

MÉTODO DE DETECÇÃO MOLECULAR DE COLORAÇÃO DE PELAGEM EQUINA UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS

LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²;
HADASSA GABRIELA ORTIZ²; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES², MARIANA
CAVALCANTI NASCIMENTO²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – luanafvreis@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – williamwwe@yahoo.com.br

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – hortizhadassa@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – laisdsantossg@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel - marianacbiotec@gmail.com

³Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura é a prática dedicada à criação e manejo de equinos, em sua maioria destinados à reprodução e comercialização. Essa atividade possui profundas raízes históricas, remontam a milênios de tradição. Atualmente, a equinocultura abrange uma ampla gama de propósitos em todo o mundo, englobando desde empreendimentos comerciais até o desempenho de funções cruciais na agricultura e pecuária. Além disso, em certos países, fatores socioeconômicos e culturais conferem aos equinos um papel essencial na subsistência de determinadas comunidades (SUMMIT AGRONEGÓCIO ESTADÃO, 2023). Há cerca de 4.000 anos, o processo de domesticação desses cavalos teve início, potencialmente, marcando o começo da primeira seleção de cores preferidas para a reprodução desses animais (THIRUVENKADAN et al., 2008).

Ainda hoje, há algumas divergências no mundo acadêmico sobre os aspectos genéticos dos equinos, e como os mesmos determinam as diferentes cores de pelagem. Sobre isso, a transmissão dos genes envolvidos na pelagem dos equinos, há muitas teorias, a mais conceituada e utilizada é o sistema ABeCedário para designação destes genes, sendo este proposto pela escola americana de Castle. A série de genes que controlam essas colorações são: o alelo C (*color*), B (*black*), A (*aguti*), D (*dilution*), E (*extension*), G (*gray*), M (*marking*), R (*roan*) e o W (*white*), todos esses alelos, quando em estado homozigótico dominante ou recessivo, ou em heterozigose, estão relacionados na determinação de colorações base nos equinos. Há ainda outros alelos importantes, como os genes série LP (*leopard*), encontrado em cavalos da raça Appaloosa, os genes série O (*overo*), responsável pelo surgimento de malhas brancas na pelagem, e os genes série P (*Paint*), em que os animais apresentam malhas brancas também, porém despigmentadas, conhecidos como Tobianos (THIRUVENKADAN, 2008).

O intuito das técnicas de biópsia embrionária é permitir e facilitar a execução de análises genéticas sem que haja interferência no desenvolvimento do embrião. As técnicas mais utilizadas são a biópsia por microlâminas e a por micropipetas. As amostras de biópsia podem ser coletadas durante as diferentes fases do desenvolvimento embrionário. No caso de óocitos, tem-se como convenção a retirada dos corpúsculos polares secundários ou primários, sendo considerado o estágio menos invasivo apesar de apresentar uma menor taxa de acurácia dos testes genéticos (HERRERA, 2016; CHOI, et al., 2010).

A determinação da coloração é feita de maneira rudimentar, através do conhecimento dos alelos dominantes e recessivos e sua presença ou ausência em diferentes raças (Revista Brasileira de Medicina Equina, 2020). Porém este método não é confiável, uma vez que, diferentes fatores podem influenciar a interação entre os genes, alterando, assim, a pelagem do potro. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico que permitam determinar a pelagem do potro de maneira prévia ao nascimento. Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas metodologias que apresentam elevada sensibilidade e especificidade. Dentre estas técnicas, destaca-se a PCR quantitativa (qPCR) com identificação concomitante de diferentes genes alvos (multiplex), a qual gera resultados confiáveis com maior rapidez, uma vez que o processo tem duração de cerca de 1h e com uma maior economia de reagentes (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006). Gerando assim, um método de diagnóstico diferencial inovador e com alta acurácia, e por consequência aumentando o valor de mercado do animal gerado, impulsionando assim, a equideocultura.

Como mencionado anteriormente, é de suma importância para os produtores identificar a coloração da pelagem dos equinos antes de seu nascimento, dada a ampla variedade de cores e fatores de diluição que podem influenciar o fenótipo e o valor agregado à prole, principalmente em cavalos de raça. Portanto, para atender a essa necessidade, torna-se fundamental o desenvolvimento de tecnologias inovadoras. O presente trabalho tem como objetivo a descrição da patente de invenção desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa em Genômica Estrutural (GenEstrut) da UFPel, a qual provê um conjunto de oligonucleotídeos sintéticos para uso na técnica de qPCR multiplex para identificação de polimorfismos em três diferentes genes responsáveis por distintas colorações de pelagem em equinos (*Equus caballus*).

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do painel de oligonucleotídeos sintéticos para a detecção molecular de seis diferentes colorações em equinos, utilizando como material para o diagnóstico o DNA embrionário, foi inicialmente realizada uma pesquisa bibliográfica em banco de dados disponíveis, como: *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, buscando identificar os genes e alelos mais adequados para esta ferramenta biotecnológica. Além disso, foi possível verificar a melhor metodologia para a obtenção do material genético a ser usado no diagnóstico molecular das colorações de pelagem equina.

Após, foram realizadas buscas de anterioridade tecnológica em bancos de depósito de patentes e bibliografia científica, tais como: INPI (<https://www.gov.br/inpi/pt-br>), *Google Patents* (<https://patents.google.com>), USPTO (<https://www.uspto.gov>), *Espacenet* (<https://worldwide.espacenet.com/>), e Portal Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br>).

