

TESTE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA PELAGEM EQUINA: REVALIDAÇÃO DE PAINEL DE GENES

ALESSANDRA NEIS¹; ISABEL FIDALGO CARVALHO²; ALEXANDRE PIRES²;
ANDREIA OLIVEIRA²; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON³

¹Universidade Federal de Pelotas – alessandra_neis@hotmail.com

²Laboratório Equigerminal – isabel@equigerminal.pt

³Universidade Federal de Pelotas – primleon@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A coloração da pelagem em equinos é uma das mais diversificadas entre os mamíferos e tem sua importância relacionada à estética, ao valor comercial, à padronização racial, ao registro nas associações e à saúde do animal. Dentro do ramo da criação de equinos, a pelagem é sinônimo de um padrão de cores típico e valorizado dentro de cada raça e também do gosto pessoal do criador. Por outro lado, certas pelagens apresentam relação com a maior incidência de doenças genéticas, como cegueira noturna estacionária congênita, síndrome do potro lavanda, síndrome do potro overo letal, suscetibilidade a surdez e melanomas (BELLONE, 2010; CIESLAK; CHOLEWINSKI; MACKOWSKI, 2013; WEBB *et al.*, 2009).

Uma grande quantidade de dados referentes à genética e genômica desses animais foi revelada no sequenciamento do genoma equino, realizado por WADE *et al.* (2009). Até tal data, haviam sido descritos 31 *loci* envolvidos na determinação da pelagem, e a ampla variedade de colorações possíveis se daria em razão das mutações afetarem o funcionamento de melanócitos maduros, que produzem os pigmentos eumelanina (preto) e feomelanina (vermelho) (SPONENBERG, 2009). Desse modo, visto a importância que a pelagem exerce na criação de equinos, se faz necessária a elaboração de testes moleculares práticos e precisos que detectem estes genes e sua probabilidade de ocorrência na prole. Para isso, um painel comercial de sete genes de interesse foi elaborado, possibilitando grande facilidade para o criador e associações de raças, além de inovação no setor tecnológico.

Os dois principais *loci*, Extension e Agouti, são chamados de genes de coloração base, responsáveis pela distribuição dos pigmentos nos melanócitos. O gene Extension (E) é responsável principalmente pela distribuição da eumelanina, conferindo coloração preta na pele e pelo (RIEDER, 2009). Já o gene Agouti (A) caracteriza-se por limitar o pigmento preto à certas partes do animal, sendo a feomelanina (vermelho) o pigmento predominante (CHOWDHARY, 2013). Outros genes de relevância são: Grey (G), responsável pela despigmentação do pelo conforme o envelhecimento; Cream (Cr), principal gene diluidor da pelagem para amarelo; e Pearl (P), originando uma pelagem bem particular tipo Champagne (ADRIAN, 2013).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo descrever a revalidação de um painel genético para diagnóstico da pelagem equina, que será disponibilizado comercialmente para os genes Agouti, Extension, Grey, Cream e Pearl, através de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo Real (qRT-PCR).

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado durante estágio extra-curricular no Laboratório Equigerminal, localizado em Coimbra, Portugal, no período de mobilidade acadêmica internacional no primeiro semestre de 2017, de 15/07 a 28/07/2017. Por se tratarem de protocolos próprios e sigilosos, algumas informações foram suprimidas devido à existência de um termo de confidencialidade para a realização dos experimentos. A proposta foi realizar a revalidação do painel genético para cinco genes da pelagem equina já estudados em 2013: Agouti, Extension, Cream, Grey e Pearl.

As amostras de DNA utilizadas no qRT-PCR foram coletadas a partir do bulbo capilar de 10-15 crinas por animal, totalizando 20 animais de genótipos diversificados. O procedimento de extração se deu através de tampão de extração (100 µL/amostra), composto por *buffer* e proteinase K. As amostras foram centrifugadas e submetidas a 60°C por 45 minutos com agitação (250 rpm) e posteriormente a 95°C nas mesmas condições. Repetiu-se a centrifugação por 1 minuto e o sobrenadante foi retirado com micropipeta. O DNA foi quantificado em aparelho Thermo Scientific µDropPlate®. Cinco amostras foram selecionadas e testadas em duplicata para cada par de *primers*, incluindo os controles negativo, positivo e o branco. Foi preparado o mix Evagreen® (BioRad), adicionado de água ultra-pura e, em seguida, os pares de *primers* na concentração de 10 pmol e 2 µL de DNA. A placa foi inserida no termociclador BioRad CFX96 Real-Time® com o programa de 50 ciclos e em condições específicas de temperatura.

