigoto para a FBN2. Nesta contagem, as sequências encontradas referentes ao CanFam 3.1 e Dog10K_Boxer_Tasha, não foram contabilizadas.

O agrupamento das amostras foi realizado através do método de cálculo de distância euclidiana, levando em conta os genótipos encontrados no cálculo da distância. A distância euclidiana utiliza a menor distância entre dois pontos.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

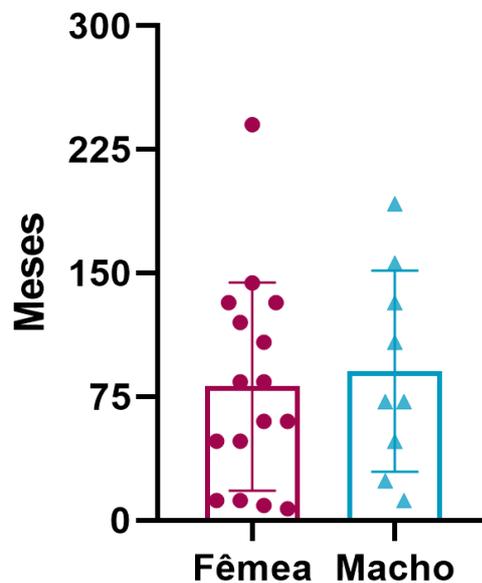
Por conta do baixo número amostral, não seria eficiente aplicar um teste estatístico nos dados obtidos. Foram realizadas apenas análises descritivas nos dados provenientes do sequenciamento.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E QUADRO CLÍNICO DOS CÃES

Ao todo foram coletadas amostras de 25 cães com idades entre sete meses e vinte anos (240 meses) (Figura 7). A idade média dos cães foi de 85,95 meses (sete anos). Vinte cães foram incluídos no grupo afetado (apresentavam graus C, D ou E) e cinco cães foram incluídos no grupo controle (grau A ou B).

Figura 7 – Distribuição dos cães utilizados neste estudo por faixa etária e sexo.

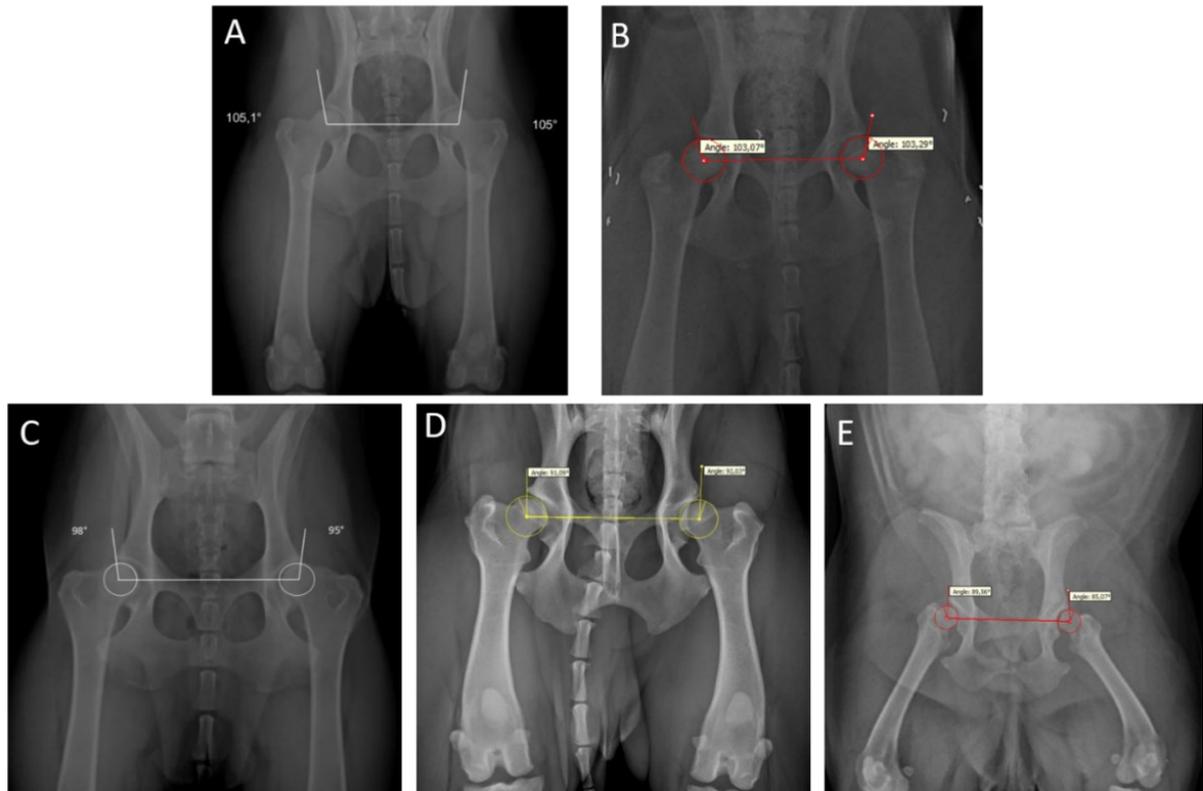


A faixa etária média dos cães está representada em meses e agrupada por sexo. A cor roxa representa as fêmeas e a azul os machos. Cada círculo (fêmea) e triângulo (macho) representa um cão e as barras representam a média e o desvio padrão.

Dez raças diferentes e cães sem raça definida (SRD) fizeram parte do estudo: Border collie (32%) seguido por SRD (16%), Rottweiler (8%), Bulldog inglês (8%), Pug (8%), Labrador retriever (8%), Golden retriever (4%), Cane corso (4%), Bulldog alemão (4%), Sptiz alemão (4%) e American staffordshire terrier (4%). Ao comparar entre raça definida e cães sem raça definida, tem-se 84% e 16%, respectivamente. Em relação ao porte, 60% são de porte médio, 16% de porte grande, 12% de porte pequeno e 12% de porte gigante.

Os cães foram classificados quanto ao grau de displasia de acordo com a pontuação da *Fédération Cynologique Internationale* (FCI). Para facilitar a compreensão dos níveis de cada grau, a figura 8 ilustra o raio-x de cinco graus (A, B, C, D e E) de cães pertencentes ao estudo.

Figura 8 – Imagens radiográficas do quadril de cães participantes do estudo, incluindo indivíduos representantes dos graus A, B, C, D e E. Os graus A e B representam as articulações saudáveis, grau C - displasia leve, grau D - displasia moderada e o grau E - displasia severa.



Os círculos delimitam a cabeça do fêmur, apontando para o seu ponto central. As linhas verticais representam a ligação do centro da cabeça do fêmur com a borda superior do acetábulo e as linhas horizontais ligam os dois pontos centrais da cabeça do fêmur. O ângulo formado entre essas linhas é referente ao ângulo de Norberg.

Fonte: As imagens de raio-x foram obtidas com os tutores dos animais e compiladas pela autora (2022).

De maneira geral, 32% dos animais possuem grau C (displasia leve), 28% possuem grau D (displasia moderada), 20% grau E (displasia severa) e 20% graus A e B (sem displasia). Na tabela 2 é possível verificar a prevalência raça-específica entre os cães amostrados neste estudo com relação ao grau de displasia.

Tabela 2 – Prevalência raça-específica entre cães sem e com displasia distribuídos por grau.

Raça	Graus A e B (%)	Grau C (%)	Grau D (%)	Grau E (%)	Total (N)
Border collie	37,50	37,5	0	25	8
Golden retriever	0	0	100	0	1
Pug	0	50	50	0	2
Labrador retriever	0	0	100	0	2
SRD	25	25	25	25	4
Rottweiler	0	0	100	0	2
Sptiz alemão	0	0	100	0	1
Bulldog alemão	0	0	100	0	1
Bulldog inglês	50	0	0	50	2
American staffordshire terrier	0	0	0	100	1
Cane corso	0	0	100	0	1
					25

No lado esquerdo da tabela estão representadas as 10 raças e os cães sem raça definida. As colunas estão divididas por grau, onde os cães com grau A e B foram considerados sem displasia, grau C para displasia leve, grau D para displasia moderada e grau E para displasia severa. A prevalência raça-específica está representada em porcentagem para cada grau.

A maior parte dos animais eram de porte médio (60% dos cães) e estavam distribuídos entre os cinco graus. Todos os cães controles (graus A e B) eram de porte médio. Entre os displásicos, todos os cães de grau E eram de porte médio (20%). Entre os graus C e D, os cães eram de porte pequeno a gigante.

Tabela 3 – Percentual de cães controles e displásicos de acordo com o porte e em relação aos graus de displasia.

Porte	Graus A e B	Grau C	Grau D	Grau E
Pequeno	0	4% (n=1)	8% (n=2)	0
Médio	20% (n=5)	16% (n=4)	4% (n=1)	20% (n=5)
Grande	0	8% (n=2)	8% (n=2)	0
Gigante	0	4% (n=1)	8% (n=2)	0

No lado esquerdo da tabela estão representados os portes dos cães. As colunas estão divididas por grau, onde os cães com grau A e B são os animais controle, grau C para displasia leve, grau D para displasia moderada e grau E para displasia severa. A prevalência por porte está representada em porcentagem para cada grau. A porcentagem foi calculada levando em consideração o tamanho total da amostra (25). Em parênteses estão colocados o número amostral para cada porte relacionado com o grau.

Outro parâmetro analisado foi o peso físico dos cães. Apenas dois cães (cão 3 e cão 6) estavam acima do peso esperado para o porte. O cão 6, da raça Labrador retriever (porte grande), tem 48 kg e grau C e o cão 3, da raça Pug (porte pequeno), tem 12 kg e grau D.

No momento da coleta das amostras, os tutores receberam um questionário com perguntas objetivas sobre o estilo de vida e com escalas de estado geral do cão. Os dados obtidos sobre o estilo de vida entre cães displásicos e controle foram condensados e estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Respostas obtidas dos questionários aplicados aos tutores sobre o ambiente e estilo de vida que podem influenciar no fenótipo displásico. As respostas foram separadas entre cães displásicos e controle.

Perguntas	Respostas			
	Displásicos		Controle	
Você mora em casa ou apartamento?	57,9%	42,1%	75%	25%
	Casa	Apartamento	Casa	Apartamento
O piso da sua residência é liso?	73,7%	26,3%	100%	
	Sim	Não	Sim	
Em relação à pergunta anterior, o seu cão/sua cadela escorrega com facilidade?	71,4%	28,6%	100%	
	Sim	Não	Não	

Antes de completar 1 ano, seu cão/ sua cadela praticava alguma atividade de impacto, como saltos e exercícios físicos intensos?	31,6% Sim	68,4% Não	75% Sim	25% Não
Em relação à pergunta anterior, qual a atividade?	Pular no portão; <hr/> Corrida; <hr/> Caminhava na praia, nadava e escalava pedras no pátio; <hr/> Pulava tentando pegar objetos em corda;			Corrida
Você notou alguma diferença na capacidade locomotora, ou até mesmo notou que seu animal sente dor quando se locomove ou se levanta?	100% Sim		100% Não	
Em relação a pergunta anterior, qual?	Dificuldade ao levantar, andar e sentar; <hr/> Claudicação; <hr/> Dificuldade em subir em calçada; <hr/> Abertura frequente da pata traseira; <hr/> Diferença na capacidade motora; <hr/> Caminhada torta;			

O estado geral de cães controle foi considerado ótimo de forma consenso para todas as perguntas (ânimo, ânimo em participar de brincadeiras, apetite, locomoção, habilidade de pular, movimentação após um longo descanso e após exercício intenso). Para os cães displásicos, os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 – Respostas obtidas dos questionários aplicados aos tutores sobre o estado geral dos cães. Foi utilizada a escala de 0 a 2 (onde, 0 ruim, 1 bom e 2 ótimo) para todas as perguntas, exceto a escala de dor (0 muita dor, 1 dor moderada e 2 nenhuma dor).

Perguntas	Respostas		
Ânimo	10,5% Ruim	47,7% Bom	42,1% Ótimo
Ânimo em participar de brincadeiras	26,3% Ruim	36,8% Bom	36,8% Ótimo
Apetite	5,3% Ruim	15,8% Bom	78,9% Ótimo
Locomoção	26,3% Ruim	47,7% Bom	26,3% Ótimo
Habilidade de pular	47,7% Ruim	47,4% Bom	5,3% Ótimo
Movimentação após longo descanso	10,5% Ruim	68,4% Bom	21,1% Ótimo
Movimentação após exercício intenso	63,2% Ruim	21,1% Bom	15,8% Ótimo
Qualidade de vida	21,1% Ruim	52,6% Bom	26,3% Ótimo
Escala de dor	15,8% Muita dor	73,7% Dor moderada	10,5% Nenhuma dor

6.2 PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DOS *SWABS*

Com relação ao tempo entre a coleta e extração de DNA, o melhor resultado observado foi com a amostra com o intervalo de coleta e extração de 24h (amostra 1). A quantidade de DNA extraído com o tampão de preservação (amostras 2b e 3b) foi inferior quando comparado com o *swab* seco (2a e 3a). A pureza do DNA, avaliada pela razão A260/A280, foi comparada para os diferentes tempos e método de conservação e variou de 0,448 – 1,661.

