

Título original:

Epistatic Interaction of the Melanocortin 1 Receptor and Agouti Signaling Protein Genes Modulates Wool Color in the Brazilian Creole Sheep

Autores:

Diego Hepp, Gislene Lopes Gonçalves, Gilson Rudinei Pires Moreira, and Thales Renato Ochotorena de Freitas

Publicado em:

Journal of Heredity, 2016, 1–9

doi:10.1093/jhered/esw037

Tradução:

Diego Hepp

(diego.hepp@gmail.com)

Interação epistática entre os genes *Receptor da Melanocortina 1* e *Proteína Sinalizadora Agouti* regula a cor da lã nos ovinos crioulos brasileiros

Diego Hepp, Gislene Lopes Gonçalves, Gilson Rudinei Pires Moreira e Thales Renato Ochotorena de Freitas

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile; Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

Diferentes genes de pigmentação têm sido associados com a diversidade na coloração nas espécies de animais domésticos. Os genes *receptor da melanocortina 1* (*MC1R*), *proteína sinalizadora agouti* (*ASIP*), *proteína relacionada à tirosinase 1* (*TYRP1*) e *homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4* (*KIT*) são genes candidatos a responsáveis pela variação na coloração da lã nas raças ovinas. Embora a influência desses genes tenha sido descrita em algumas raças, em muitas outras o efeito da interação entre os genes subjacentes à cor da lã não foi investigada. Os ovinos crioulos brasileiros são uma raça local com uma ampla variedade de cores na lã, variando entre o preto e o branco com diversos tons intermediários. Nós analisamos neste estudo a influência dos genes *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT* no controle da cor da lã nesta raça. Um total de 410 amostras foi analisado, incluindo 148 indivíduos brancos e 262 pigmentados. Os polimorfismos nos genes *MC1R* e *ASIP* foram significativamente associados com a segregação da lã branca e colorida. O alelo dominante no *MC1R* (E^D p.M73K e p.D121N) estava presente apenas em animais coloridos. Todos os indivíduos brancos eram homocigotos para o alelo recessivo do *MC1R* (E^+) e portadores do alelo duplicado do gene *ASIP*. O experimento de expressão gênica demonstrou que apenas os portadores da cópia duplicada do gene *ASIP* apresentam níveis elevados do produto do gene na pele, não sendo detectada expressão nos homocigotos para a cópia simples do gene. Estes resultados demonstram que a interação epistática entre os genótipos dos genes *MC1R* e *ASIP* é responsável pela notável variação na coloração na raça crioula.

Palavras-chave: receptores da melanocortina; ovinos nativos; genética da cor da lã;

Introdução

Os animais domésticos apresentam uma ampla variedade de fenótipos de cores na pelagem, os quais são determinados pela produção do pigmento melanina nos melanócitos localizados na pele e nos folículos pilosos (Cieslak et al. 2011). Dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina, são responsáveis pelas cores preto/marrom e vermelho/amarelo, respectivamente (Slominski et al. 2004). O fenótipo da coloração é influenciado por um grande número de genes envolvidos em diferentes estágios da melanogênese, da migração e maturação dos melanócitos até a produção da melanina (Hoekstra, 2006). Polimorfismos em alguns desses genes foram associados com a variação na cor da pelagem em espécies domésticas (Cieslak et al. 2011). Dentre estes, os loci *Extensão* e *Agouti* desempenham papéis principais na regulação da quantidade relativa de eumelanina e feomelanina produzida. O locus *Extensão* codifica para o receptor da melanocortina 1 (MC1R). Este receptor é responsável pela troca entre a síntese de feomelanina para eumelanina através do aumento na atividade da enzima tirosinase por meio da sinalização por AMPc após a ligação do hormônio melanócito estimulante (α -MSH) ao receptor (Robbins et al. 1993). O locus *Agouti* codifica a proteína sinalizadora agouti (ASIP), uma pequena molécula sinalizadora parácrina que antagoniza com o α -MSH pela interação com o MC1R. A ASIP inibe a cascata de sinalização que ativa as enzimas melanogênicas, resultando na diminuição da produção de eumelanina (Graham et al. 1997).

A coloração nos ovinos é uma característica importante, com aplicações na produção de fibras e no reconhecimento das raças (Fontanesi et al. 2011). Våge e colaboradores (1999) descreveram duas mutações no gene *MC1R* (p.M73K e p.D121N) na raça Norwegian Dala que resultam na ativação constitutiva do receptor. As mutações são responsáveis pelos alelos selvagem (E^+ : p.73M e p.121D) e preto dominante (E^D : p.73K e p.121N) e foram associadas com a cor preta nas raças Merino, Damara, Corriedale (Våge et al. 2003), Manchega (Calvo et al. 2006), Castellana, Karakul (Royo et al. 2008), Massese (Fontanesi et al. 2010a), Crioula (Hepp et al. 2012) e Minxian Black-fur (Yang et al. 2013a). Entretanto, em algumas raças ovinas que possuem fenótipos coloridos como, por exemplo, Aragonesa, Salz, Norwegioan Pelt, Soay, Nanping Black-boned, Romney Marsh Black-boned, Xalda, Dubian e Privorian, o alelo dominante E^+ do *MC1R* não foi encontrado, indicando que outros genes estão envolvidos na regulação do fenótipo da cor nos ovinos (Våge et al. 2003; Beraldi et al. 2006; Royo et al. 2008; Fontanesi et al. 2012; Traoré et al. 2012).

O gene *ASIP* ovino foi caracterizado por Norris e Whan (2008), que identificaram uma duplicação em tandem de 190 kb na raça Merino, incluindo a região codificante dos genes *ASIP* e *AHCY*, e a região promotora do gene *ITCH* como causadora do alelo branco dominante (A^{Wt}). O fenótipo branco é causado pela expressão ubiqüitária do gene *ASIP*. Polimorfismos na região codificante do *ASIP* foram associados com o alelo recessivo não-agouti (A^a) (Smit et al. 2002; Norris e Whan, 2008). Variações no gene *ASIP* também foram associadas com a coloração em Soay, Massese e em duas raças Pramenka, Dubian e Privorian. Diferentes fenótipos ocorreram em associação com os haplótipos contendo a cópia duplicada (A^D) e simples (A^N) do *ASIP* nestas raças (Gratten et al. 2010; Fontanesi et al. 2011; 2012).