Após a amplificação das amostras, foi realizada restrição enzimática com as enzimas *TaqI* (gene Extension), *MseI* (Cream) e *Acil* (Pearl), nas seguintes temperaturas de incubação: 65°C para as duas primeiras e 37°C para a última. Os genes Agouti e Grey não necessitam passar por este processo, uma vez que o genótipo do primeiro pode ser facilmente determinado pela eletroforese, e o segundo é de diagnóstico qualitativo inferido através das curvas de amplificação no próprio qRT-PCR. O material genético digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% com 1 µL de corante OrangeG (Sigma-Aldrich) a cada amostra e 2 µL de marcador *low-range* (25-400 pb). As bandas amplificadas correspondentes foram analisadas pelos softwares GelDoc EZ Imager® (BioRad) e ImageViewer® (FastStone), a fim de obter maior precisão quanto aos tamanhos dos fragmentos e realizar a comparação entre os genótipos esperados e os obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações de DNA feitas durante o estágio revelaram concordância com as quantidades encontradas na validação interna do laboratório Equigerminal em 2013 (Etapa I da padronização). O uso do bulbo é uma opção vantajosa devido à sua facilidade de coleta, transporte e armazenagem, além de não requerer nenhuma condição especial ou maior custo, quando comparado à células sanguíneas; por outro lado, o material genético extraído acaba por ser de menor integridade, mas ainda adequado aos testes moleculares (ZĄBEK; RADKO; SŁOTA, 2005).

Por meio do qRT-PCR pode-se perceber o aumento e decréscimo na quantidade de produtos formados através da fluorescência emitida enquanto ocorrem os ciclos, assim como produtos inespecíficos presentes na amostra, caracterizados por sua diminuta quantidade de pares de bases. Desse modo, um bom resultado de PCR é aquele em que todos os produtos dissociam-se no

mesmo momento na curva de *melting*, indicando a presença apenas do fragmento desejado, como exemplificado na figura 1A. Os mesmos padrões de amplificação foram obtidos por ROYO *et al.* (2014), ao testar dois tipos de qRT-PCR para análise de mutações nos genes *Extension* e *Agouti* utilizando DNA proveniente da raiz do bulbo capilar.

A realização do experimento em duas etapas foi necessária para os genes *Cream*, *Pearl* e *Extension*. As enzimas de restrição permitem que o fragmento cortado seja de melhor visualização, uma vez que os diferentes genótipos são detectados por poucos pares de base de diferença.

Ambas as amostras digeridas e não-digeridas submetidas à eletroforese revelaram bandas de boa visualização e corrida limpa. Os controles não-digeridos mostraram que a enzima agiu adequadamente, como pode ser visto na figura 1B. O software ImageViewer® (FastStone) revelou o tamanho de cada banda em pares de bases, o que permitiu a comparação entre o genótipo esperado e o genótipo obtido. Esse recurso é mostrado na figura 1C, de genótipo *Ee*.

Os genótipos esperados para cada gene testado eram os seguintes: para *Ee*, três bandas de 208, 129 e 81 pb, enquanto para *EE*, uma banda de 208 pb, e *ee* por duas bandas de 129 e 81 pb. O perfil genotípico *AA* gera uma banda de 95 pb; *Aa*, duas bandas de 90 e 70 pb, e *aa*, uma banda de 80 pb. Referente ao gene *Cream*, *CrCr* caracteriza-se por duas bandas de 50 e 46 pb, *NCr* três bandas de 94, 50 e 46 pb, e *NN*, uma banda de 94 pb. O gene *Pearl* pôde apenas ser testado em comparação com a amostra já obtida em 2013, originada do mesmo animal, devido à sua baixa frequência populacional (UCDAVIS, [s.d.]). Para este, eram esperadas duas bandas de 109 e 135 pb para tanto para *prlprl* quanto *Nprl*, devido à homozigose possuir duas cópias do gene *Prl* e as bandas se sobrepõem no gel. O animal que não possui nenhuma cópia dos genes *Prl* (*NN*) mostra uma banda de 109 pb.