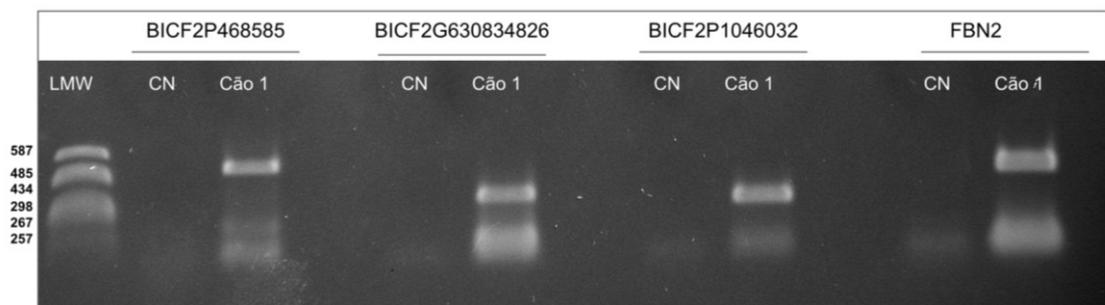
Tabela 6 – Concentrações de DNA obtidas das amostras testes na padronização de extração dos *swabs* em diferentes tempos e com e sem tampão de preservação.

Amostra	Tempo	Conservação	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/320
1	24h	Seco	46,2 ng/μL	1,630	-6,258
2a	3 dias	Seco	13,6 ng/μL	1,567	2,055
2b	3 dias	PBS 1x	0,9 ng/μL	0,448	-0,104
3a	7 dias	Seco	8,2 ng/μL	1,661	9,737
3b	7 dias	PBS 1x	4,1 ng/μL	1,674	-6,372

6.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS MARCADORES

Após a obtenção das amostras de DNA de todos os cães foram amplificados por PCR os quatro marcadores (BICF2P468585, BICF2G630834826, BICF2P1046032 e FBN2). O marcador BICF2P468585 possui um tamanho estimado de 511 pb, o marcador BICF2G630834826 de 345 pb, o marcador BICF2P1046032 de 323 pb e o marcador FBN2 de 438 pb. Como é possível observar na Figura 9, foi possível amplificar os quatro marcadores, a partir de uma PCR para cada marcador, com o tamanho esperado, contudo também foram observados produtos inespecíficos com tamanho inferior ao esperado, o que pode ser resultados de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos.

Figura 9 – Resultado representativo das ampliações por PCR dos quatro marcadores utilizados nesse estudo utilizando a amostra de DNA do cão 1.



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. LMW: Padrão de peso molecular (*low molecular weight*) – pUC18 digerido com *Hae*III (587-257 pb); CN: Controle negativo da reação.

Fonte: Autora (2022).

Após a purificação dos produtos de PCR, foi realizado o sequenciamento dos amplicons pelo método de Sanger para análise dos SNPs analisados e deleções. Cinco amostras para o marcador BICF2P1046032 e seis amostras para o marcador FBN2, as sequências consenso não foram formadas, sendo posteriormente identificados como heterozigotos. Para isso foi necessário analisar os dados brutos e a qualidade das bases pelo cromatograma, para identificar as regiões desejadas.

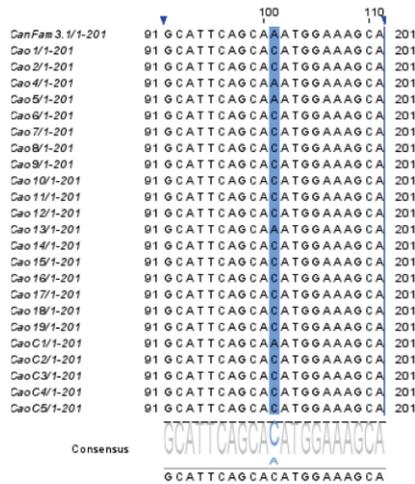
Na figura 10 é possível verificar o alinhamento gerado com os quatro marcadores utilizados. Nestes alinhamentos foram incluídos apenas os cães homozigotos para os marcadores. Para o marcador BICF2P468585, representado na figura 10A, a maior parte dos cães foi homozigoto C/C para o SNP e apenas quatro cães foram homozigotos A/A. Amostras de dois animais (cães 3 e 20) não puderam ser incluídas para o marcador BICF2P468585 nas análises posteriores do estudo devido à baixa qualidade no sequenciamento. Para o cão número 3 não foi possível realizar uma nova coleta por conta do falecimento do animal e para o cão número 20 não houve tempo hábil para a empresa realizar o sequenciamento até a defesa do presente trabalho.

Para o marcador BICF2G630834826, representado na figura 10B, a maior parte dos animais (22 cães) foi homozigota G/G e apenas três cães homozigotos A/A. Todos os cães incluídos no estudo como controle (C1-C5) foram homozigotos G/G.

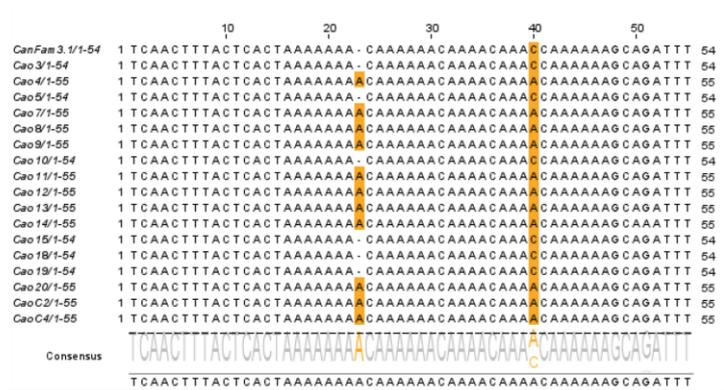
Com relação ao marcador BICF2P1046032, representado na figura 10C, foram encontrados indivíduos homozigotos A/A, indivíduos homozigotos C/C e indivíduos heterozigotos A/C. A maior parte dos animais (onze cães) foi homozigota A/A. Já entre os displásicos, nove cães eram homozigotos A/A, seis cães homozigotos C/C e cinco cães apresentaram o genótipo heterozigoto A/C. A partir do alinhamento foi identificado a inserção de uma base A na posição 23 pb do *amplicon* nas sequências que apresentam o alelo homozigoto A (cães número 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 20, C2 e C4), que também foi verificada no genoma de referência CanFam 3.1.

Figura 10 – Alinhamento das sequências de cães controle e displásicos, para os quatro marcadores: (A) marcador BICF2P468585; (B) marcador BICF2G630834826; (C) marcador BICF2P1046032; e (D) marcador FBN2. A sequência consenso da região do *amplicon* demonstra a variação na posição do SNP.

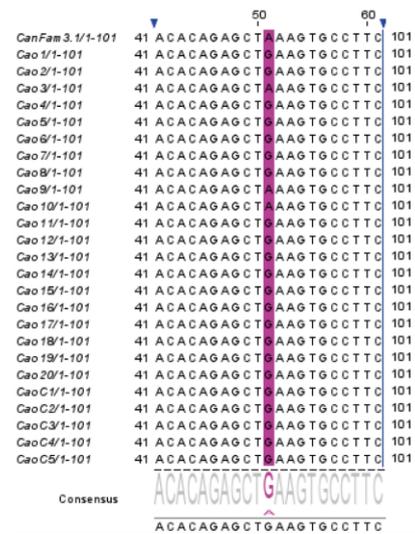
(A) Marcador BICF2P468585



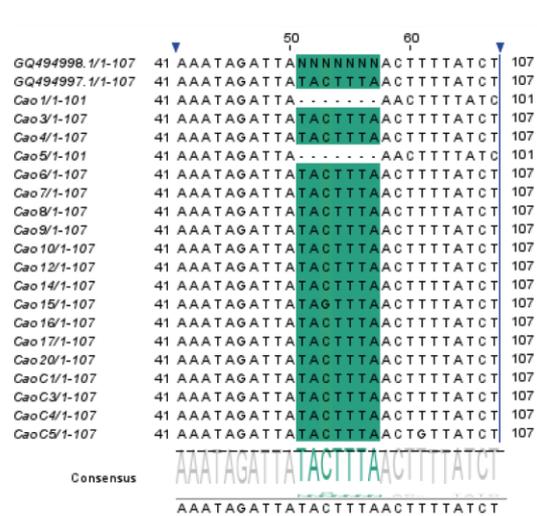
(C) Marcador BICF2P1046032



(B) Marcador BICF2G630834826



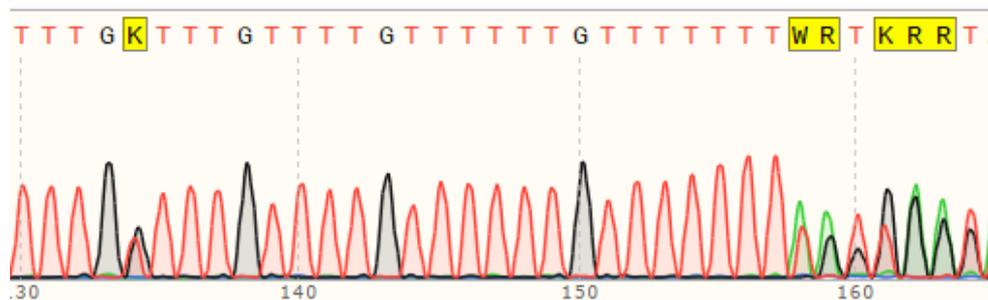
(D) Marcador FBN2



Na lateral esquerda, para cada sequência, estão identificados os cães. A região em azul demonstra a posição do SNP para o marcador BICF2P468585; em roxo a posição do SNP para o marcador BICF2G630834826; em laranja a posição do SNP e a inserção de uma base A na região 23 pb do *amplicon* em 11 sequências para o marcador BICF2P1046032; e em verde está representada a região da deleção, que difere entre as sequências no alinhamento com a sequência GQ494997.1 (homozigoto selvagem) e GQ494998.1 (homozigoto mutante) para o marcador FBN2. Na sequência consenso está identificada a região e o SNP, destacando os nucleotídeos mais frequentes entre as sequências analisadas. Fonte: Autora (2022).

Com relação aos heterozigotos para o marcador BICF2P1046032, oito cães (C1, C3, C5, 1, 2, 6, 17 e 18) apresentaram genótipo heterozigoto A/C. As análises foram feitas a partir da visualização dos cromatogramas gerados. Na figura 11 está representado o cromatograma do cão C3 com o genótipo heterozigoto T/G (sequência antisense) representado pela letra K. A letra K é utilizada para codificar o sítio heterozigoto T/G de acordo com o código de ambiguidade de nucleotídeos IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, disponível em <https://iupac.org/>). Além disso, nota-se também a inserção de um nucleotídeo (T na sequência antisense) em apenas um dos alelos na posição 158 pb do *amplicon* visualizado pelos picos duplos a partir desta posição, que acarretará uma mudança na matriz de leitura a partir deste nucleotídeo.

Figura 11 – Cromatograma representando o genótipo heterozigoto T/G do cão C3 (analisado a partir do sequenciamento com o iniciador antisense) para o marcador BICF2P1046032 e uma possível inserção T na posição 158.

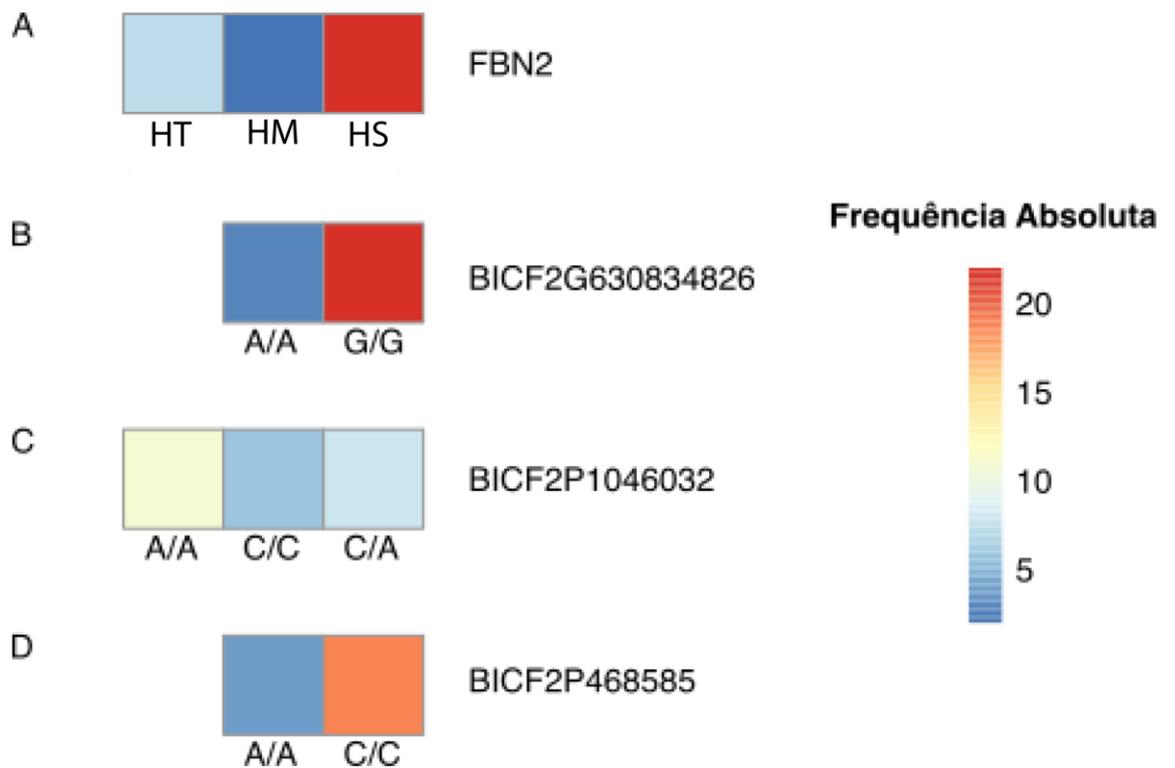


Cada pico representado no cromatograma é correspondente ao nucleotídeo identificado na primeira linha. Sendo a cor vermelha para o nucleotídeo T, verde para A, preto para G e azul para C. A primeira letra K representa a posição do SNP (nucleotídeos G ou T) com dois picos sobrepostos. A letra W, R e K representam os nucleotídeos A ou T, A ou G, T ou G, respectivamente, com dois picos sobrepostos. Fonte: Autora (2022).