Até agora, porém, a interação entre os genes *MC1R* e *ASIP* na determinação da cor da lã não foi completamente investigada em raças com uma ampla variedade de fenótipos de coloração. Os ovinos crioulos brasileiros são um notável caso para estudo devido a sua alta diversidade de cores na lã, do preto ao branco e incluindo diversos tons intermediários de cinza ao marrom (Gonçalves et al. 2010; Hepp et al. 2012). Esta raça nativa é descendente dos animais

introduzidos no sul do Brasil pelos colonizadores europeus no século XVII (Henkes et al. 1993). Hepp e colaboradores (2012) demonstraram a influência do gene *MC1R* na cor da lã nos ovinos crioulos. Foram analisados fenótipos pretos, marrons, cinza escuros, cinza claros e brancos. Todos os indivíduos com o alelo E^D foram coloridos, enquanto os brancos foram homocigotos para o alelo E⁺. Entretanto, alguns animais coloridos apresentaram o genótipo homocigoto para o alelo E⁺, indicando que pelo menos um segundo gene pode estar envolvido na expressão do fenótipo da cor nesta raça, e esta possibilidade foi explorada no presente trabalho.

Além dos genes *MC1R* e *ASIP* outros genes candidatos podem estar envolvidos no controle da coloração em ovinos. A proteína relacionada à tirosinase 1 (TYRP1) é o produto do locus *marrom* e está envolvida na síntese de eumelanina agindo como uma DHICA oxidase (Slominski et al. 2004). O gene *TYRP1* foi associado com a variação na cor em outras espécies, incluindo cabras (Becker et al. 2015), suínos (Ren et al. 2011) e bovinos (Berryere et al. 2003), e com o albinismo oculocutâneo tipo 3 em humanos (Rooryck et al. 2006). Em ovinos o *TYRP1* foi descrito como responsável pelo locus da cor da pelagem na raça Soay (Beraldi et al. 2006; Gratten et al. 2007), com a substituição não-sinônima c.869G>T (p.C290F) resultando no fenótipo claro recessivo.

Além deste, o gene *KIT* (*homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4*) codifica um receptor tirosina quinase com função na hematopoiese, gametogênese e na melanogênese, regulando o crescimento e proliferação celular. Alterações no gene *KIT* podem afetar a produção de pigmentos, levando a fenótipos de manchas brancas ou totalmente brancos, e foram associadas com mudanças na pigmentação em diferentes espécies, incluindo suínos (Fontanese et al. 2010b), cavalos (Haase et al. 2007), gatos (David et al. 2014) e bovinos (Durkin et al. 2012), e com piebaldismo em humanos (Yang et al. 2013b). Entretanto, até onde estamos cientes, este gene não foi testado quanto ao seu efeito na pigmentação de ovinos.

Neste estudo nós caracterizamos os loci *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT* em ovinos crioulos de diferentes cores a fim de investigar o papel destes genes candidatos na determinação da coloração. Isto foi alcançado efetuando a medição da cor da lã, em associação com o sequenciamento dos genes e a análise da expressão gênica, com base em cruzamentos familiares para a segregação dos diferentes fenótipos.

Materiais e Métodos

Amostras e animais

Um total de 410 ovinos crioulos foi analisado. Para a extração do DNA 328 amostras de sangue ou tecido epitelial foram coletadas de indivíduos de dois rebanhos pertencentes a membros da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos (ABCOC), localizados no estado do Rio Grande do Sul. Estes rebanhos foram da Sobrado Branco em Canguçu (31°23'42"S, 052°40'33"W; N = 259) e da Santo Inácio em São Martinho da Serra (29°51'98"S, 053°95'09"W; N = 69). Os rebanhos estão sobre controle genealógico da ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos). As amostras incluíam 4 machos (2 coloridos e 2 brancos) e 196 fêmeas (129 coloridas e 67 brancas), utilizadas em cruzamentos, e a prole correspondente (128 cordeiros, totalizando 90 coloridos e 38 brancos). Para a análise da expressão do RNAm amostras de tecido epitelial foram coletadas de 82 indivíduos (rebanho Sobrado Branco: 41 coloridos e 41 brancos), mantidas em RNAlater (Ambion, Carlsbad, CA) e refrigeradas a -81°C até o processamento. O experimento foi conduzido seguindo os Princípios Éticos da Medicina

Veterinária e o guia dos Princípios Internacional para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais.

Foram realizados cruzamentos direcionados entre 6 grupos de fêmeas com idade entre 2 e 4 anos (de 22 a 32 indivíduos em cada grupo), formados de acordo com a cor da lã: 2 grupos brancos (1 e 3) e 4 grupos coloridos (2, 4, 5 e 6). Os grupos foram cruzados com machos brancos (3 e 4) e coloridos (1, 2, 5 e 6) de idade similar. A identificação materna da prole e o registro da cor dos cordeiros como brancos ou coloridos foi realizada no primeiro mês de vida, durante a marcação.

Análise da cor da lã

Amostras de lã foram obtidas de 197 animais consistindo de mechas inteiras coletadas usando um par de tesouras sobre a última ondulação, cerca de 4 dedos abaixo lateralmente. As amostras foram analisadas utilizando um colorímetro CR-410 (Konica, Osaka, Japão) para obter os parâmetros de coloração L^* , a^* e b^* de acordo com o sistema especial de cores CIELAB (CIE, 1995; Minolta, 2007). O parâmetro L^* indica a luminosidade. Em uma escala de 0 a 100, quanto maior o valor de L^* mais branca é a cor. O eixo cromático a^* indica a cromaticidade entre as direções verde (negativo) e vermelho (positivo), e o eixo b^* indica a cromaticidade entre as direções azul (negativo) e amarelo (positivo) no espaço de cores.

O parâmetro tonalidade (*hue* – h°) foi determinado pela co-tangente da razão de b^* por a^* ($h^\circ = \text{tg}^{-1}[b^*/a^*]$). Três medições foram realizadas de cada amostra de lã e os valores médios correspondentes foram utilizados na análise. Os parâmetros L^* e h° foram comparados entre as categorias de animais brancos e coloridos. O teste de Levene foi utilizado para avaliar a homocedasticidade dos parâmetros L^* e h° nas categorias de animais brancos e coloridos. As diferenças nas médias dos parâmetros L^* e h° entre os grupos de cores foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 0,05.

Extração do DNA e sequenciamento dos genes *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT*

O DNA genômico total foi extraído utilizando o método de CTAB (Doyle e Doyle, 1990), utilizando 400 μL de sangue ou aproximadamente 100 mg de tecido epitelial.