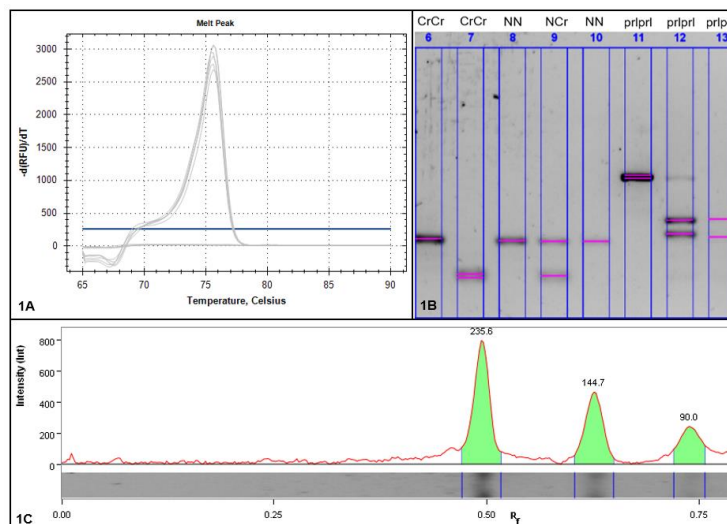


Figura 1. Análise dos resultados da qRT-PCR.

Em 1A é possível ver a temperatura em que os produtos formados para o gene Grey foram desnaturados ao longo do processo, demonstrando que existem poucos produtos inespecíficos. Em 1B percebe-se o padrão de bandas para diferentes genótipos não-digeridos e, em seguida, submetidos à restrição. Em 1C é mostrada a quantidade de pares de base presente em cada banda (em verde) e a respectiva banda (abaixo) para o genótipo *Ee*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da Etapa II de revalidação do painel de genes da pelagem equina por qRT-PCR demonstraram correspondência com o estudo interno de validação (Etapa I) realizado pelo Laboratório Equigerminal.

O estágio realizado no laboratório possibilitou ao aluno uma experiência única de inserção em um ambiente onde a biotecnologia existe com o viés comercial, diferente do vivenciado dentro da academia. Além disso, contribuiu enormemente para o crescimento profissional, uma vez que a empresa possui excelência internacional, profissionais comprometidos com a inovação tecnológica e um painel de serviços únicos na área prestados para a comunidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN DVM, J. A. L. Equine Color Genetics and Deoxyribonucleic Acid Testing. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 4, n. 2, 2013.
- BELLONE, R. R. Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. **Animal Genetics**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 100–110, 2010.
- CHOWDHARY, B. P. **Equine Genomics**. Texas, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- CIESLAK, J.; CHOLEWINSKI, G.; MACKOWSKI, M. Genotyping of coat color genes (MC1R, ASIP, PMEL17 and MATP) polymorphisms in cold-blooded horses bred in Poland reveals sporadic mistakes in phenotypic descriptions. **Animal Science Papers and Reports**, v. 31, n. 2, p. 159–164, 2013.
- RIEDER, S. Molecular tests for coat colours in horses. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 126, n. 6, p. 415–424, 2009.
- ROYO, L. J. et al. Technical note: A novel method for routine genotyping of horse coat color gene polymorphisms. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 6, p. 1291–1295, 2014.
- SPONENBERG, D. P. (DAN P. **Equine color genetics**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2009.
- UCDAVIS, Veterinary Genetics Laboratory. **Pearl - Horse Coat Color**. Disponível em: <<https://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse/pearl.php>>. Acesso em: 22 set. 2017.
- WADE, C. M. et al. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. **Science**, v. 326, n. 5954, p. 865–867, 2009.
- WEBB, A. A. Neurology Neurologie. **Comparative and General Pharmacology**, v. 50, n. March 2009, p. 313–318, [s.d.].
- ZĄBEK, T.; RADKO, A.; SŁOTA, E. Implications for the use of horse hair roots as a DNA source for microsatellite typing. **Czech Journal Of Animal Science**, v. 50, n. 11, p. 499–502, 2005.