A figura 10D representa o alinhamento para o marcador FBN2. Os heterozigotos não foram incluídos no alinhamento, uma vez que a deleção de 7 pb em um único alelo deixa o cromatograma com ruídos na visualização desta região. Para este marcador, foram encontrados cães com os seguintes genótipos: homozigoto selvagem – 17 cães; homozigotos mutantes (com a deleção) – 2 cães; heterozigotos – 6 cães. No grupo selvagem são encontrados tanto cães com fenótipo saudável quanto displásicos. Os dois cães homozigotos mutantes são displásicos e entre os heterozigotos, cinco cães são displásicos (2, 11, 13, 18, 19) e um cão saudável (C2).

Condensando todas as informações anteriores de forma quantitativa, um mapa de calor foi gerado e está representado na figura 12.

Figura 12 – Mapa de calor representando quantitativamente (frequência absoluta) os genótipos encontrados para cada marcador. Nota-se que para os marcadores FBN2 (A) e BICF291046032 (C) há cães heterozigotos, diferentemente encontrado para os marcadores BICF2G630834826 (B) e BICF2P468585 (D).



Os alelos estão representados por cores correspondendo ao número absoluto de cães para cada base. Os marcadores estão separados de A-D. No lado direito está demonstrado a frequência absoluta por cor. HS – Homozigoto selvagem; HM – Homozigoto mutante; HT – Heterozigoto. Fonte: Autora (2022).

6.4 ANÁLISE DE VARIABILIDADE DOS MARCADORES EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS

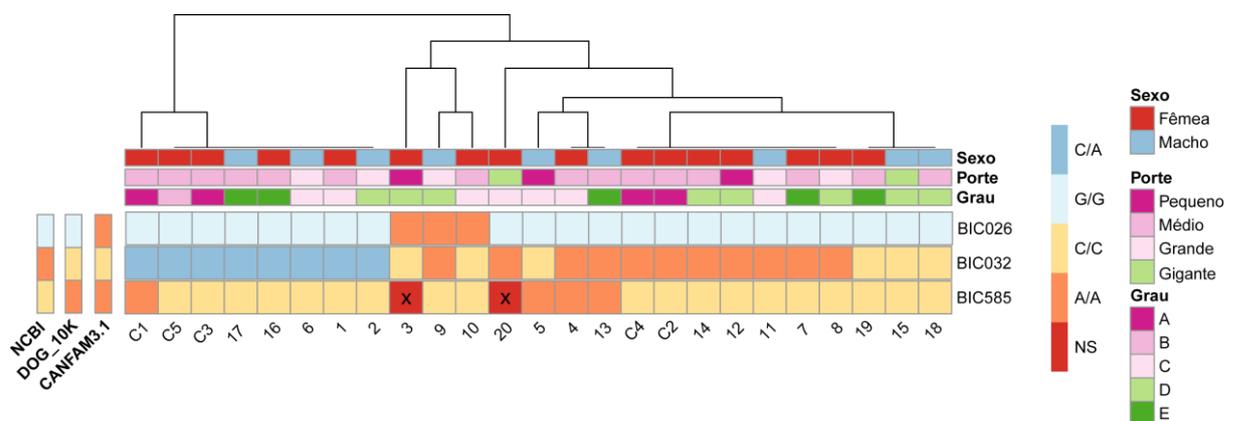
A partir de análise de similaridade com o banco de dados do NCBI, foram observadas apenas 36 sequências disponíveis no banco de dados referentes a sete indivíduos das raças Pastor Alemão (4 sequências), Basenji (9 sequências), Labrador Retriever (19 sequências), Dogue Alemão (3 sequências) e Galgo Italiano (1 sequência). As informações das sequências

para cada marcador, como os alelos encontrados, a identificação (ID) no NCBI e o respectivo indivíduo (cão) correspondente estão disponíveis no Apêndice 3.

Observou-se que das amostras disponíveis no banco de dados referentes ao marcador BICF2P468585, quatro indivíduos eram homozigotos C/C, dois homozigotos A/A e um heterozigoto A/C. Para o marcador BICF2G630834826, seis indivíduos eram homozigotos G/G. Para o marcador BICF2P1046032, foi possível observar quatro indivíduos homozigoto A/A e dois C/C. Por fim, para o marcador FBN2, três indivíduos são homozigoto mutante (del) e quatro indivíduos homozigoto selvagem.

A análise de variabilidade dos marcadores avaliados no presente estudo está representada na figura 13, assim como mostra os três marcadores para cada cão estudado correlacionando o grau de displasia, o porte e o sexo. A posição de cada SNP, os alelos esperados, bem como as frequências alélicas para cada marcador dos cães do estudo estão disponíveis no Apêndice 4. Na figura foram incluídos também os dados obtidos das duas sequências referências Dog10K_Boxer_Tasha e CanFam 3.1, os alelos mais frequentes das sequências não Redundante (NR) descritas anteriormente.

Figura 13 – Figura representativa das variações para os marcadores BICs dos cães estudados e das sequências de duas montagens diferentes do cão Tasha. Com relação as sequências NR, estão representadas as bases mais frequentes para cada marcador. De forma semelhante, a frequência encontrada entre os cães do estudo para cada marcador também está representada. O dendrograma na parte superior da tabela representa o agrupamento dos cães de acordo com o cálculo de distância euclidiana entre os genótipos encontrados.



Os SNPs estão representados por cores, bem como o sexo, porte e grau dos cães incluídos no estudo. C1-C5 representam os cães controle. A coluna frequência representa os alelos mais frequentes no estudo, seguido pelas

sequências não redundantes (NR), Dog10k_Boxer_Tasha e CanFam 3.1. O x nos cães 3 e 20 representa o não sequenciamento destes para o marcador BICF2P468585. NS – Não sequenciado. Fonte: Autora (2022).

A variação encontrada no BICF2P468585 é referente a quatro animais homozigotos A/A, correspondendo uma fêmea de porte pequeno sem displasia (C1) e três cães displásicos: dois de grau C (uma fêmea de porte médio (número 4) e um macho pequeno (número 5)) e um de grau E (um macho de porte médio (número 13)). Os cães número 3 e 20 não foram sequenciados.

Com relação ao marcador BICF2G630834826, os cães que apresentaram os homozigotos A/A foram: uma fêmea de porte médio de grau C (número 10), uma fêmea de porte pequeno (número 3) e um macho de porte gigante (número 9), ambos de grau D.

Ao analisar a variabilidade do marcador BICF2P1046032, tem-se que dos cinco cães controles, três fêmeas foram heterozigotas C/A (duas classificadas como grau B e uma de grau A) e duas homozigotas A/A. Entre os graus, porte e sexo, os heterozigotos C/A também variaram, não sendo possível estabelecer uma relação entre esses achados. Os cães heterozigotos estavam relacionados da seguinte forma: dois cães (número 1 e 6) com grau C, um cão com grau D (número 2) e dois com grau E (número 16 e 17). Ao correlacionar com o grau, os cães (número 5, 10, 3, 15, 18 e 19) que foram homozigotos, estavam distribuídos entre os graus C (dois cães), D (três cães) e E (um cão), não sendo visto em nenhum cão controle. Assim como para os heterozigotos, não foi possível fazer uma relação entre porte e sexo entre os cães que apresentaram o alelo C, no qual entre os seis cães, 50% são fêmeas e 50% machos.

Por fim, para o marcador FBN2, nota-se que o genótipo heterozigoto esteve presente em seis cães (2, 11, 13, 18, 19 e C2), entre porte médio (13, 18, 19 e C2) e grande (2 e 11). Já com relação ao grau, estava disposto entre os graus A, C, D e E. Já o genótipo homozigoto mutante foi identificado em apenas dois cães com grau C: uma fêmea de porte médio (número 1) e um macho de porte pequeno (número 5).

7 DISCUSSÃO

Dada a complexidade da doença, bem como as diferenças genéticas entre raças e populações, este estudo buscou validar quatro marcadores já descritos pela literatura como sugestivos em uma população de raças variadas a fim de obter um progresso notável ao analisar regiões conhecidas em diferentes raças. Visto que é extremamente importante a verificação e validação dos SNPs associados a doença em diferentes raças e populações (AKIS et al., 2020) e que se sugere que a base genética comum possa ser compartilhada entre raças (MIKKOLA et al., 2021).

A DQC é caracterizada como uma doença ortopédica complexa e uma das principais preocupações clínicas na medicina veterinária. É prevalente em cães de grande porte, (COOPMAN et al., 2008), mas também pode afetar cães de pequeno porte (GUILLIARD, 2014), sendo eles cães sem raça definida ou de raça definida (RETTENMAIER et al., 2002). Assim como em outros estudos (WOOD; LAKHANI; DENNIS, 2000; COOPMAN et al., 2008;), cães do sexo feminino com displasia foram prevalentes em relação a machos.

A raça mais prevalente no estudo foi a Border collie e a maior parte dos animais são de porte médio. Isso indica que os estudos futuros devem levar em consideração que a doença afeta todas raças independente do porte, sendo ela pura ou não. Além disso, nenhuma amostra de Pastor alemão foi obtida, cuja raça é uma das mais estudadas pela literatura.

Com relação aos graus e ao analisar de maneira raça-específica, nota-se que a maioria tem displasia moderada. Entretanto, não foi possível realizar muitas associações por conta do número amostral por raça, já que foi obtido apenas um cão para algumas raças (Golden retriever, Spitz alemão, Bulldog alemão, American staffordshire terrier e Cane corso). De acordo com o porte, todos os cães com displasia severa (cinco cães) são de porte médio (SRD, Bulldog Alemão, Bulldog inglês e Border collie), enquanto que os graus C e D estão distribuídos entre os quatro portes. Cães com grau B foram incluídos como saudáveis neste estudo por conta do baixo número de cães saudáveis obtidos. Pois, embora estes cães sejam considerados normais, geralmente não são incluídos no estudo por representarem um fenótipo normal limítrofe (MIKKOLA et al., 2021).

Buscou-se abranger a maior quantidade possível de raças, visto que grande parte dos estudos encontrados na literatura, que visavam encontrar regiões no genoma associadas a DQC, foram conduzidos com animais de grande porte e, geralmente, com apenas uma raça. Raças de grande porte, como Pastor alemão e Labrador retriever, são comumente estudados, inclusive

nos dois trabalhos (MIKKOLA et al., 2019b e FRIEDENBERG et al., 2011) que embasaram este estudo.

Em 2007, Marschall e Distl identificaram dois QTLs no CFA1 associados com a frouxidão articular ao realizar a varredura em todo o genoma em 459 Pastores alemães que nasceram entre 1985 e 2003 na Alemanha. Fels et al. (2014) conduziram um estudo com 843 Pastores alemães também na Alemanha e identificaram SNPs significativos nos CFA33 e CFA34 próximos a genes candidatos funcionais envolvidos na regulação da formação óssea. Dois trabalhos recentes realizados na Finlândia, (MIKKOLA et al., 2019a; MIKKOLA et al., 2019b), também utilizaram cães da raça Pastor alemão com um tamanho amostral de 525 e 775 cães em cada estudo.

Em Labradores retriever *loci* associados a DQC foram estudados por Phavaphutanon et al. (2009) uma colônia de 115 Labradores retrievers que residiam no Instituto Baker para a Saúde Animal de Nova Iorque (TODHUNTER et al., 1999; TODHUNTER et al., 2005). Estes mesmos cães e outros 1550 cães foram estudados para o gene da Fibrilina 2 (FRIEDENBERG et al., 2011). Desta maioria era da raça Labrador retriever, seguido de cães da raça Galgo inglês, provenientes do cruzamento entre Labrador retriever-Galgo inglês e cães de outras 6 raças (Border collie, Pastor alemão, Golden retriever, Rottweiler, Terra-nova e Dogue alemão). Com o intuito de confirmar a associação do gene FBN2 com a displasia, Lavrijsen et al. (2014) mapearam regiões com associação genômica baseado em SNPs para a DQC em 122 cães Labradores retrievers holandeses, mas não encontraram associação com o fenótipo displásico.