Por fim, o conjunto de oligonucleotídeos sintéticos foi desenhado utilizando como base as sequências nucleotídicas dos genes alvos encontradas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e com auxílios de ferramentas de bionformática para desenho e validações *in silico* da funcionalidade dos oligonucleotídeos sintéticos.

A partir das metodologias citadas acima, foram redigidos os documentos necessários para o depósito da patente de invenção, a qual no momento de submissão deste trabalho se encontra em processo de análise por parte do

Escritório de Propriedade Intelectual, Transferência de Tecnologia e Empreendedorismo (EPITTE) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), para posterior depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da pesquisa bibliográfica em banco de dados, foi possível elencar os genes ASIP, MATP e MC1R, bem como seus alelos, como os alvos genéticos da nossa ferramenta biotecnológica de diagnóstico embrionários de coloração da pelagem equina.

Já na etapa de busca de anterioridades nos bancos de depósito de patentes, foram retornadas várias invenções utilizando termos de buscas distintos, conforme apresentado na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1 - Resultado da busca de anterioridades nos bancos de patentes Espacenet, Google Patents, INPI, Portal Capes e UPSTO.

Termos de busca (pt/en)	Resultado da busca de anterioridades				
	Espacenet	Google Patents	INPI	Portal Capes	USPTO
equino (equine)	54.658	100.000+	95	6488	83.600
pelagem (coat)	1.531.276	100.000+	12	248	760.886
coloração (color)	6.299.468	100.000+	476	7035	3.212.763
pcr (pcr)	603.481	100.000+	66	1.306.671	493.687
diagnóstico (diagnostic)	942.536	100.000+	2203	245.287	934.036
equino (equine); pelagem (coat)	10.728	100.000+	0	28	19.137
equino (equine); pelagem (coat); coloração (color)	4.657	100.000+	0	3	8.924
equino (equine); pelagem (coat); coloração (color); pcr (pcr)	3.384	100.000+	0	0	6.692
equino (equine); pelagem (coat); coloração (color); pcr (pcr); diagnóstico (diagnostic)	2.473	100.000+	0	0	5.402

Contudo, observou-se que os resultados obtidos não correspondiam à atual invenção, visto que elas apresentavam a identificação de somente uma coloração, a Tobiano, que inclusive a presente ferramenta biotecnológica proposta não contempla, utilizando uma técnica de PCR diferente, e outras duas, uma que detecta uma coloração na espécie bovina, e a outra na espécie caprina.

Desde modo, foi possível desenhar um total de 17 sequências de oligonucleotídeos sintéticos com características estruturais e termodinâmicas aceitáveis para serem utilizados em conjunto com a técnica de qPCR multiplex, os quais são suficientes e necessários para o diagnóstico molecular das seguintes colorações: Baio-simples-ordinário (*Buckskin*), Baio-simples-encerado ou escuro (*Bay*), Castanho (*Chestnut*), Cinza (*Gray*), Palomino e Preto (*Black*).

Assim, o conjunto de oligonucleotídeos sintéticos, utilizado para a identificação destas colorações, viabilizou a redação de um pedido de depósito de uma patente de invenção que se fundamente em um protocolo que apresenta não somente uma alta acurácia e sensibilidade técnica, mas também que seja facilmente aceito pelo mercado de empresas de biotecnologia e (re)produção animal que realizem exames para diagnóstico molecular.

Além disso, é importante destacar o uso preferencial desta metodologia em associação com a obtenção de amostras de DNA embrionário. Conforme descrito por HERRERA (2016) e CHOI e colaboradores (2010), tem-se como convenção a retirada dos corpúsculos polares secundários ou primários, sendo considerado o estágio menos invasivo para o posterior desenvolvimento embrionário.

4. CONCLUSÕES

A patente de invenção aqui descrita oferece uma solução que se baseia em uma ferramenta biotecnológica aprimorada, suprindo uma demanda importante no mercado e proporcionando uma detecção simples e rápida com o objetivo de auxiliar os criadores de equinos a escolher quais embriões realizar a inseminação, devido ao valor agregado à coloração daquela prole. Dessa forma, esta tecnologia pode vir a ser transferida para processo de diagnóstico molecular possui alto potencial para ser transferida empresas atuantes nos setores de biotecnologia animal, veterinária, zootecnia, bem como para instituições internacionais que atuam neste ramo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOI, Y. H. et al. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **REPRODUCTION**, v. 140, n. 6, p. 893–902, dez. 2010.

Estadão. **O que é equinocultura?**. Summit Agronegócio (Summit Agro), São Paulo, 12 jan. 2023. Notícias do campo. Acessado em 20 set. 2000. Online. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/noticias-do-campo/o-que-e-equinocultura/#>

HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Rev Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 26, 2016.

HERRERA, C. Clinical Applications of Preimplantation Genetic Testing in Equine, Bovine, and Human Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 29–34, jun. 2016

THIRUVENKADAN, A. K.; KANDASAMY, N.; PANNEERSELVAM, S. Coat colour inheritance in horses. **Livestock Science**, v. 117, n. 2-3, p. 109-129, 2008.

ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.D; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.