As regiões codificantes dos genes *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT* foram amplificadas com os primers descritos na Tabela Suplementar S1. Os primers para o gene *TYRP1* foram desenhados para abranger os exons 1 a 8 utilizando o programa PRIMER3 (Untergrasser et al. 2012; <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) com base nas sequências do gene em ovinos (EU760771) e bovinos (NM174480). Os primers para o gene *KIT* bovino desenvolvidos por Durkin e colaboradores (2012) foram modificados para a sequência do gene ovino (NC_019463). As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas em um volume de 25 μL contendo 10 a 100 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil), tampão 1X, 2 mM dNTPs, 10 pmol de cada primer e MgCl_2 na concentração otimizada (Tabela suplementar S1). As condições de PCR foram de 5 min. a 95°C, 35 ciclos de amplificação de 30 s a 95°C, 30 s na temperatura de anelamento apropriada (Tabela suplementar S1), 30 s a 72°C e 5 min. a 72°C.

Os exons 2, 3 e 4 do gene *ASIP* foram sequenciados utilizando os primers na Tabela Suplementar S1. A presença das deleções no exons 2 do gene *ASIP* (5 pb: g.100-105delAGGAA e 9pb: g.10-19delAGCCGCCTC) foi determinada pela análise de fragmentos utilizando marcados a 5' com 6-FAM os primers Agt1 e Agt11 (Tabela Suplementar S1) (Norris

e Whan, 2008; Fontanesi et al. 2011). Dois sítios polimórficos descritos por Norris e Whan (2008), o polimorfismo de um nucleotídeo (SNP) g.5051G>C e o SNP g.5172T>A, o qual prediz uma mudança de cisteína para serina (p.C123S), foram analisados por sequenciamento do exon 4.

Uma análise de fragmentos foi utilizada para identificar a cópia duplicada contendo o gene *ASIP*. Os primers Agt16R e Agt18F (Tabela Suplementar S1) anelam na região da junção entre as cópias duplicadas, produzindo um fragmento de PCR de 242 pb, enquanto os primers Agt16R e Agt17F anelam na sequência do ponto de quebra a 5', produzindo um fragmento de 238 pb. O primer Agt16R foi marcado a 5' com 6-FAM. A amplificação dos dois fragmentos indica que um indivíduo carrega pelo menos uma cópia do gene duplicado, enquanto apenas o fragmento de 238 pb está presente nos indivíduos que não carregam nenhuma cópia duplicada (Norris e Whan, 2008). Os fragmentos foram detectados por eletroforese capilar em um sequenciador 3730XL Applied Biosystems e analisadas pelo programa Peak Scanner 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os produtos de PCR foram tratados com 2 µL de ExoSAP (USB Corporation, Cleveland, OH) seguindo o protocolo do fabricante. O ciclo de sequenciamento foi realizado com o kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems) após os passos de limpeza realizados com 73,5 µL de etanol 70% e 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM. Todas as sequências foram inspecionadas visualmente, editadas, unidas e alinhadas utilizando o programa CodonCode Aligner. Os haplótipos foram inferidos utilizando o algoritmo PHASE 2.1 implementado no DnaSP v5.10. A associação entre os alelos dos genes *MC1R* e *ASIP* e os grupos de cor da lã foi avaliada através do teste de Qui-quadrado. A associação dos polimorfismos nos genes *TYRPI* e *KIT* com os parâmetros de cor L* e h° foi avaliada pela análise da variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey de comparações múltiplas quando o teste de Levene foi positivo para a homocedasticidade das variâncias entre os diferentes genótipos. Quando as variâncias dos parâmetros L* ou h° foram não homocedáticas os testes de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney foram utilizados para polimorfismos com 3 e 2 genótipos, respectivamente.

Quantificação da Expressão do RNA do *ASIP*

Amostras de pele da barriga de 41 fêmeas coloridas e 41 fêmeas brancas foram coletadas e preservadas em RNAlater (Ambion). O RNA total foi extraído de aproximadamente 30 mg de tecido epitelial utilizando o kit RNeasy Fibrous Tissue Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O RNA foi congelado a -80°C até o processamento. O cDNA foi obtido com primers randômicos utilizando 100 ng de RNA total com o kit High-Capacity DNA Reverse Transcriptions (Applied Biosystems). O ensaio 5'-nuclease TaqMan Real-Time PCR foi realizado em multiplex. Os primers direto (5'-GCAGAAATGAAGCGGAAAAGAAGAA-3') e reverso (5'-GGGTCCGTGCCACGTT-3') e a sonda (5'-ATCGGAGCCTTTCTCTTG-3') localizada na junção dos exons 3 e 4 (Custom TaqMan Gene Expression Assay; Applied Biosystems) foram desenhados com base no gene *ASIP* ovino (Refseq NM_001134303). O ensaio com sonda marcada com VIC para o gene *GAPDH* bovino foi utilizado como controle endógeno (Bt03210914_g1 – TaqMan Endogenous Control; Applied Biosystems) para normalizar a variação no carregamento das amostras.

O ensaio de PCR em Tempo Real foi realizado em triplicatas para cada amostra, em um volume de reação de 20 µL com 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão do *ASIP* foi realizada através do método comparativo Ct (2⁻

$\Delta\Delta CT$) descrito por Livak e Schmittgen (2011). A eficiência das reações foi avaliada por diluições 10 vezes do cDNA. O Ct médio dos animais com o mesmo genótipo foi normalizado pelo Ct do *GAPDH* e comparado pelo teste de Mann-Whitney. A associação entre o grupo de cor e o genótipo do *MC1R* e *ASIP* foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado.

Disponibilidade dos dados

De acordo com a política de arquivamento do *Journal of Heredity* (Baker, 2013), os dados primários subjacentes às análises foram depositados conforme segue:

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KP600969 a KP690976, KP721160 a KP721167, e KU598955 a KU598974. Os arquivos com a identificação das amostras, os resultados da quantificação da expressão, os parâmetros colorimétricos CIELAB e os alinhamentos, foram depositados no repositório Dryad (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.24v5>).

Resultados

Animais e cor da lã

Do total de 410 ovinos crioulos coletados, 148 eram brancos e 262 coloridos (Figura 1). Em um primeiro estágio, a cor da lã foi analisada colorimetricamente em 115 fêmeas adultas (43 brancas e 72 coloridas; Figura 2). O número de machos disponíveis foi baixo nos rebanhos e, assim, estes não foram incluídos nas amostras. Nas amostras do grupo colorido os parâmetros de cor variaram amplamente, com tonalidades do preto e marrom escuro ao cinza e marrom claro (Figura suplementar S1). A variância dos dois grupos foram não homocedásticas em L^* ($F = 34,701$; $P < 0,05$) e h° ($F = 44,637$; $P < 0,05$). Assim, as diferenças nos parâmetros foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, indicando a significância nas diferenças na distribuição dos parâmetros de cor entre os ovinos brancos e coloridos (L^* : $U = 0,001$; $P < 0,005$; h° : $U = 21,0$; $P < 0,05$).