Outras raças costumam ser estudadas quando trabalhos são conduzidos de maneira abrangente. Em relação a raças variadas, a literatura foca basicamente em estudos de prevalência da doença (RETTENMAIER et al., 2002; GENOVOIS et al., 2008; WITSBERGER et al., 2008; BELLUMORI et al., 2013; OBERBAUER; KELLER; FAMULA, 2017). Por isso buscou-se incluir e estimar esses cães. Entre cães mestiços e de raça definida, maior parte dos cães do presente estudo são de raça definida. Entretanto, é necessário analisar estes dados com cautela, uma vez que deve ser levado em conta os aspectos sociais e econômicos, pois pode ser que estes dados não refletem a realidade, já que o diagnóstico definitivo da DQC é dispendioso e necessita de sedação para ser realizado.

Embora a sua etiologia não seja bem compreendida, o conhecimento atual indica que a DQC apresenta um padrão de herança poligênica influenciada por fatores ambientais (BARTOLOMÉ et al., 2015; IMPELLIZERI; TETRICK; MUIR, 2000). Fatores como genética e o descompasso positivo entre a ingestão alimentar e o gasto energético estão geralmente

associados ao excesso de peso corporal. A obesidade é um importante fator de risco para doenças ortopédicas (GERMAN, 2006). Como foi obtido apenas o peso físico dos cães, ao analisar este fator, comparando com o peso médio para cada porte, notou-se que apenas dois cães estão acima do peso. Mas, para realizar maiores inferências sobre o risco do sobrepeso nestes dois cães, seria importante avaliar o *score* corporal.

Aplicou-se um questionário com os tutores com o objetivo de associar eventuais características do dia-a-dia do animal que pudessem influenciar no fenótipo displásico e progredir na severidade da doença. Mais de 70% dos tutores relataram que seu cão displásico escorrega com facilidade em pisos lisos. Este resultado era esperado, uma vez que a articulação displásica causa instabilidade (FLÜCKIGER, 2007). Fatores de risco, como exercícios de impacto, estão associados com o aumento no risco de desenvolver a DQC (KRONTVEIT et al., 2012). Ao serem questionados se o cão realizava alguma atividade de impacto antes de completar um ano, mais de 65% dos tutores responderam que não, sugerindo que para estes cães esta variável não influenciou no fenótipo displásico. Os principais indícios que fizeram os tutores procurar um diagnóstico está relacionado ao prognóstico da doença. Indícios como episódios agudos de claudicação dos membros pélvicos, dificuldade em caminhar, levantar, correr e subir escadas são comuns em filhotes, já cães idosos podem apresentar resistência em se exercitar, desconforto na articulação e atrofia muscular do membro pélvico (FRY; CLARK, 1992).

Ao mensurar o estado geral dos cães, notou-se que os cães têm boa qualidade de vida, mas a movimentação após exercício intenso se torna uma limitação para mais de 60% dos cães. Entretanto, na escala de dor, os tutores consideraram que os cães apresentam dor moderada, o que pode ser explicada por serem animais que realizam acompanhamento de reabilitação física.

A maioria dos estudos com marcadores genéticos para displasia (FRIEDENBERG et al., 2011; LAVRIJSEN et al., 2014; MIKKOLA et al., 2019a; MIKKOLA et al., 2019b) baseiam-se no DNA extraído de amostras de sangue periférico. A participação e o cumprimento por parte dos tutores são fundamentais para o sucesso de qualquer estudo em larga escala de doenças caninas. A obtenção de amostras de sangue requer um pessoal treinado e o procedimento invasivo pode impedir a adesão dos tutores nos estudos (MITSOURAS; FAULHABER, 2009.)

Com o intuito de facilitar a participação, as células epiteliais bucais podem ser utilizadas como fonte de DNA (OBERBAUER et al., 2003). Foi possível validar o método de

coleta da mucosa oral utilizando *swab* neste estudo de marcadores genéticos. Os resultados obtidos do sequenciamento a partir das amostras de DNA provenientes dos *swabs* após a padronização das extrações e PCRs foram satisfatórios. Priorizou-se um método de coleta simples, eficaz, não invasivo, que fosse reprodutível e que pudesse ser realizado pelo próprio tutor.

Além de ser uma raça frequentemente estudada, todos os estudos realizados com Pastores alemães mencionados foram realizados em países europeus. A utilização da raça Pastor alemão como apropriada para os estudos de associação, segundo Fels et al. (2014) se deve por ser a maior população de cães de raça definida na Europa, pelo sistema de registro para doença ser consistente e responsável pela coleta de amostras sanguíneas no momento do exame radiográfico, e por ter uma grande variação fenotípica e genotípica para a DQC.

Todos os estudos mencionados foram realizados com tamanho amostral com mais de 100 animais, já haviam sido radiografados e possuíam amostras de sangue armazenados nos institutos de pesquisa em grandes intervalos de tempo, como o Clube de Canil Holandês (Lavrijsen et al., 2014), a Associação Alemã de Pastores Alemães (Fels et al., 2014) e o Instituto Baker para a Saúde Animal de Nova Iorque (FRIEDENBERG et al., 2011). Dessa forma, a obtenção de grandes quantidades de animais acaba sendo viável.

Ao comparar estes estudos com o presente trabalho, o número amostral é inferior. Isto está atrelada a dificuldade em obter animais para o estudo, possivelmente em razão do único pré-requisito para a inclusão do cão que foi o diagnóstico a partir de radiografias da pelve, uma vez que os quadris precisariam estar certificados, pelo menos fenotipicamente. Este procedimento acabou dificultando a obtenção de cães saudáveis, pois por ser um exame com sedação e por ser de alto custo, os tutores optaram por não submeter seus animais a um exame sem correlação clínica. Além disso, alguns tutores que se propuseram a participar do estudo não puderam ter seus cães incluídos, pois estes apresentavam outros distúrbios ortopédicos concomitantes, o que poderia implicar em conflitos genéticos sobre os achados.

Em contrapartida, este estudo se enquadra como pioneiro nos estudos genéticos brasileiros da DQC, pois ao realizar uma busca simples por trabalhos de cunho nacional, encontram-se apenas trabalhos sobre a prevalência da doença (BABÁ, et al., 2019) ou tratamento (MARX et al., 2014; IAMAGUTI; IAMAGUTI; SARTOR, 2009).

Tendo como base o trabalho de Mikkola et al. (2019b) para três marcadores, cujo fundamento se baseia na troca de uma base por outra a partir de um polimorfismo de nucleotídeo

único, o presente estudo buscou reproduzir o estudo com o intuito de validar estes marcadores para uma população de cães de raças variadas distinta da estuda pelo grupo.

Iniciando pelo marcador BICF2P468585, no cromossomo 1, tem-se uma longa região intergênica entre os alelos codificantes de *NOX3* e *ARID1B*. Este *locus* mostrou-se sugestivo com a DQC em três trabalhos desenvolvidos com cães da raça Pastor alemão (MIKKOLA et al., 2019a; MIKKOLA et al., 2019b; WANG et al., 2021). Entretanto, o papel destes alelos e da região intergênica não está claro como correlato ao desenvolvimento de displasia ou osteoartrite (MIKKOLA et al., 2019b).

O SNP BICF2P468585 está localizado a ~196 kb a montante do gene codificante de *NOX3*. *NOX3* faz parte de um conjunto de enzimas (*NOX1*, *NOX2*, *NOX4*, *NOX5*, *DUOX1* e *DUOX2*) da família Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase que estão envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). De maneira geral, a família *NOX* compreende um conjunto de proteínas transmembranares envolvidas no transporte de elétrons através da membrana para reduzir oxigênio a superóxido. O aumento da atividade de *NOX* está associada com doenças cardiovasculares e neurodegeneração (BEDARD; KRAUSE, 2007). As ROS estão envolvidas na defesa imunológica do hospedeiro e em múltiplas vias de sinalização celular (VERMOT et al., 2021). Os efeitos das ROS produzidas por neutrófilos e monócitos estão associados com a destruição da cartilagem e perda óssea em locais desencadeados por processos inflamatórios, como as articulações artríticas (DAUMER; KHAN; STEINBECK, 2000).

Foi sugerida a possível interação entre *NOX3* e duas (2 e 9) metaloproteinases de matriz através da interação proteína-proteínas pela ferramenta STRING (MIKKOLA et al., 2019b), e entre *NOX3* e *TRIO* (MIKKOLA et al., 2019a). O aumento da atividade das metaloproteinases 2 e 9 foi associado ao estado osteoartrítico, demonstrando sua importância na degradação da cartilagem (VOLK et al., 2003). O Fator de troca de nucleotídeos guanina trio Rho (*TRIO*) foi associado com a displasia por Fels et al. (2014) também em Pastores alemães. Mutações no gene codificante para *TRIO*, localizado no cromossomo 34, leva a alterações no desenvolvimento da cartilagem (Fels et al., 2014).

Não há informações sobre a função do Domínio de interação 1B rico em AT (*ARID1B*) em cães. Mas, em humanos, tem um papel importante na ativação do ciclo celular e está envolvido na ativação transcricional e na repressão de genes selecionados a partir da remodelação da cromatina (WILSKER et al., 2004). O gene *ARID1B* está associado com

deficiências intelectuais e na Síndrome de Coffin-Siris (CSS) em humanos (SANTEN; CLAYTON-SMITH, 2014). Sugere-se que sua disfunção afete a expressão de muitos genes durante o desenvolvimento (SOFRONOVA et al., 2022). Além disso, 66% dos pacientes com CSS apresentaram frouxidão na articulação (SANTEN; CLAYTON-SMITH, 2014).

Não houve indícios suficientes com os dados obtidos neste estudo para associar determinado SNP nesse *locus* com o fenótipo de DQC, uma vez que o SNP de menor frequência estava presente tanto em um cão controle quanto em um cão com displasia severa e em cães jovens e idosos. Entretanto, parece haver associação com a osteoartrite e não com os graus de displasia, como encontrou Mikkola et al. (2019b), mas o presente estudo visou abordar apenas a displasia. Além disso, as inferências feitas com os genes são realizadas a partir de estudos com humanos, não tendo ainda, portanto, uma explicação plausível de associação destes alelos com a displasia canina.

Com relação ao SNP BICF2G630834826, localizado no cromossomo 9, próximo ao gene *NOG* (*Noggin*) (MIKKOLA et al., 2019b), estudos indicam que o gene *NOG* possa estar envolvido na redução da congruência articular, pois a diminuição da atividade *nogging* ajuda no reparo de microfraturas e de outros danos causados pelo desgaste mecânico em cães em crescimento (MIKKOLA et al., 2019b).

Em humanos o gene *NOG* tem importante papel na regulação de múltiplas vias de sinalização durante o desenvolvimento, principalmente na formação de articulações e ossos (POTTI; PETTY; LESPERANCE, 2011). Ele codifica um antagonista de proteína morfogenética óssea (BMP) e é expresso no nó, notocorda e somito dorsal (MCMAHON et al., 1998). Em camundongos, a ausência de *nogging* provocou a hiperplasia e falha no início do desenvolvimento articular, uma vez que o excesso de atividade BMP aumenta o recrutamento das células para a cartilagem, formando então longas placas de crescimento (BRUNET et al., 1998). E, em humanos, as mutações no gene *NOG* estão atreladas a diferentes síndromes autossômicas dominantes: (i) sinfalangismo proximal; (ii) síndrome de sinostoses múltiplas; (iii) anquilose do estribo com polegares e dedos dos pés largos; (iv) síndrome da coalização tarso-carpal; e (v) braquidactilia tipo B2 (POTTI; PETTY; LESPERANCE, 2011).

Em cães este marcador está associado fenotipicamente com a posição do centro da cabeça femoral em relação à borda acetabular dorsal (MIKKOLA et al., 2019b). O alelo com a base A foi encontrando apenas em cães displásicos, indicando que a alteração próxima ao gene envolvido na formação óssea e de articulações possa estar associada com a doença. Com relação ao porte não foi possível estabelecer uma associação, uma vez que os três cães homozigotos

eram de porte pequeno, médio e gigante. Já com relação ao grau, os cães eram de graus C e D, demonstrando que talvez haja associação com a displasia leve a moderada, sendo necessários então estudos futuros com um número amostral maior para descartar ou corroborar a associação deste marcador com a displasia.

Com relação ao SNP BICF2P1046032, ele está localizado no cromossomo 28, entre o Domínio culina 1 associado ao CDK2 (*CACUL1*), a ~ 18 e 30 kb a montante, e Dedo de zinco tipo C2HC 1 da família nano (*NANOS1*) a ~163 e 174 kb a montante. Assim como o marcador anterior, ele também foi associado com a posição do centro da cabeça femoral em relação à borda acetabular dorsal (MIKKOLA et al., 2019b).

A CDK2 participa na regulação da progressão do ciclo celular através do controle das ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDKs). A atividade de CDK2 é regulada pelo gene *CAC1/CACUL1*, altamente expresso em tecidos cancerígenos e linhagens de células cancerígenas (KONG; NAN; YIN, 2009). *CACUL1* é uma proteína induzida por estresse e atua como regulador positivo da via de ativação coordenada de genes envolvidos na resposta antioxidante ao estresse e na sobrevivência celular sob estresse oxidativo (KIGOSHI et al., 2015).

O gene humano *NANOS1* regula a expressão de uma metaloproteinase de matriz do tipo 1 de membrana (MT1-MMP) (BONNOMET et al., 2008). A MT1-MMP participa na clivagem de fibras de colágeno do tipo 1 na superfície celular e tem papel importante na atividade colagenolítica (ITOH et al., 2006) para a modelagem de tecidos conjuntivos esqueléticos e extraesqueléticos (HOLMBECK et al., 1999). A deficiência de MT1-MMP em camundongos homozigotos mutantes impactou o desenvolvimento ósseo ao causar dismorfismo craniofacial, artrite, osteopenia grave, displasia esquelética e distúrbios generalizados dos tecidos moles. Ao comparar com os heterozigotos, estes pareciam indistinguíveis dos irmãos da ninhada do tipo selvagem (HOLMBECK et al., 1999).

Com relação a este marcador, obteve-se um resultado diferente do relatado pelo estudo base de Mikkola et al. (2019b). A primeira diferença encontrada foi a presença de cães heterozigotos para este marcador. Esta diferença se deve a técnica de sequenciamento empregada em ambos os trabalhos. Mikkola et al. (2019b) realizaram uma busca por regiões que apresentassem associações através da montagem do genoma dos cães sequenciados por Illumina, enquanto a abordagem deste estudo consistiu em amplificar regiões específicas e a partir disso realizar o sequenciamento por Sanger, sendo possível então identificar estas

sequências. Os algoritmos utilizados no sequenciamento através da plataforma Illumina visam converter chamadas de bases e escores de qualidade em um conjunto de genótipos para cada indivíduo em uma amostra (SONG; LI; ZHANG, 2016). Entretanto, os dados do sequenciamento obtidos após esta análise podem apresentar vieses (GUO et al., 2012; SONG; LI; ZHANG, 2016), como a não identificação de heterozigotos, já que a montagem do genoma se torna dificultosa em organismos diplóides e poliplóides (FUJIMOTO et al., 2014).

Notou-se a inserção de um nucleotídeo A próximo à região do SNP em cães que apresentavam a base A na posição do SNP. Além disso, verificou-se com base no alinhamento das sequências com o genoma de referência CanFam 3.1, que os alelos que apresentam a base C, não apresenta esta inserção, podendo concluir a relação da inserção da base A com o SNP A. A inserção da base não demonstra associação com o fenótipo displásico, pois está presente tanto em animais controle quanto afetados (graus C-E), nos quatro portes de tamanho e entre machos e fêmeas.

Em cães heterozigotos também foi possível identificar uma possível inserção de uma base (Figura 11). Como mostrou-se um padrão nos homozigotos da inserção ser correspondente ao SNP A, infere-se que a inserção nos heterozigotos também seja no alelo com o SNP A. Entretanto, para confirmar a sequência de cada alelo, referente a inserção nos heterozigotos, seria necessário realizar a clonagem e sequenciamento desta região. O genótipo heterozigoto não apresentou associação com a displasia, uma vez que três dos cinco cães controles eram heterozigotos para este marcador. Com relação ao grau também não foi possível encontrar associação, pois estava presente nos cinco graus. Ao analisar por raça se nota que dos oitos cães Border collie incluídos no estudo, cinco apresentaram o genótipo heterozigoto ainda que não seja possível inferir a heterozigosidade com esta raça por conta do tamanho amostral reduzido.

Outro achado interessante foi a presença da base C em seis cães homozigotos e em quatro cães heterozigotos ambos displásicos. Este achado nos leva a sugerir que a base C possa apresentar relação com o fenótipo displásico. Seria interessante utilizar este marcador em trabalhos futuros com um maior número de cães para corroborar ou descartar a possível associação deste marcador com a displasia.

O que se pode discutir em relação ao gene da Fibrilina 2 (FBN2) é que este foi o primeiro a apresentar relação com a displasia em Labradores e em Galgos. Localizado no cromossomo 11, a mutação é referente a uma deleção de 7 pb na posição 189 a 195 no íntron 30 (FRIEDENBERG et al., 2011).

As microfibrilas ricas em fibrilinas encontradas na matriz extracelular proporcionam aos tecidos conjuntivos estabilidade mecânica e propriedades elásticas, além de participar da regulação da formação, crescimento e homeostase de órgãos (RAMÍREZ; DIETZ, 2007). Mutações na FBN2 estão associadas com a Síndrome de Marfan, Aracnodactilia Contratural Congênita (RAMÍREZ; DIETZ, 2007) e Escoliose Idiopática do Adolescente (BUCHAN et al., 2014) em humanos.

No estudo de FBN2 apenas dois cães de grau C apresentaram a deleção nos dois alelos e seis cães foram heterozigotos, sendo um deles uma fêmea controle. Com relação ao genótipo homozigoto selvagem, tantos cães controle quanto afetados apresentam a condição, portanto, não sendo possível fazer associações com a doença na população estudada.

Na análise de comparativa entre as duas versões do genoma de *Canis lupus familiaris*, o CanFam 3.1 (versão utilizada pelo presente estudo) e o Dog10K_Boxer_Tasha, a única divergência encontrada foi para o marcador BICF2G630834826. Esta divergência pode ser explicada por dois possíveis fatores: (i) pelo genótipo heterozigoto para o SNP; ou (ii) inerente a técnica de sequenciamento. O sequenciamento para o CanFam 3.1 foi realizado por Sanger (GCA_000002285.2) e disponibilizado em 2011, enquanto que o Dog10K_Boxer_Tasha (canFam6) através do PacBio (GCA_000002285.4) e disponibilizado em outubro de 2020. Neste estudo não teve nenhum cão heterozigoto para esse marcador e não foi encontrada a informação de que a Tasha apresenta displasia ou não, para serem realizadas maiores inferências sobre estas diferenças encontradas.

Já com relação as análises de similaridade entre as sequências gênicas encontradas, as frequências obtidas foram semelhantes às encontradas pelo nosso estudo. Entretanto, as sequências gênicas encontradas eram referentes a apenas a sete cães de cinco raças diferentes, reforçando ainda mais a escassez de dados sobre a genética canina no geral.

Em humanos, a displasia do desenvolvimento do quadril (DDQ) também é caracterizada como multifatorial, abrangendo fatores genéticos e ambientais (RUBINI et al., 2008), sendo uma das deformidades do quadril mais comuns em crianças (ZHAO et al., 2013). Pouco se sabe sobre os fatores genéticos e os estudos são controversos. SNPs nos genes do colágeno tipo II (COL2A1) e receptor de vitamina D (VDR) foram associados com a osteoartrite secundária à DDQ (GRANCHI et al., 2002), mas Rubini et al. (2008) refutaram este estudo ao excluir a associação. COL2A1 e VDR são genes adjacentes localizados em 12q13

com importante papel na formação da cartilagem e na mineralização óssea (RUBINI et al., 2008).

Três variações no promotor do gene do colágeno tipo I (COL1A1) foram associadas com a DDQ, elencando o gene COL1A1 como um gene candidato para o diagnóstico e tratamento da doença (ZHAO et al., 2013). Através de análises de bioinformática um estudo recente buscou analisar as interações entre 16 genes de suscetibilidade e vias de sinalização correlacionadas com a DDQ. Esses genes estão localizados em 11 cromossomos. Os genes estudados codificam proteínas envolvidas na matriz extracelular, na osteogênese, condrogênese e na remodelação óssea (YANG et al., 2022). Estudos com essa abordagem podem servir de base para trabalhos futuros de validação na DDQ e também podem ser utilizados como marcadores candidatos na DQC, uma vez que a etiologia de ambas é semelhante.

Entretanto, tal validação não foi possível de ser realizada por fatores já discutidos anteriormente. O dendrograma da figura 13 tentou agrupar os genótipos encontrados. Caso houvesse uma associação, os controles ficariam agrupados, demonstrando um padrão distinto dos animais com a doença. Buscou-se, então, alguma associação entre os agrupamentos formados, como a possibilidade de serem da mesma raça. Entretanto, não foram encontradas associações comuns entre os agrupamentos. A literatura também discute a dificuldade em realizar as associações. Na Espanha, um modelo preditivo com sensibilidade de 78% baseado em sete marcadores genéticos foi desenvolvido com base em 775 cães da raça Labrador Retriever (BARTOLOMÉ et al., 2015). Com o intuito de validar este teste, Brunn et al. (2020) buscaram relacionar o *status* radiográfico com o resultado em Labradores retrievers dinamarqueses. No entanto, este grupo de pesquisa não encontrou relação entre os sete SNPs nos Labradores retrievers dinamarqueses e reforçou as diferenças genéticas encontradas entre as populações ao verificar que SNPs incluídos no teste como genes candidatos, não eram funcionais em outra população de cães da mesma raça.

Lavrijsen et al. (2014) mapearam regiões com associação genômica baseado em SNPs para a DQC em 122 Labradores retrievers holandeses. O grupo não encontrou associação com a região do cromossomo 11 que contém o gene da FBN2 e concluiu que as diferenças populacionais se confirmaram com a ausência de associação com este gene, bem como com a distinção feita pela análise de estratificação populacional.

Recentemente, um grupo de pesquisadores buscou validar 46 marcadores genéticos em 1570 cães de dez raças diferentes relatados na literatura como associados com a DQC. Vinte marcadores estão associados com a doença em raças específicas e apenas um *locus* foi validado

entre raças, além de que foram identificados mais de 250 genes candidatos envolvidos na via de nedilação nestes *loci*. Esta via está envolvida em várias funções celulares, incluindo inflamação (MIKKOLA et al., 2021).

No trabalho de Mikkola et al. (2021), os SNPs ss7212922120 e ss7212922159, que são denominados BICF2P468585 e BICF2G630834826 no presente estudo, respectivamente, e o gene da FBN2 (ss7212922142, ss7212922143 e ss7212922150) foram utilizados na validação. Apenas o SNP ss7212922120 foi validado no estudo. O SNP ss7212922155 no CFA11 foi significativo em três raças (Golden retriever, Lagotto romagnolo e Cão de ursos da Carélia) (MIKKOLA et al., 2021). Este poderá servir de base para a validação e exploração de novos estudos em outras populações.

Estudos com um número maior de animais de raças variadas poderiam ser conduzidos para descartar o viés amostral e consolidar estes marcadores para diferentes raças, ou corroborar os resultados deste estudo de que estes marcadores possam ser sugestivos apenas para pastores alemães e/ou labradores. Além disso, com número amostral significativo, será possível aplicar um teste estatístico a fim de validar as diferenças observadas nos dados.

Além disso, pouco se sabe sobre a genética canina no geral. Isso pode ser explicado pela baixa cobertura genômica e pelas escassas informações genéticas de sequências disponíveis nos bancos de dados. Essa escassez de informação foi verificada quando realizamos as análises de similaridade e obtivemos sequências de apenas sete cães. Além de que as informações sobre o genoma completo do cão também são confusas, não tendo um padrão estabelecido de nomenclatura para facilitar o acesso a esses dados.

8 CONCLUSÃO

O tamanho amostral foi o principal limitante, além da notória escassez de informações genéticas dos cães. Não foram encontradas associações significativas para o marcador BICF2P468585 com o fenótipo displásico. O genótipo homozigoto A foi encontrado apenas em cães displásicos para o marcador BICF2G630834826. Foi possível identificar a inserção de um nucleotídeo, o genótipo heterozigoto e a possível relação da base C com o fenótipo displásico no marcador BICF2P1046032. Para o marcador FBN2, o genótipo homozigoto mutante foi encontrado em cães displásicos, podendo estar relacionado com o fenótipo displásico. A frequência dos alelos encontrada, através das análises de similaridade, das sequências gênicas de sete cães disponíveis no banco de dados, foi semelhante às encontradas pelo estudo.