Figura 1: Carneiros crioulos com os fenótipos branco (A, B) e colorido (C, D).

Genotipagem do *MC1R*

A associação entre a cor da lã e os polimorfismos no gene *MC1R* foi analisada em 328 ovinos crioulos. Um total de 1017 pb do gene *MC1R* foram seqüenciados, incluindo a região codificante inteira de 954 pb e 63 pb da região 5' não traduzida (UTR), e foram encontrado 6 haplótipos (Tabela 1). Seis SNPs foram encontrados, incluindo o p.218T>A e o c.361G>A causadores das mudanças nos aminoácidos p.M73K e p.D121N do alelo E^D. Um SNP estava localizado na região 5'-UTR (c.-31G>A) e os outros 3 SNPs (c.429C>T; c.600T>G; c.735T>C) eram substituições sinônimas.

As frequências genotípicas dos alelos dominante e selvagem do gene *MC1R* foram significativamente diferentes entre os grupos branco e colorido (Tabela 2). Todas as ovelhas brancas (107, 32,6% do total) possuíam o genótipo homozigoto para o alelo selvagem, enquanto aquelas com o alelo E^D (203, 61,9%) eram coloridas. Entretanto, algumas das ovelhas coloridas (18, 5,5%) não possuíam o alelo E^D. O teste de Qui-quadrado indicou que o genótipo do *MC1R* está significativamente associado com a cor. O genótipo homozigoto E⁺E⁺ ocorreu em 100% do grupo branco, e os portadores do alelo E^D estão em alta frequência no grupo colorido ($\chi^2 = 257,90$; $P < 0,05$).

Tabela 1: Diversidade haplotípica do gene *MC1R* nos ovinos crioulos.

Haplótipo	Nucleotídeo						n	Frequência	
	n°	-31	218	361	429	600			735
H1		A	T	G	T	G	T	109	0.166
H2		G	T	G	C	T	C	287	0.438
H3		A	A	A	T	G	T	256	0.390
H4		G	T	G	C	G	T	2	0.003
H5		A	T	G	T	G	C	1	0.002
H6		A	T	G	C	T	C	1	0.002

As seis variações nucleotídicas encontradas nos 328 indivíduos e a correspondente frequência haplotípica são mostradas. Os sítios c.218T>A e c.361G>A são não-sinônimos e resultam na substituição dos aminoácidos p.M73K e p.D121N, respectivamente. O haplótipo H3 representa o alelo ED. O número dos nucleotídeos corresponde à posição na sequência do Genbank NM_001282528.

Polimorfismos no *ASIP*

O alelo carregando a duplicação envolvendo o gene *ASIP* (alelo A^D) foi detectado em 290 (88,4%) das amostras de ovinos crioulos, enquanto os outros 38 indivíduos foram homozigotos para o alelo de cópia simples do gene (A^N).

Todos os indivíduos possuíam uma cópia normal do exon 2 do gene *ASIP* (Tabela 3) com a proteína considerada funcional. Os portadores do alelo A^D incluíam animais que eram heterozigotos para as deleções de 5 e 9 pb no exon 2 descritas por Norris e Whan (2008), enquanto nos homozigotos para a cópia normal do *ASIP* (A^NA^N) somente a deleção de 5 pb foi encontrada (D₅N 13,9%). Os homozigotos para o alelo A do SNP c.5172T>A no exon 4 foram mais frequentes nos ovinos A^NA^N (25,7%) do que em portadores do A^D (2,3%).

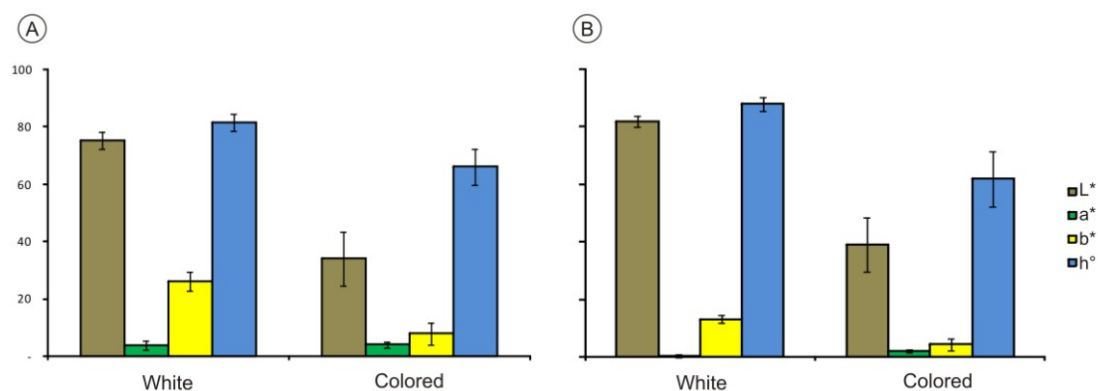


Figura 2: Variação na cor da lã nos ovinos crioulos. Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros de coloração L^* , a^* , b^* e h° no espaço de cor CIELAB, separadamente para os grupos branco e colorido na população total (A) e no experimento de quantificação (B).

Genótipos *MC1R* e *ASIP* e coloração

Para analisar a influência dos genes *MC1R* e *ASIP* na coloração nós consideramos os seus genótipos em conjunto. O alelo E^D estava presente em 203 (61,9%) ovinos coloridos. Destes, 183 (55,8%) ovinos carregavam o alelo A^D e 20 (6,1%) eram homocigotos $A^N A^N$. Dos 125 (38,1%) ovinos homocigotos para o alelo E^+ , 107 carregavam o alelo A^D e eram brancos, enquanto os outros 18 ovinos eram homocigotos $A^N A^N$ e eram coloridos (Figura 3A). Existe uma forte associação entre a combinação dos genótipos dos dois genes e o grupo de cor (χ^2 : 328,00; $P < 0,05$). As deleções no exon 2 do *ASIP* e o SNP c.5172T>A não mostraram associação significativa com os grupos de cores ($P > 0,05$).

Tabela 2: Proporção genotípica do *MC1R* nos ovinos crioulos brancos e coloridos.

Grupo	Genótipo <i>MC1R</i>			Total
	E^+E^+	$E^D E^+$	$E^D E^D$	
Colorido	18	149	54	221
Branco	107	0	0	107
Frequência (%)	38.1	45.4	16.5	328

E^+ : alelo recessivo; E^D : alelo dominante

Segregação das cores nos cruzamentos

A relação entre a segregação dos fenótipos brancos e coloridos e os genótipos *MC1R* e *ASIP* foi avaliada por cruzamentos familiares de ovinos crioulos (Figura 4). Os 128 cordeiros obtidos foram genotipados e classificados como brancos ou coloridos. A herança do alelo E^D resultou em indivíduos coloridos, independentemente do genótipo do gene *ASIP*. Somente ovinos homocigotos recessivos para o *MC1R* e portadores do gene *ASIP* duplicado (E^+E^+/A^D __ foram brancos.