Nesse sentido, por se tratar de um estudo exploratório, este trabalho abre portas para novos estudos nesta área visando identificar novos marcadores, bem como entender como a doença se comporta nas raças variadas. Assim, novas abordagens, como a busca por marcadores compartilhados com humanos ou em raças variadas, podem ser exploradas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABINPET (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação). **2021: Mercado Pet Brasil**. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/mercado/>> Acesso em: 20 jan. 2022.
- AHNER, C. E.; STOKER, A. M.; BOZYNSKI, C. C.; COOK, C. R.; LEARY, E. V.; KUROKI, K.; CRUZ, C. N.; COOK, J. L. Proteins biomarkers in serum and urine for determining presence or absence of hip dysplasia in a canine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 37, n. 4, p. 916-920, 2019.
- AKIS, I.; ATES, A.; ATMACA, G.; OXTABAK, K. O.; ESEN-GURSEL, F.; YARDIBI, H.; ALTUNATMAZ, K.; ERAVCI-YALIN, E.; KARABAGLI, M. The association of genetic polymorphisms of bone formation genes with canine hip dysplasia. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 21, n. 1, p. 40-45, 2020.
- AMERICAN KENNEL CLUB. **Breed weight chart**. Disponível em: <<https://www.akc.org/expert-advice/nutrition/breed-weight-chart/>> Acesso em: 03 out. 2022. 2017.
- ANDERSON, A. Treatment of hip dysplasia. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, p. 182-189, 2011.
- ANDRÉ, C.; GUAGUÈRE, E.; CHAUDIEU, G.; GENEVOIS, J. -P.; DEVAUCHELLE, P. The importance of dogs for comparative pathology and genetics: Examples of shared resources and programmes. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 52, n.3-4, p. 55-70, 2017.
- ARRIZABALAGA, G.; LEHMANN, R. A selective screen reveals discrete functional domains in *Drosophila* Nanos. **Genetics Society of America**, v. 153, p. 1825-1838, 1999.
- BABÁ, A. Y.; OLIVEIRA, C. A. L. de; YOSHIDA, G. M.; COSTA, M. T. C.; RIBEIRO, L. B.; VASCONCELLOS, R. S. Heritability of hip dysplasia: preliminar results for German Shepherd dogs in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 171, 4p., 2019.
- BARTOLOMÉ, N.; SEGARRA, S.; ARTIEDA, M.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, E.; SZCZYPIORSKA, M.; CASELLAS, J.; TEJEDOR, D.; CERDEIRA, J.; MARTÍNEZ, A.; VELASCO, A.; SÁNCHEZ, A. A genetic predictive model for canine hip dysplasia: integration of genome wide association study (GWAS) and candidate gene approaches. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 13p., 2015.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 245-313, 2007.
- BELLUMORI, T. P.; FAMULA, T. R.; BANNASH, D, L.; BELANGER, J. M.; OBERBAUER, A. M. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27.254 cases (1995-2010). **JAVMA**, v. 242, n. 11, p. 1549-1555, 2013.

BONNOMET, A.; POLETTE, M.; STRUMANE, K.; GILLES, C.; DALSTEIN, V.; KILEZTKY, C. The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression. **Oncogene**, v. 27, n. 26, 2008.

BRASS, W. Hip dysplasia in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 166-170, 1959.

BRUNET, L. J.; MCMAHON, J. A.; MCMAHON, A. P.; HARLAND, R. M. *Nogging*, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1455-1457.

BRUUN, C. S.; BANK, A.; STRÖM, A.; PROSCHOWSKY, H. F.; FREDHOLM, M. Validation of DNA test for hip dysplasia failed in Danish Labrador Retrievers. **Animal Genetics**, 3p., 2020.

BUCHAN, J. G.; ALVARADO, D. M.; HALLER, G. E.; CRUCHAGA, C.; HARMS, M. B.; ZHANG, T.; WILING, M. C.; GRANGE, D. K.; BRAVERMAN, A. C.; MILLER, N. H.; MORCUENDE, J. A.; TANG, N. L-S.; LAM, T-P.; NG, B. K-W.; CHENG, J. C-Y.; DOBBS, M. B.; GURNETT, C. A. Rare variants in *FBN1* e *FBN2* are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. **Hum Mol Genet.**, v. 23, n. 19, p. 5271-5282, 2014.

BUTLER, J. R.; GAMBINO, J. Canine Hip Dysplasia: Diagnostic Imaging. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 47, n. 4, p.777-793, 2017.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 421, 2009.

CHANG, M. L.; TERRILL, R. L.; BAUTISTA, M. M.; CARLSON, E. J.; DYER, D. J.; OVERALL, K. L.; HAMILTON, S. P. Large-scale SNP genotyping with canine buccal swab DNA. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 5, p. 428-437, 2007.

CHASE, K.; LAWLER, D. F.; ADLER, F. R.; OSTRANDER, E. A.; LARK, K. G. Bilaterally asymmetric effects of quantitative trait loci (QTLs): QTLs that affect laxity in the right versus left coxofemoral (Hip) joints of the dog (*Canis familiaris*). **American Journal of Medical Genetics** 124A, p. 239-247, 2004.

CBRV (Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária). **Normas do Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV) para avaliação da displasia coxofemoral em cães**. Disponível em: < <http://www.abrv.org.br/arquivos/normas-do-colegio.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2020. 2020

COMHAIRE, F. H.; SCHOONJANS, F. Canine hip dysplasia: The significance of the Norverg angle for healthy breeding. **Journal fo Small Animal Practice**, v. 52, n. 10, p. 536-542, 2011.

COOPMAN, F.; VERHOEVEN, G.; SAUNDERS, J.; DUCHATEAU, L.; VAN-BREE, H. Prevalence of hip dysplasia, elbow dysplasia and humeral head osteochondrosis in dogs breeds in Belgium. **The Veterinary Record**, v. 163, n. 22, p. 654-658, 2008.

COZIER, Y. C.; PALMER, J. R.; ROSENBERG, L. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the black women's health study. **Annals of Epidemiology**, v. 14, n. 2, p. 117-122. 2004.

DAUMER, K. M.; KHAN, A. U.; STEINBECK, M. J. Chlorination of pyridinium compounds: possible role of hypochlorite, *N*-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-like of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. **Glycobiology and extracellular matrices**, v. 275, n. 44, p. 34681-34692, 2000.

DE GRUTTOLA, V. G.; CLAX, P.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; ELLENBERG, S. S.; FRIEDMAN, L.; GAIL, M. H.; PRENTICE, R.; WITTER, J.; ZEGER, S. L. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials: summary of a National Institutes of Health workshop. **Control Clin Trials**, v. 22, n. 5, p.485-502, 2001.

DUELAND, R. T.; ADAMS, W. M.; FIALKOWSKI, J. P.; PATRICELLI, A. J.; MATHEWS, K. G.; NORDHEIM, E. V. Effects of pubic symphysiodesis in dysplastic puppies. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 3, p. 201-217, 2001.

ENSEMBL. **Dog assembly and gene annotation**. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiaris/Info/Annotation>. Acesso em: 03 ago. 2020a.

ENSEMBL. **Mouse assembly and gene annotation**. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Annotation>. Acesso em: 03 ago. 2020b.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FELS, L.; DISTL, O. Identification and validation of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia (CHD) in German Shepherd dogs. **PLoS ONE**, v. 9, n 5, 8p., 2014.

FELS, L. MARSCHALL, Y.; PHILIPP, U.; DISTL, O. Multiple loci associated with canine hip dysplasia (CHD) in German Shepherd dogs. **Mammalian Genome**, v. 25, p. 262-269, 2014.

FCI (Fédération Cynologique Internationale). FCI Requeriments for Official Hip Dysplasia Screening. **Workshop on Hip Dysplasia**, Copenhagen, DK, 2006. Disponível em: <<http://www.fci.be/en/Hip-and-Elbow-Dysplasia-162.html>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

FLÜCKIGER, M. Scoring radiographs for canine hip dysplasia – The big three organizations in the world. **European Journal of Companion Animal Practice**, n. 17, p. 135-140, 2007.

FLÜCKIGER, M. A.; FRIEDRICH, G. A.; BINDER, H. A radiographic strss technique for evaluation of coxofemoral joint laxity in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 1, n. 28, 9 pp., 1999.

FRIEDENBERG, S. G.; ZHU, L.; ZHANG, Z.; FOELS, W. V. D. B.; SCHWEITZER, P. A.; WANG, W.; FISHER, P. J.; DYKES, N. L.; COREY, E.; VERNIER-SINGER, M.; JUNG, S-W.; SHENG, X.; HUNTER, L. S.; MCDONOUGH, S. P.; LUST, G.; BLISS, S. P.; KROTSCHKE, U.; GUNN, T. M.; TODHUNTER, R. Evaluation of a fibrilin 2 gene haplotype associated with hip dysplasia and incipiente osteoarthritis in dogs. **AJVR**, v. 72, n. 4, p. 530-540, 2011.

FRY, T. R.; CLARK, D. M. Canine hip dysplasia: clinical signs and physical diagnosis. **Veterinay Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 22, n. 3, 1992.

FUJIMOTO, M. S.; BODILY, P. M.; OKUDA, N.; CLEMENT, M. J.; SNELL, Q. Effects of error-correction of heterozygous next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 7, 2014.

GARRIDO, C. P.; GUILAK, F.; RAI, M. F. HARRIS, M. D.; LOPEZ, M. J.; TODHUNTER, R. J.; CLOHISY, J. C. Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 7, p. 1807-1817, 2018.

GENOVOIS, J. P.; REMY, D.; VIGUIER, E.; CAROZZO, C.; COLLARD, F.; CACHON, T.; MATIRE, P.; FAU, D. Prevalence of hip dysplasia according to oficial radiographic screening, among 31 breeds of dogs in France. **Vet Com Orthop Traumatol.**, v. 21, n. 1, p. 21-24, 2008.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p; 1940S-1946S, 2006.

GRANCHI, D.; STEA, S.; SUDANESE, A.; TONI, A.; BALDINI, N.; GIUNTI, A. Association of two gene polymorphisms with osteoarthritis secondary to hip dysplasia. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 403, p. 108-117, 2002.

GRUNDSTRÖM, S. **Influence of nutrition at Young age on canine hip dysplasia in German Shepherd dogs.** Licenciate of Veterinary Medicine Degree, Faculty of Veterinary Medicine, Departamento of Equine and Small Animal Medicine, University of Helsinki, 2014.

GUILLIARD, M. The PennHIP method of predicting canine hip dysplasia. **In Practice**, v. 36, p. 66-74, 2014.

GUO, G.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; ZHAO, K.; ZHU, L.; LUST, G.; HUNTER, L.; FRIEDENBERG, S.; LI, J.; ZHANG, Y.; HARRIS, S.; JONES, P.; SANDLER, J.; KROTSCHKE, U.; TODHUNTER, R.; ZHANG, Z. Canine hip dysplasia is predictable by genotyping. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, p. 420-429, 2011.

GUO, Y.; LI, J.; LI, C-I.; LONG, J.; SAMUELS, D.; SHYR, Y. The effect of strand bias in Illumina short-read sequencing data. **BMC Genomics**, v. 13, n. 666, 2012.

HANSEN, T. V. O.; SIMONSEN, M. K.; NIELSEN, F. C.; HUNDRUP, Y. A. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 10, p. 2072-2076. 2007.

HAYWARD, J. J.; CASTELHANO, M. G.; OLIVEIRA, K. C.; COREY, E.; BALKMAN, C.; BAXTER, T. L.; CASAL, M. L.; CENTER, S. A.; FANG, M.; GARRISON, S. J.; KALLA, S. E.; KORNILIEV, P.; KOTLIKOFF, M. I.; MOISE, N. S.; SHANNON, L. M.; SIMPSON, KENNETH, W.; SUTTER, N. B.; TODHUNTER, R. J.; BOYKO, A. R. Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. **Nature Communications**, v. 7, 11p., 2016.

HENRICSON, B.; NORBERG, I.; OLSSON, S. E.; On the etiology and pathogenesis of hip dysplasia: a comparative review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, n. 11, p. 673-688, 1966.

HENRY, G. A. Radiographic development of Canine Hip Dysplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 559-578, 1992.

IAMAGUTI, P.; IAMAGUTI, L. S.; SARTOR, R. Acetabular deepening in the treatment of severe canine hip dysplasia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 163-166, 2009.

IMPELLIVERI, J. A.; TETRICK, M. A.; MUIR, P. Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with hip osteoarthritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 2016, n. 7, 2000.

INSTITUTO PET BRASI. **Gasto mensal dos pets tem que ser levado em conta no orçamento familiar**. Disponível em: < <http://institutopetbrasil.com/imprensa/gasto-mensal-dos-pets-tem-que-ser-levado-em-conta-no-orcamento-familiar/>>. Acesso em: 20 jan. 2022, 2019.

ISHII, Y.; TAKIZAWA, T.; IWASAKI, H.; FUJITA, Y.; MURAKAMI, M.; GROPE, J. C.; TANAKA, K. Nucleotide Polymorphisms in the Canine *Noggin* Gene and their distribution among dog (*Canis lupus familiaris*) breeds. **Biochem Genet.**, v. 50, n. 1-2, 12-18p., 2012.

ITOH, Y.; ITO, N.; NAGASE, H.; EVANS, R. D.; BIRD, S. A.; SEIKI, M. Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. **Mol Biol Cell.**, v. 17, n. 12, p. 5390-5399, 2006.

KIGOSHI, Y.; FUKUDA, T.; ENDO, T.; HAYASAKA, N.; IEMURA, S-I.; NATSUME, T.; TSURUTA, F.; CHIBA, T. CACUL1/CAC1 regulates the antioxidant response by stabilizing Nrf2. **Scientific Reports**, v. 5, n. 12857, 2015.

KÖNIG, H.E; LIEBICH, H-G; MAIERL, J.; **Hindlimbs or Pelvic Limbs (Membra Pelvina)**. In: *Veterinary Anatomy of Domestic Animals: Textbook and Colour Atlas*, 3rd edition, Schattauer GmbH, Hölderlinstrabe 3, 70174 Stuttgart, Germany, p. 215-276, 2007.

KONG, Y.; NAN, K.; YIN, Y. Identification and characterization of CAC1 as a novel CDK2-associated cullin. **Cell Cycle**, v. 8, n. 21, p. 3552-3561, 2009.

KRONTVEIT, R. I.; NODTVEDT, A.; SAEVIK, B. K.; ROPSTAD, E.; TRANGERUD, C. Housing- and exercise-related risk factors associated with the development of hip dysplasia as determined by radiographic evaluation in a prospective cohort of Newfoundlands, Labrador Retrievers, Leonbergs, and Irish Wolfhounds in Norway. **AJVR**, v. 73, n. 6 p. 838-846, 2012.

LAVRIJSEN, I. C. M.; LEEGWATER, P. A. J.; MARTIN, A. J.; HARRIS, S. J.; TRYFONIDOU, M. A.; HEUVEN, H. C.; HAZEWINKEL, H. A. W. Genome wide analysis indicates genes for basement membrane and cartilage matrix proteins as candidates for hip dysplasia in Labrador Retrievers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 7p., 2014.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; KARLSSON, E. K.; JAFFE, D. B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J.; ZODY, M. C.; MAUCELLI, E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; DEJONG, P. J.; KIRKNESS, E.; ALVAREZ, P.; BIAGI, T.; BROCKMAN, W.; BUTLER, J.; CHIN, C-W.; COOK, A.; CUFF, J.; DALY, M. J.; DECAPRIO, D.; GNERRE, S.; GRABHERR, M.; KELLIS, M.; KLEBER, M.; BARDELEBEN, C.; GOODSTADT, L.; HEGER, A.; HITTE, C.; KIM, L.; KOEPFLI, K-P.; PARKER, H. G.; POLLINGER, J. P.; SEARLE, S. M. J.; SUTTER, N. B.; THOMAS, R.; WEBBER, C.; LANDER, E. S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, p. 803-819, 2005.

MÄKI, K.; LIINAMO, A.-E.; OJALA, M. Estimates of genetic parameters for hip and elbow dysplasia in Finnish Rottweilers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p.1141-1148, 2000.

MÄKI, K.; JANSS, L. L. G.; GROEN, A. F.; LIINAMO, A.-E.; OJALA, M. An indication of major genes affecting hip and elbow dysplasia in four Finnish dog populations. **Heredity**, v. 92, p. 402-408, 2004.

MARSCHALL, Y.; DISTL, O. Mapping quantitative trait loci for canine hip dysplasia in German Shepherd dogs. **Mammalian Genome**, v. 18, p. 861-870, 2007.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; SELBACH, I.; SILVA, A. S. da; BRAGA, L. M. G. de M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B. Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, 6p., 2014.

MCMAHON, J. A.; TAKADA, S.; ZIMMERMAN, L. B.; FAN, C-M.; HARLAND, R. M.; MCMAHON, A. Nogging-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. **Genes Dev.**, v. 12, n. 10, p. 1438-1452, 1998.

MIKKOLA, L. L.; HOLOPAINEN, S.; LAPPALAINEN, A. K.; PESSA-MORIKAWA, T.; AUGUSTINE, T. J. P.; ARUMILLI, M.; HYTÖNEN, M. K.; HAKOSALO, O.; LOHI, H.; IIVANAINEN, A. Novel protective and risk loci in hip dysplasia in German Shepherds. **PLoS Genet**, v. 15, n. 7, 2019a.

MIKKOLA, L.; HOLOPAINEN, S.; PESSA-MORIKAWA, T.; LAPPALAINEN, A. K.; HYTÖNEN, M. K.; LOHI, H.; IIVANAINEN, A. Genetic dissection of canine hip dysplasia phenotypes and osteoarthritis reveals three novel loci. **BMC Genomics**, v. 20, n.1027, 13p., 2019b.

MIKKOLA, L.; KYÖSTILÄ, K.; DONNER, J.; LAPPALAINEN, A. K.; HYTONEN, M. K.; LOHI, H.; IIVANAINEN, A. An across-breed validation study of 46 genetic markers in canine hip dysplasia. **BMC Genomics**, v. 20, n. 68, 11p., 2021.

MITSOURAS, K.; FAULHABER, E. A. Saliva as an alternative source of high yield canine genomic DNA for genotyping studies. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 2019, 2009.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **Genome data viewer**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCA_000002285.2>. Acesso em: 23 jun. 2020a.

OBERBAUER, A. M.; GROSSMAN, D. I.; EGGLESTON, M. L.; IRION, D. N.; SCHAFFER, A. L.; PEDERSEN, N. C.; BELANGER, J. M. Alternatives to blood as a source of DNA for large-scale scanning studies of canine genome linkages. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 1, p. 27-38, 2003.

OBERBAUER, A. M.; KELLER, G. G.; FAMULA, T. R. Long-term genetic selection reduced prevalence of hip and elbow dysplasia in 60 dog breeds. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 21p., 2017.

OMIA (Online Mendelian Inheritance In Animals). **Welcome to OMIA**. Disponível em: <<https://omia.org/home/>>. Acesso em: 09 fev. 2022.

OFA (Orthopedic Foundation for Animals). **What is Canine Hip Dysplasia?** Disponível em: <<https://www.ofa.org/diseases/hip-dysplasia>>. Acesso em: 16 de jun. 2020.

OFA (Orthopedic Foundation for Animals). **Breed Statistics**. Disponível em: <<https://www.ofa.org/diseases/breed-statistics#detail>>. Acesso em: 11 de out. 2021.

PHAVAPHUTANON, J.; MATEESCU, R. G.; TSAI, K. L.; SCHWEITZER, P. A.; COREY, E. E.; VERNIER-SINGER, M. A.; WILLIAMS, A. J.; DYKES, N. L.; MURPHY, K. E.; LUST, G.; TODHUNTER, R. Evaluation of quantitative trait loci for hip dysplasia in Labrador Retrievers. **AJVR**, v. 70, n. 9, p. 1094-1101, 2009.

POTTI, T. A.; PETTY, E.; LESPERANCE, M. A comprehensive review of reported heritable noggin-associated syndromes and proposed clinical utility of a more broadly inclusive diagnostic term: NOG-related-symphalangism spectrum disorder (NOG-SSD). **Human Mutation**, v. 32 n. 8, p. 877-886, 2011.

PINNA, S.; PIZZUTI, E.; CARLI, F. Effects of intertrochanteric varus osteotomy on Norberg angle and percent coverage of the femoral head in dysplastic dogs. **J. Vet. Sci.**, v. 14, n. 2, p. 185-191, 2013.

RAMÍREZ, F.; DIETZ, H. C. Fibrillin-rich microfibrils: structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 326-330, 2007.

RETTENMAIER, J. L.; KELLER, G. G.; LATTIMER, J. C.; CORLEY, E. A.; ELLERSIECK, M. R. Prevalence of canine hip dysplasia in a veterinary teaching hospital population. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 43, n. 4, p. 313 – 318, 2002.

ROSA, G. J. M. **Quantitative trait**. In: MALOY, S; HUGHES, K. Brenner's Encyclopedia of Genetics, Academic Press, p. 22-24, 2013.

ROSA, G. J. de M.; ROCHA, L. B. da; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se *microarrays*: delineamento, análise e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Melhoramento, Genética e Reprodução, v. 36, n.0, 2007.

ROYAL CANINI. **Enciclopédia do cão**. Editora Aniwa, volume 4, São Paulo, São Paulo, 2001.

RUBINI, M.; CAVALLARO, A.; CALZOLARI, E.; BIGHETTI, G.; SOLLAZZO, V. Exclusion of COL2A1 and VDR as developmental dysplasia of the hip genes. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 466, n. 4, p. 878-883, 2008.

SANTEN, G. W. E.; CLAYTON-SMITH, J. The *ARID1B* phenotype: what we have learned so far. **American Journal of Medical Genetics**, v. 166, n. 3, 2014.

SCHACHNER, E. R.; LOPEZ, M. J. Diagnosis, prevention, and management of canine hip dysplasia: a review. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 181-192, 2015.

SCHULZ, K. S. **Diseases of the joints**. In: Small Animal Surgery, 4th edition, Fossum, T. W., Elsevier, St. Louis, Missouri, p. 1215-1374, 2013.

SCHMAEDECKE, A. SAUT, J. P. E.; FERRIGNO, C. R. A. A quantitative analysis of the nerve fibres of the acetabular periosteum of dogs. **Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology**, v. 21, n. 5, p. 413-417, 2008.

SMITH, G. K.; BIERY, D. N.; GREGOR, T. P. New concepts of coxofemoral joint stability and development of a clinical stress-radiographic method for quantitating hip joint laxity in the dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 196, n. 1, p. 59-70, 1990.

SMITH, G. K. Canine hip dysplasia: pathogenesis, diagnosis and genetic control. **Veterinary Quarterly**, v. 20, n. 1, 1998.

SOFRONOVA, V. FUKUSHIMA, Y.; MASUNO, M.; NAKA, M.; NAGATA, M.; ISHIHARA, Y.; MIYASHITA, Y.; ASANO, Y.; MORIWAKI, T.; IWATA, R.; TERAWAKI, S.; YAMANOUCHI, Y.; OTOMO, T. A novel nonsense variant in *ARID1B* causing simultaneous RNA decay and exon skipping is associated with Coffin-Siris syndrome. **Hum Genome Far.**, v. 9, n. 26, 2022.

SONG, K.; LI, L.; ZHANG, G. Coverage recommendation for genotyping analysis of highly heterologous species using next-generation sequencing technology. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35736, 2016.

THALMANN, O.; PERRI, A. R. **Paleogenomic inferences of dog domestication**. In: LINDQVIST, C.; RAJORA, O. Paleogenomics. Population Genomics. Springer, Cham, 2018.

TKC (The Kennel Club). **Hip dysplasia and breeding advice**. Disponível em: <<https://www.thekennelclub.org.uk/health/for-breeders/complex-inherited-disorders/bvacc-health-schemes/bvacc-hip-dysplasia-scheme/>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

TODHUNTER, R. J.; MATEESCU, R.; LUST, G.; BURTON-WURSTER, N. I.; DYKES, N. L.; BLISS, S. P.; WILLIAMS, A. J.; VERNIER-SINGER, M.; COREY, E.; HARJES, C.; QUAAS, R. L.; ZHANG, Z.; GILBERT, R. O.; VOLKMAN, D.; CASELLA, G.; WU, R.; ACLAND, G. M. Quantitative trait loci for hip dysplasia in a crossbreed canine pedigree. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 720-730, 2005.

TODHUNTER, R. J.; ACLAND, G. M.; OLIVIER, M.; WILLIAMS, A. J.; VERNIER-SINGER, M.; BURTON-WURSTER, N.; FARESE, J. P.; GRÖHNMY, T.; GILBERT, R. O.; DYKES, N. L.; LUST, G. Na outcrossed canine pedigree for linkage analysis of hip dysplasia. **The American Genetic Association**, v. 90, p. 83-92, 1999.

VAN HAGEN, M. A. E.; DUCRO, B. J.; BROEK, J. V. D. KNOL, B. W. Incidence, risk factors, and heritability estimates of hind limb lameness caused by hip dysplasia in a birth cohort of Boxers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 307-312, 2005.

VAYSSE, A.; RATNAKUMAR, A.; DERRIEN, T.; AXELSSON, E.; PIERLBERG, G. R.; SIGURDSSON, S.; FALL, T.; SEPPÄLÄ, E. H.; HANSEN, M. S. T.; LAWLEY, C. T.; KARLSSON, E. K.; BANNASCH, D.; VILÀ, C.; LOHI, H.; GALIBERT, F.; FREDHOLM, M.; HÄGGSTRÖM, J.; HEDHAMMAR, A.; ANDRÉ, C.; LINDBLAD-TOH, K.; HITTE, C.; WEBSTER, M. T. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. **PLoS Genet**, v. 7, n. 10, 2011.

VERMOT, A.; PETIT-HÄRTLEIN, I.; SMITH, S. M. E.; FIESCHI, F. NADPH oxidases (NOX): an overview from Discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n. 6, 2021.

VOLK, S. W.; KAPATIN, A. S.; HASKINS, M. E.; WALTON, R. M.; D'ANGELO, M. Gelatinase activity in synovial fluid and synovium obtained from healthy and osteoarthritic joints of dogs. **Am J Vet Res.**, v. 64, n. 10, p. 1225-1233, 2003.

WANG, S.; STRANDBERG, E.; ARVELIUS, P.; CLEMENTS, D. N.; WIENER, P.; FRIEDRICH, J. Genome-wide association studies for canine hip dysplasia in single and multiple populations – implications and potential novel risk loci. **BMC Genomics**, v. 22, 2021.

WATERHOUSE, A. M. PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioninformatics**, v. 25, n. 9, p.1189-1192, 2009.

WILSKER, D.; PATSIALOU, A.; ZUMBRUN, S. D.; KIM, S.; CHEN, Y.; DALLAS, P. B.; MORAN, E. The DNA-binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF complexes. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 1345-1353, 2004.

WITSBERGER, T. H.; VILLAMIL, J. A.; SCHULTZ, L. G.; HAHN, A. W.; COOK, J. L. Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs. **JAVMA**, v. 232, n. 12, p. 1818-1824, 2008.

WOOD, J. L. N.; LAKHANI, K. H.; DENNIS, R. Heritability and epidemiology of canine hip-dysplasia score in flat-coated retrievers and Newfoundlands in the United Kingdom. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, n. 2, p. 75-86, 2000.