Tabela 3: frequência genotípica (%) dos polimorfismos no gene *ASIP* nos ovinos crioulos apresentando os haplótipos das deleções de 5 e 9 pares de base no exon 2 e do SNP no exon 4.

Duplicação <i>ASIP</i>	Genótipo deleções				Genótipo			
	Exon 2				c.5172.T>A / c.5051.G>C			
	$D_5 D_9 N$	$D_5 N$	$D_9 N$	NN	TT/GG	TT/GC	TA/GC	AA/CC
A^D _	4,1	26,6	18,6	50,7	57,8	5	34,9	2,3

$A^N A^N$	-	13,9	-	86,1	50	3,1	21,9	25
População Total	3,7	25,1	16,6	54,6	56,9	4,8	33,5	4,8

Os resultados são mostrados separadamente para os portadores da duplicação do gene *ASIP* (A^D _) e para os homocigotos para o alelo normal ($A^N A^N$), e na população total. D_5 : deleção de AGGAA; D_9 : deleção de AGCCGCCTC; N: exon 2 sem deleções.

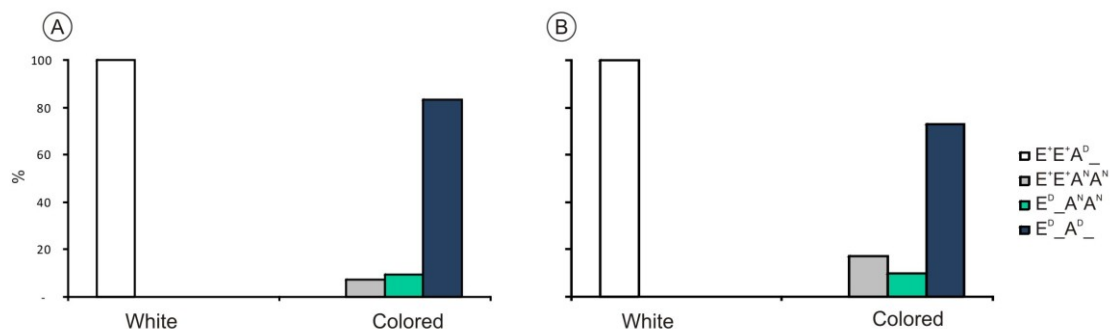


Figura 3: Frequência genotípica dos genes *MC1R* e *ASIP* nos ovinos crioulos. A combinação dos genótipos para os genes *MC1R* e *ASIP* é mostrada separadamente para os grupos brancos e coloridos na população total (A) e no experimento de quantificação (B). A^D : alelo *ASIP* duplicado; A^N : alelo *ASIP* não-duplicado; E^+ : alelo *MC1R* recessivo; E^D : alelo *MC1R* dominante.

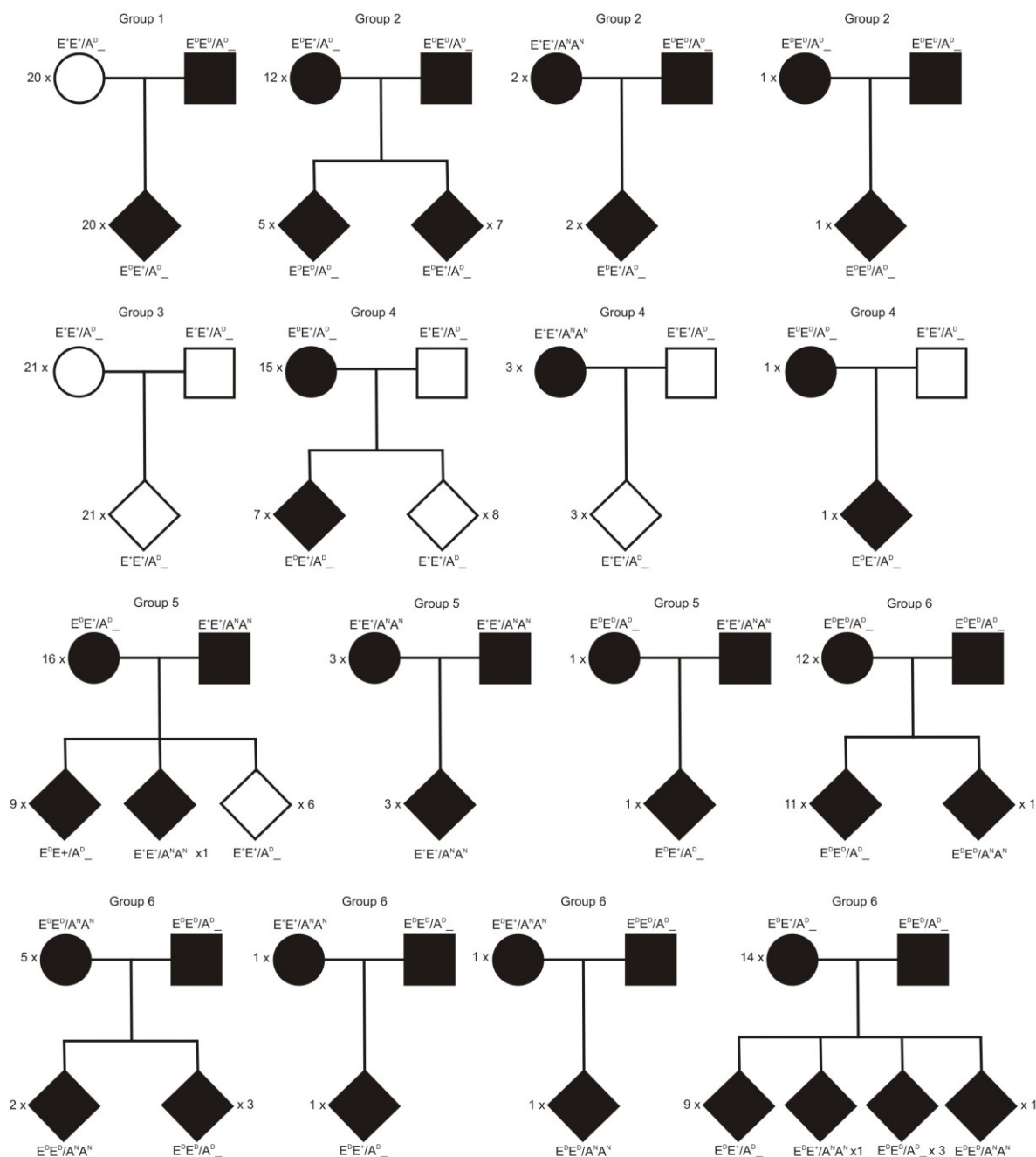


Figura 4: Genealogias para a segregação da coloração nos cruzamentos de famílias nos ovinos crioulos. Os genótipos para os genes *MC1R* e *ASIP* são mostrados para os seis grupos. Símbolos brancos e pretos representam a lã branca e preta, respectivamente. O sexo na prole não foi especificado. A^D : alelo *ASIP* duplicado; A^N : alelo *ASIP* não-duplicado; E^+ : alelo *MC1R* recessivo; E^0 : alelo *MC1R* dominante.

SNPs no *TYRP1*

Um total de 3105 pb do gene *TYRP1* ovino foram sequenciados, incluindo as sequências dos exons 1 a 8, parte dos introns e das regiões 5' e 3' UTR. Dos 16 polimorfismos encontrados (Figura suplementar S3), 8 ocorreram em introns. Dos 8 SNPs localizados nos exons, 5 eram sinônimos e 3 não-sinônimos (c.861C>T, p.A68V; c.864T>C, p.I69T; e c.4758G>A, p.V490I; Tabela suplementar S2). A influência do gene *TYRP1* na variação da cor da lã foi avaliada através da genotipagem dos 16 SNPs do *TYRP1* em animais coloridos. Não foi observada

associação significativa entre os genótipos e os parâmetros de coloração L^* e h° nos testes de Anova, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney ($P>0,05$).

SNPs no *KIT*

A região codificante do gene *KIT* ovino foi sequenciada, resultando em 8231 pb contendo os exons 2 a 21. Vinte e sete SNPs foram observados, 23 destes em introns, um na região 3'-UTR e 3 sinônimos localizados nos exons 2 e 3 (Tabela suplementar S3). Estes não apresentaram associação com a cor da lã na análise pelos testes de Anova, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney ($P>0,05$).

Análise da expressão gênica

A expressão do gene *ASIP* na pele dos ovinos crioulos foi analisada por quantificação por PCR Real Time em 41 animais brancos e 41 animais coloridos. A eficiência das reações foi de 91% (*ASIP*: slope = -3,545; $R^2 = 0,998$; *GAPDH*: slope = -3,552; $R^2 = 0,997$), com Ct detectável até a diluição 10^5 do cDNA. O controle endógeno *GAPDH* confirmou o sucesso das reações de amplificação em todas as amostras. A fim de avaliar a associação da expressão do *ASIP* com os fenótipos da cor da lã e com os genes *MC1R* e *ASIP*, os genótipos foram determinados nestas amostras (Figura 2B e 3B). Os indivíduos portadores da cópia duplicada (A^D) apresentaram níveis altos de expressão (Ct médio de 23,43 para *ASIP* e 22,74 para *GAPDH*). Os 11 homocigotos para a cópia não duplicada ($A^N A^N$) não apresentaram níveis detectáveis de RNAm do *ASIP* (Ct médio de 23,00 para *GAPDH* – Figura 5A). O ΔCt dos portadores da cópia duplicada foi significativamente diferente quando comparado com os homocigotos para a cópia não duplicada (Teste de Levene: $F = 8,944$; $p<0,05$; Teste de Mann-Whitney U: 781,00; $P<0,05$). Os grupos de cor da lã foram significativamente associados com os genótipos de *MC1R* e *ASIP* (χ^2 : 82,00; $P<0,05$). Todos os animais brancos eram homocigotos para o alelo E^+ , carregando pelo menos uma cópia do alelo A^D e apresentaram níveis altos do RNAm do *ASIP* (Figura 5B). No grupo colorido, 34 animais apresentaram o alelo E^D , destes, 30 eram portadores do alelo com a cópia duplicada do *ASIP* e 4 eram homocigotos para a cópia não duplicada ($A^N A^N$). Sete indivíduos coloridos eram $E^+ E^+ / A^N A^N$ e não apresentaram expressão do RNAm do *ASIP*.

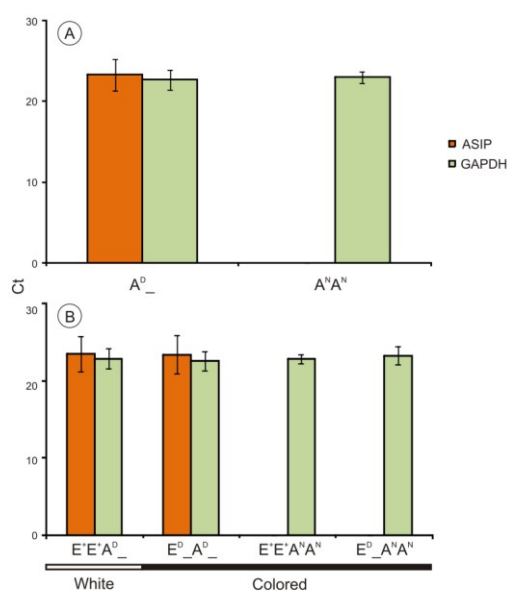


Figura 5: Quantificação relativa do gene *ASIP* na pele dos ovinos crioulos. Valores do ciclo limiar (*threshold cycle*, Ct) médio (\pm desvio padrão) para o PCR em Tempo Real do RNAm de *ASIP* e *GAPDH*

de acordo com o genótipo do *ASIP* (A) e com a combinação do *MC1R* e *ASIP* nos grupos branco e colorido (B). A^D : alelo *ASIP* duplicado; A^N : alelo *ASIP* não-duplicado; E^+ : alelo *MC1R* recessivo; E^D : alelo *MC1R* dominante.

Discussão

Nós analisamos o efeito dos polimorfismos nos genes candidatos *MC1R*, *ASIP*, *TYRPI* e *KIT* no controle da cor da lã em ovinos crioulos de diferentes cores. Os resultados claramente indicaram que a interação entre os alelos de *MC1R* e *ASIP* explica a ocorrência da lã branca e colorida nesta raça. A associação de *TYRPI* e *KIT* com a variação na cor foi descartada. Embora o efeito do *TYRPI* na cor da lã tenha sido descrita previamente na raça Soay (Gratten et al. 2007), o SNP c.869G>T, responsável pela variação fenotípica naquela raça não foi encontrada nos ovinos crioulos, e os outros polimorfismos detectados não foram associados com a variação na cor da lã.