ZHAO, L.; TIAN, W.; PAN, H.; ZHU, X.; WANG, J.; CHENG, Z.; CHENG, L.; MA, X.; WANG, B. Variations of the COL1A1 gene promoter and the relation to developmental dysplasia of the hip. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 17, n. 11, p. 840-843, 2013.

ZHU, L.; ZHANG, Z.; FRIEDENBERG, S.; JUNG, S. W.; PHAVAPHUTANON, J.; VERNIER-SINGER, M.; COREY, E.; MATEESCU, R.; DYKES, N.; SANDLER, J.; ACLAND, G.; LUST, G.; TODHUNTER, R. The long (and winding) road to gene Discovery of canine hip dysplasia. **The Veterinary Journal**, n. 181, p. 97-110, 2009.

YANG, W.; JIN, G.; QIAN, K.; ZHANG, C.; ZHI, W.; YANG, D.; LU, Y.; HAN, J. Comprehensive bioinformatics analysis of susceptibility genes for developmental dysplasia of the hip. **Intractable & Rare Diseases Reserach**, v. 11, n. 2, p. 70-80, 2022.

APÊNDICE 1 – Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do pesquisador principal: Patrícia Hermes Stoco

Razão Social e Ciaep instituição da Ceua que aprovou: Universidade Federal de Santa Catarina

Objetivos do estudo

O seu cão está sendo convidado pela Bióloga Carolina Leite Martins, pesquisadora da Universidade Federal de Santa Catarina, para participar da pesquisa intitulada “Investigação de quatro marcadores sugestivos para displasia do quadril canino em uma população de raças variadas”. O seu cão foi selecionado para participar do estudo por apresentar idade superior a um ano e por ter sido identificado (ou apontado) com possíveis problemas locomotores pela Médica Veterinária Amanda Adriana da Silva (CRMV-07024).

A Displasia do Quadril Canino é uma doença ortopédica com alta prevalência em cães de grande porte que afeta as mais variadas raças, independentemente de serem cães de raça definida ou não. A doença tem como característica a frouxidão excessiva e malformação das articulações do quadril, levando ao desgaste da cartilagem articular e instabilidade. Isso pode causar dor ao seu cão e dificuldades na locomoção. Atualmente, o diagnóstico definitivo é obtido a partir de radiografias da pelve. Essas radiografias são padronizadas e o cão recebe uma pontuação final que varia desde o grau A (articulação normal) até o grau E (forma mais grave da doença). A causa da doença é incerta, mas estudos indicam que ela tem relação com fatores genéticos e ambientais. Quatro marcadores vêm sendo sugeridos para a displasia. Esses marcadores têm associação com genes envolvidos na formação óssea e na atividade da cartilagem. Além disso, sabe-se que esses marcadores diferem entre as raças e entre as populações de cães. Nesse sentido, nosso estudo tem como objetivo investigar esses marcadores em seu cão e em outros cães de Florianópolis com e sem displasia clinicamente detectável para que possamos compreender melhor os efeitos genéticos da doença nos cães da nossa cidade.

Procedimentos a serem realizados com os animais

Todos os procedimentos realizados no seu cão serão em conjunto com a médica veterinária, que utilizará protocolos de assepsia e materiais estéreis. A radiografia para confirmar o diagnóstico será realizada previamente pela Médica Veterinária e o seu cão estará sedado com anestesia geral. Para a realização do estudo, precisamos ter acesso aos dados clínicos do seu cão e das radiografias realizadas e necessitamos também coletar uma única vez amostras de saliva através do método de raspagem de mucosa bucal com swabs estéreis. As visitas serão realizadas no consultório da Médica Veterinária e serão divididas em dois momentos, na primeira visita será solicitado o acesso aos dados clínicos e radiográficos do seu animal e na segunda, será feita a extração das amostras de saliva. Estas amostras serão utilizadas para extrair DNA para processamento e sequenciamento. As amostras serão registradas, analisadas e armazenadas no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC) e serão utilizadas somente para o estudo proposto. Priorizamos a coleta de amostras a partir do swab bucal, entretanto, há casos em que as amostras obtidas por esse método não são possíveis de realizar a extração de DNA, por isso, poderemos solicitar a coleta de sangue venoso. Para isso, será necessária uma terceira visita para coletar de 4 a 5ml de sangue venoso com agulha e seringa estéreis e os possíveis desconfortos para o animal constam de dor à picada da agulha.

Potenciais riscos para os animais

Tanto o método de swab bucal quanto a retirada de sangue não trarão riscos ao seu cão

Benefícios

O benefício de estar participando deste estudo consiste no conhecimento dos efeitos genéticos da DQC no seu animal e na região de Florianópolis, contribuindo também para o entendimento das causas da doença. Você, a médica veterinária, os responsáveis pelo estudo e a UFSC não receberão nenhum incentivo financeiro para este estudo, de forma que você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, além de contribuir com o avanço científico no conhecimento desta doença. As despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é voluntária. Seu animal poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele.

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

A Médica Veterinária responsável pelo seu animal será a Dra Amanda Adriana da Silva, inscrita no CRMV sob o n 07024. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal, Dra. Patrícia Hermes Stoco, também se responsabilizará pelo bem-estar do seu animal durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal:

Tel. de emergência: + (48) 3721- 2957 Dra Patrícia Hermes Stoco

Endereço: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sala 312, e-mail: patricia.stoco@ufsc.br.

Para conhecermos mais e entendermos melhor o dia-a-dia do seu cão, responda o questionário a partir da leitura do QR Code abaixo:



Para acessar é só apontar a câmera do seu celular que você será redirecionado para um formulário do Google. Se possível, e caso você tenha, anexe o raio-x do seu animalzinho no último item do formulário.

Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao animal pelo qual sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do meu animal, identificado a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

Florianópolis, ____ / ____ / ____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Nome:

Documento de Identidade:

Identificação do animal:

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

APÊNDICE 2 – Questionário aplicado aos tutores



Conte-nos mais sobre seu melhor amigo

Tutor	<hr/>	
Endereço	<hr/>	
Cidade/Estado	<hr/>	
Telefone	<hr/>	
Nome do cão	<hr/>	
Raça	Sexo:	<input type="checkbox"/> Fêmea <input type="checkbox"/> Macho
Idade	Peso:	<hr/>
Porte	<hr/>	

Queremos conhecer melhor seu/sua amigo/amiga! Conte-nos algumas características gerais sobre o local onde você e seu amigo/sua amiga moram e sobre a saúde geral dele/dela:

- Você mora em casa ou apartamento?

Casa Apartamento
- O piso da sua residência é liso?

Não Sim. Qual o material?
- Em relação à pergunta anterior, o seu cão/sua cadela escorrega com facilidade?

Não Sim.
- Antes de completar 1 ano, seu cão/ sua cadela praticava alguma atividade de impacto, como saltos e exercícios físicos intensos?

Não Sim. Qual atividade?
- Você notou alguma diferença na capacidade locomotora, ou até mesmo notou que seu animal sente dor quando se locomove ou se levanta?

APÊNDICE 3 – Identificação e dados gerais dos cães participantes do estudo

Grau	Identificação	Nome	Raça	Porte	Sexo	Idade	Grupo
A	C2	Lola	SRD	M	Fêmea	7 anos	Controle
A	C3	Maya	Border collie	M	Fêmea	5 anos	Controle
A	C4	Lua	Bulldog inglês	M	Fêmea	11 anos	Controle
B	C1	Rayza	Border collie	M	Fêmea	11 anos	Controle
B	C5	Sarah	Border collie	M	Fêmea	10 anos	Controle
C	1	Vita	Border collie	M	Fêmea	4 anos	Afetado
C	4	Xayáh	Border collie	M	Fêmea	1 ano	Afetado
C	5	Thor	Pug	P	Macho	6 anos	Afetado
C	6	Elvis Presley	Labrador retriever	G	Macho	11 anos	Afetado
C	10	Chéryy	SRD	M	Fêmea	20 anos	Afetado
C	11	Zeus	Labrador retriever	G	Macho	16 anos	Afetado
C	14	Mia	Border collie	M	Fêmea	5 anos	Afetado
C	20	Frida	Cane corso	GG	Fêmea	1 ano	Afetado
D	2	Zeus	Golden retriever	G	Macho	1 ano	Afetado
D	3	Pérola	Pug	P	Fêmea	12 anos	Afetado
D	8	Meg	SRD	G	Fêmea	9 anos	Afetado
D	9	Jack	Rottweiler	GG	Macho	13 anos	Afetado
D	12	Nina	Spitz alemão	P	Fêmea	9 meses	Afetado
D	15	Urso	Rottweiler	GG	Macho	6 anos	Afetado
D	18	Hussein	American staffordshire terrier	M	Macho	4 anos	Afetado
E	7	Cacau	SRD	M	Fêmea	4 anos	Afetado
E	13	Guinness	Bulldog alemão	M	Macho	9 anos	Afetado
E	16	Chiara	Bulldog inglês	M	Fêmea	7 anos	Afetado
E	17	Obi	Border collie	M	Macho	2 anos	Afetado
E	19	Uainy Mari	Border collie	M	Fêmea	7 meses	Afetado

APÊNDICE 4 – Resultado da análise de similaridade, através do BLAST, das sequências gênicas disponíveis para cada marcador. Na coluna da direita estão descritos os cães correspondentes das IDs encontradas no NCBI. Nota-se que os sete cães encontrados correspondem a cinco raças.

Marcador	Alelo	ID*	Cão
BICF2P468585	A	CM021962.1	Mischka breed German Shepherd
		CM016431.2	MU ID 185726 breed Basenji
	C	NW 024010403.1	SID07034 breed Labrador retriever
		CM025100.1	
		CP050628.1	Labrador retriever
		CP050602.1	
		CM016569.1	Zoey breed Great Dane
		BV268907.1	ItalianGreyhound
	A/C	CM023390.1 (C)	UNSW-BAS-2019 breed Basenji
		CM023363.1 (A)	
BICF2G630834826	G	NW 024010411.1	SID07034 breed Labrador retriever
		NC 051813.1	
		CM025108.1	
		CP050635.1	Labrador retriever
		CP050593.1	
		CM023371.1	UNSW-BAS-2019 breed Basenji
		CM021970.1	Mischka breed German Shepherd
		CM016577.1	Zoey breed Great Dane
		CM016439.2	MU ID 185726 breed Basenji
BICF2P1046032	C	CM023390.1	UNSW-BAS-2019 breed Basenji
		CM016458.2	MU ID 185726 breed Basenji
	A	CM016596.1	Zoey breed Great Dane
		CM021989.1	Mischka breed German Shepherd
		CM025127.1	SID07034 breed Labrador retriever
		NC 051832.1	
		NW 024010430.1	
		CP050584.1	Labrador retriever
CP050626.1			
FBN2	Homozigoto selvagem	CM016441.2	MU ID 185726 breed Basenji
		CM021972.1	Mischka breed German Shepherd
		CM023373.1	UNSW-BAS-2019 breed Basenji
		CP050630.1	Labrador retriever
	CP050600.1		
	Homozigoto mutante	NW 024010413.1	SID07034 breed Labrador retriever
		NC 051815.1	
		CM025110.1	

*ID: identificação das sequências gênicas disponíveis no NCBI.

APÊNDICE 5 – Associação dos SNPS com a displasia por grau. As frequências para cada marcador foram calculadas levando em consideração o grau de displasia.

Grau	Marcador	CFA	Locus ^a	Alelos ^b	Frequência
A	BICF2P468585	1	45,382,633	A/C	0,0/0,13
	BICF2G630834826	9	31,477,907	A/G	0,0/0,12
	BICF2P1046032	28	29,111,565	C/A/heterozigoto	0,0/0,08/0,0
	FBN2	11	íntron 30	del/in/heterozigoto	0,0/0,08/0,04
B	BICF2P468585	1	45,382,633	A/C	0,04/0,04
	BICF2G630834826	9	31,477,907	A/G	0,0/0,08
	BICF2P1046032	28	29,111,565	C/A/heterozigoto	0,0/0,0/0,08
	FBN2	11	íntron 30	del/in/heterozigoto	0,0/0,08/0,0
C	BICF2P468585	1	45,382,633	A/C	0,08/0,22
	BICF2G630834826	9	31,477,907	A/G	0,04/0,28
	BICF2P1046032	28	29,111,565	C/A/heterozigoto	0,08/0,16/0,08
	FBN2	11	íntron 30	del/in/heterozigoto	0,04/0,24/0,04
D	BICF2P468585	1	45,382,633	A/C	0,0/0,26
	BICF2G630834826	9	31,477,907	A/G	0,08/0,20
	BICF2P1046032	28	29,111,565	C/A/heterozigoto	0,12/0,12/0,04
	FBN2	11	íntron 30	del/in/heterozigoto	0,0/0,20/0,08
E	BICF2P468585	1	45,382,633	A/C	0,04/0,17
	BICF2G630834826	9	31,477,907	A/G	0,0/0,20
	BICF2P1046032	28	29,111,565	C/A/heterozigoto	0,04/0,08/0,08
	FBN2	11	Íntron 30	del/in/heterozigoto	0,0/0,12/0,08

^a Posição no cromossomo canino. ^b Representação dos alelos na ordem do menos frequente, mais frequente e heterozigoto para os marcadores BICF2P1046032 e FBN2.