A epistasia é definida como a interação entre os genes. Ela afeta os fenótipos com base em diferentes mecanismos, incluindo a interação funcional entre os genes e mutações agindo dentro do mesmo metabolismo genético (Phillips, 2008). Assim, diferentes formas de interação dentro do mesmo sistema podem resultar em fenótipos de coloração similares. Por exemplo, mudanças estruturais no *ASIP* e mudanças regulatórias no *MC1R* resultaram nas cores branca e preta em camundongos (Steiner et al. 2007). Aqui nós demonstramos que estes dois genes interagem epistaticamente, isto é, os efeitos fenotípicos do *MC1R* são visíveis (com todos os portadores de E^D sendo coloridos) independentemente do genótipo do *ASIP*. A expressão do fenótipo branco ocorreu apenas em indivíduos que eram tanto homocigotos recessivos para o *MC1R* (E^+E^+) e carregavam o alelo A^D . A análise dos cruzamentos de famílias segregando os fenótipos brancos e coloridos concordou com a interação epistática dos dois genes: um genótipo funcional (alelo selvagem) no *MC1R* é necessário para a manifestação dos efeitos do alelo duplicado do gene *ASIP*.

Embora a influência dos genes *MC1R* e *ASIP* na pigmentação em ovinos tenha sido identificada previamente em outras raças (Våge et al. 1999, 2003; Calvo et al. 2006; Royo et al. 2008; Fontanesi et al. 2010a, 2011), existem divergências na relação entre os fenótipos e os genótipos descritos em diferentes raças, demonstrando que a combinação específica de alelos existente em cada raça afeta a diversidade de cores (Våge et al. 2003; Royo et al. 2008).

Nós demonstramos neste estudo a ocorrência de fenótipos coloridos em indivíduos da raça crioula que são ou portadores do alelo E^D ou homocigotos $E^+E^+/A^N A^N$, enquanto o fenótipo branco foi significativamente associado com a duplicação do gene *ASIP*. Norris e Whan (2008) indicaram que a expressão do gene *ASIP* no alelo duplicado é dirigida pela região promotora do *ITCH* posicionada à montante da sequência da segunda cópia codificante do *ASIP*, resultando na transcrição ubiquitária do RNAm do *ASIP* nos portadores da duplicação. A relação entre a duplicação do *ASIP* e o fenótipo branco está de acordo com a associação observada nas raças Merino, Texel, Appenninica, Bergamasca e Sarda (Norris e Whan, 2008; Fontanesi et al. 2011).

A influência de ambos os alelos dominante no *MC1R* e recessivo no *ASIP* na determinação dos fenótipos de coloração também foi reportada por Fontanesi e colaboradores (2011) na raça Massese. Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados aqui, naquele caso, o alelo duplicado do *ASIP* estava associado com a cor cinza. Além disso, em duas raças Pramenka, Dubian e Privorian, nas quais o alelo E^D não estava presente, os indivíduos com a cópia duplicada do *ASIP* apresentaram heterogeneidade nos fenótipos, com manchas escuras e lã

branca/creme (Fontanesi et al. 2012). Assim, em adição à presença da duplicação, a atividade funcional do gene *ASIP* é necessária para a manifestação do fenótipo branco (Norris e Whan, 2008).

Em ovinos Soay, haplótipos de cópia simples não-funcionais do *ASIP* formados pela deleção de 5 pb no exon 2 e pelo SNP g.5172T>A foram associados, embora não completamente, com a segregação de dois fenótipos de coloração: o fenótipo selvagem com barriga e traseira claras e o resto do corpo escuro, e o fenótipo *self* que é colorido uniformemente. Foi proposto que esses fenótipos são determinados pelos alelos do *ASIP* recessivo não-agouti (A^a) e selvagem (A^+), respectivamente (Gratten et al. 2010). Apesar da lã nos ovinos crioulos possuir uma ampla diversidade de tonalidades, estas variações na região codificante do *ASIP* não apresentaram uma associação com os fenótipos de coloração.

Modificações na expressão do *ASIP* têm sido identificadas em associação com mudanças na cor em diferentes espécies, tais como suínos (Drögemüller et al. 2006) e bovinos (Girardot et al. 2005). A expressão do *ASIP* ovino foi analisada na raça Xalda por Royo e colaboradores (2008), que observaram níveis de expressão significativamente baixos em animais pretos em relação aos brancos. Porém, neste caso, o polimorfismo da deleção de 5 pb foi rejeitado como causa da variação na cor dos ovinos Xalda. Nós analisamos a ação do alelo duplicado descrito por Norris e Whan (2008) sobre a expressão do *ASIP* por meio da quantificação por PCR em Tempo Real. A identificação de níveis elevados de RNAm somente nos portadores do A^D está em concordância com a alteração esperada na transcrição induzida pela duplicação em tandem e indica que a cópia simples presente nos ovinos crioulos $A^N A^N$ não expressa o gene, resultando na ausência do efeito inibitório da proteína ASIP sobre a sinalização via *MC1R* e na produção de fenótipos coloridos.

A ovelha crioula é uma raça local rara criada por séculos nos estados mais ao sul do Brasil, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e está incluída nos esforços para a conservação dos recursos genéticos animais (Henkes et al. 1993; Gonçalves et al. 2010). A preservação dos recursos genéticos existentes nas raças locais pode prevenir a perda irremediável da variabilidade genética subjacente à variação fenotípica das espécies domésticas (Taberlet et al. 2011). Os ovinos crioulos apresentam uma alta diversidade de cores na lã em relação a outras raças, a qual é essencial para a sua aplicabilidade no artesanato, por exemplo. A lã colorida tem importância na economia local e pode ser utilizada na melhoria dos rebanhos animais, destacando a importância da preservação desta raça. A elucidação dos genes envolvidos na segregação da coloração da lã pode beneficiar os criadores na formação de rebanhos para propósitos específicos e na preservação da diversidade de fenótipos existente na raça.

Em síntese, os resultados descritos aqui demonstram que a ampla diversidade de cores na raça crioula é influenciada pela interação entre os genes *MC1R* e *ASIP*. Embora a variação nas tonalidades da lã observada na raça crioula também possa ser determinada por outros genes que não foram investigados aqui, a análise de genes candidatos neste estudo foi capaz de esclarecer os principais reguladores da segregação dos fenótipos nesta raça.

Material suplementar

O material suplementar pode ser obtido em <http://www.jhered.oxfordjournals.org/>

Financiamento: CNPq e FAPERGS.

Agradecimentos

Nós agradecemos aos membros da ABCOC (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos) por gentilmente fornecer suas ovelhas para serem coletadas. Nós agradecemos a Janet W. Reid pela edição do texto.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Disponibilidade dos dados:

Os dados estão depositados no Dryad: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.24v57>

Referências

- Baker CS (2013) Journal of Heredity adopts joint data archiving policy. *J Hered* **104**: 1.
- Becker D, Otto M, Ammann P, Keller I, Drögemüller C, Leeb T (2014). The brown coat colour of Coppernecked goats is associated with a non-synonymous variant at the *TYRPI* locus on chromosome 8. *Anim Genet* doi: 10.1111/age.12240.
- Beraldi D, McRae AF, Gratten J, Slate J, Visscher PM, Pemberton, JM (2006). Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of Soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics* **173**: 1521–1537.
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM, Potter J (2003). *TYRPI* is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* **34**:169–175.
- Calvo JH, Bouzada JA, Jurado JJ, Serrano M (2006). Genetic substructure of the Spanish Manchega sheep breed. *Small Rumin Res* **64**: 116-125.
- CIE (1995). Industrial colour-difference evaluation. Technical report 116/1995 ed. Commission Internationale de l'Éclairage Central Bureau, Vienna, Austria.
- Cieslak M, Reissmann M, Hofreiter M, Ludwig A (2011). Colours of domestication. *Biol Rev Camb Philos Soc* **86**: 885-899.
- David VA, Menotti-Raymond M, Wallace AC, Roelke M, Kehler J, Leighty R *et al.* (2014). Endogenous Retrovirus Insertion in the *KIT* Oncogene Determines White and White spotting in Domestic Cats. *G3 (Bethesda)* **4**: 1881-1891.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Drögemüller C, Giese A, Martins-Wess F, Wiedemann S, Andersson L, Brenig B *et al.* (2006). The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitza pigs maps to the porcine *ASIP* locus but does not affect its coding sequence. *Mamm Genome* **17**: 58-66.
- Durkin K, Coppieters W, Drögemüller C, Ahariz N, Cambisano N, Druet T *et al.* (2012). Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* **482**: 81-86.
- Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall'Olio S, Calascibetta D, Russo V *et al.* (2010). Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative e allele at the ovine *Extension* locus. *Small Rumin Res* **91**: 200-207.

- Fontanesi L, Dalessandro E, Scotti E, Liotta L, Crovetto A, Chiofalo V *et al.* (2010). Genetic heterogeneity and selection signature at the *KIT* gene in pigs showing different coat colours and patterns. *Anim Genet* **41**: 478-492.
- Fontanesi L, Dall'Olio S, Beretti F, Portolano B, Russo V (2011). Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (*ASIP*) and melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes. *Animal* **5**: 8-17.
- Fontanesi L, Rustempasic A, Brka M, Russo V (2012). Analysis of polymorphisms in the agouti signalling protein (*ASIP*) and melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes and association with coat colours in two Pramenka sheep types. *Small Rumin Res* **105**: 89-96.
- Girardot M, Martin J, Guibert S, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A (2005). Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res* **18**: 34-41.
- Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO, Hepp D, Passos DT, Weimer TA (2010). Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim Genet* **41**: 308-310.
- Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, Ito S, Thody AJ (1997). Agouti Protein Inhibits the Production of Eumelanin and Pheomelanin in the Presence and Absence of α -Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Res* **10**: 298-303.
- Gratten J, Beraldi D, Lowder BV, McRae AF, Visscher PM, Pemberton JM *et al.* (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in *TYRP1* is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **274**: 619-626.
- Gratten J, Pilkington JG, Brown EA, Beraldi D, Pemberton JM, Slate J (2010). The genetic basis of recessive self-colour pattern in a wild sheep population. *Heredity* **104**: 206-214.
- Haase B, Brooks SA, Schlumbaum A, Azor PJ, Bailey E, Alaeddine F *et al.* (2007). Allelic Heterogeneity at the Equine *KIT* Locus in Dominant White (W) Horses. *PLoS Genet* **3**: e195.
- Henkes LE, Weimer TA, Franco MHL, Moraes JCF (1993). Genetic characterization of the "Crioula lanada" sheep from southern Brazil. *Rev Bras Genet* **16**: 449-455.
- Hepp D, Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO, Martins CTDC, Weimer TA *et al.* (2012). Identification of the e allele at the Extension locus (*MC1R*) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genet Mol Res* **11**: 2997-3006.
- Hoekstra HE (2006). Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* **97**: 222-234.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Minolta (2007). Precise color communication: color control from perception to instrumentation. Japan: Minolta Co. Ltd. 59 p.
- Norris BJ, Whan VA (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res* **18**: 1282-1293.
- Phillips PC (2008). Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet.* **9**: 855-867.

- Ren J, Mao H, Zhang Z, Xiao S, Ding N, Huang L (2011). A 6-bp deletion in the *TYRP1* gene causes the brown colouration phenotype in Chinese indigenous pigs. *Heredity* **106**: 862-868.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Reh fuss L, Baack E *et al.* (1993). Pigmentation Phenotypes of Variant Extension Locus Alleles Result from Point Mutations that alter MSH Receptor Function. *Cell* **72**: 827-834.
- Rooryck C, Roudaut C, Robine E, Müsebeck J, Arveiler B (2006). Oculocutaneous albinism with *TYRP1* gene mutations in a Caucasian patient. *Pigment Cell Res* **19**: 239-242.
- Royo LJ, Alvarez I, Arranz JJ, Fernández I, Rodríguez A, Pérez-Pardal L *et al.* (2008). Differences in the expression of the *ASIP* gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Anim Genet* **39**: 290-293.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004). Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev* **84**: 1155-1228.
- Steiner CC, Weber JN, Hoekstra HE (2007). Adaptive variation in beach mice produced by two interacting pigmentation genes. *PLoS Biol* **5**: e219.
- Taberlet P, Coissac E, Pansu J, Pompanon F (2011). Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. *C R Biol* **334**: 247-254.
- Traoré A, Royo LJ, Kaboré A, Pérez-Pardal L, Álvarez I, Fernández I *et al.* (2012). Allelic and genotypic frequencies of *ASIP* and *MC1R* genes in four West African sheep populations. *Afr J Biotechnol* **11**: 14287-14291.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M *et al.* (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115.
- Våge DI, Fleet MR, Ponz R, Olsen RT, Monteagudo LV, Tejedor MT *et al.* (2003). Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. *Pigment Cell Res* **16**: 693-697.
- Våge DI, Klungland H, Lu D, Cone RD (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* **10**: 39-43.
- Yang GL, Fu DL, Lang X, Wang YT, Cheng SR, Fang SL *et al.* (2013). Mutations in *MC1R* Gene Determine Black Coat Color Phenotype in Chinese Sheep. *Sci World J* **2013**, 675382.
- Yang Y, Zhao R, He X, Li L, Wang K, Zhao L *et al.* (2013). A Novel Splicing Mutation of *KIT* Results in Piebaldism and Auburn Hair Color in a Chinese Family. *BioMed Res Int* **2013**, 689756.