



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 102021019138-4 A2**

**(22) Data do Depósito:** 24/09/2021

**(43) Data da Publicação Nacional:**  
28/03/2023

**(54) Título:** MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:C.436\_437INSCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES E KIT PARA MÉTODO DE DETECÇÃO

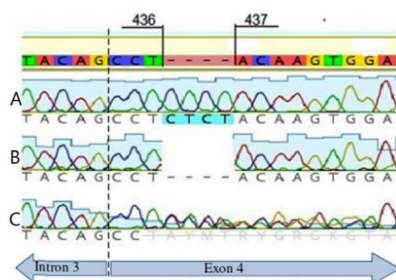
**(51) Int. Cl.:** C12Q 1/686; C12Q 1/6883.

**(52) CPC:** C12Q 1/686; C12Q 1/6883.

**(71) Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

**(72) Inventor(es):** JOSE PAES DE OLIVEIRA FILHO; ALEXANDRE SECORUN BORGES.

**(57) Resumo:** MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES E KIT PARA MÉTODO DE DETECÇÃO. A presente patente alvitra como inovação, no campo da genética animal, mais especificamente da genética em cães, um método para diagnosticar a enfermidade associada a miotomia hereditária, tal método baseia-se na identificação em cães, no gene CLCN-1, da mutação NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT, a partir do sequenciamento gênico de um fragmento de DNA obtido após reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos que flanqueiam o ponto da mutação, tal invenção tem aplicação no diagnóstico de animais homozigotos e heterozigotos para a mutação, agregando valor a comercialização dos animais com a comprovação de que o animal não é portador da mutação em heterozigose, sendo tal comprovação facilmente aplicável com o uso do kit desenvolvido para aplicação deste método de detecção.



**MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO  
NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A  
MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES E KIT PARA MÉTODO DE  
DETECÇÃO**

**Campo da invenção**

[001] A presente patente relata inovação no campo da genética animal, mais especificamente no campo de estudo da genética em cães, cuja invenção apresenta a capacidade de identificação da enfermidade através do desenvolvimento de método de detecção e diagnóstico de tal tipo de enfermidade, mas não limitando a solução proposta a este campo de invenção.

**Fundamentos da invenção**

[002] A miotonia é definida no estado da técnica como o distúrbio de atraso no relaxamento do músculo, que resulta em contração sustentada após despolarização inicial, e pode ser do tipo distrófica ou do tipo não distrófica (DEWEY; TALARICO, 2017).

[003] A miotonia distrófica é uma enfermidade neuromuscular degenerativa que apresenta miotonia associada a distrofia e a fraqueza muscular progressiva, descrita pela primeira vez em 1909, pelo neurologista Hans Gustav Wilhelm Steinert (apud MISHRA et al., 2018).

[004] As miotonias não distróficas, são divididas em dois grupos: as miotonias com disfunção dos canais de cloreto (COLDING-JORGENSEN,

2005) e as miotonias com disfunção dos canais de sódio (MONTAGNESE; SCHOSER, 2018).

[005] A patente CN102154509 propôs, em 2011, o uso de sequenciamento gênico e PCR para identificação de mutações no gene CLCN-1 para diagnóstico de miotonia hereditária. A presente inovação se difere da patente CN102154509 por identificar uma mutação distinta, e em outra espécie, uma vez que a patente CN102154509 estuda a espécie humana e a inovação proposta no presente documento estuda uma enfermidade na espécie de cães.

[006] No ano de 2012, a patente WO2014043344, e toda sua família contendo mais de quatro dezenas de patentes, alvitaram o uso de proteínas em aplicações terapêuticas para tratar distrofia muscular, no entanto não contemplava em sua solução o estudo da miotonia, e também não considerou o estudo em animais, tal como cães.

[007] Em 2017, a patente JP2019520423 intencionou como solução à distrofia miotônica tipo 1, causada por mutações no gene que codifica a calpaína 3 (CAPN3), um método para sintetizar compostos e composições farmacêuticas para prevenir ou tratar os distúrbios musculoesqueléticos, no entanto o estudo de tal enfermidade é focado no ser humano, diferente da presente solução que estuda a identificação da miotonia em cães, portanto tal patente não apresenta anterioridade a solução proposta.

[008] Ainda em 2017, o pedido de patente BR 11 2018 072169-7 propôs um composto para tratar distúrbios caracterizado pela ativação de sinalização de via Wnt, tal como a enfermidade miotonia, no entanto tal pedido não considerou o estudo do gene CLCN-1, e manteve seu foco em doenças

específicas dos seres humanos, portanto não pode ser considerada anterioridade para a presente inovação que visa o estudo da miotonia e seu diagnóstico para animais.

[009] O artigo “A large intragenic deletion in the CLCN1 gene causes Hereditary Myotonia in pigs” que foi publicado em 2019, descreve o sequenciamento gênico e PCR como ferramentas para identificação de mutações no gene CLCN-1 para diagnóstico de miotonia hereditária, porém novamente em espécies distintas, no caso do artigo a espécie estudada eram de porcos, enquanto na presente inovação a espécie é de cães. E também com foco em mutações distintas.

[0010] Em suma, nenhuma das patentes, artigos ou publicações científicas trouxeram ao estado da técnica uma solução para identificar a enfermidade miotonia em animais.

[0011] O principal problema, ainda não solucionado pelo estado da técnica refere-se à necessidade de desenvolver um diagnóstico etiológico da doença em cães, mais especificamente na espécie Buldogue-americano. A presente inovação alvitra um método de detecção que pode tanto ser aplicado na confirmação diagnóstica de animais portadores da doença clínica (homozigotos) quanto na identificação dos animais sem manifestação clínica da doença, mas que apresentem carreadores de um alelo mutado (heterozigotos).

[0012] A solução proposta além de permitir a descoberta de uma nova mutação responsável pela doença em cães, não apresenta qualquer tipo de desvantagem, uma vez que utiliza como solução para detectar as mutações uma técnica padrão ouro, que é o sequenciamento gênico.

[0013] Na solução desenvolvida o gene escolhido para análise foi o CLCCN-1, e a técnica utilizada foi o sequenciamento gênico de produtos de PCR que amplificam as regiões mutadas do gene CLCCN-1 de modo a permitir então a identificação da enfermidade.

[0014] A solução destaca-se ainda por não causar qualquer dano ou efeito colateral no animal que é submetido a tal processo de identificação da enfermidade, além de permitir um diagnóstico para a enfermidade de modo simples, rápido e eficiente.

### **Objetivos da Invenção**

[0015] A presente inovação tem por objetivo caracterizar a miotonia hereditária em cães, mais especificamente em cães da raça Buldogue-americano, sendo que a inovação apresentada neste documento poderá inclusive contribuir para a avaliação de variabilidade genotípica e fenotípica da MH entre diferentes espécies, como a espécie humana, por exemplo.

[0016] Também é objetivo da solução apresentada desenvolver um teste genético que permita orientar os acasalamentos dos animais com o intuito de diminuir a prevalência da miotonia hereditária em cães domésticos, tal como os cães da raça Buldogue-americano, assim como de raças correlatas. Sendo que, este teste genético ainda não estava disponível no presente momento, até o desenvolvimento desta solução.

[0017] Por requisito, ao desenvolvimento do teste genético, a presente invenção objetiva entender os aspectos clínicos, eletromiográficos e moleculares da Miotonia Hereditária em cães, de modo que, seja possível confirmar a miotonia hereditária no cão que apresenta hipertrofia muscular, assim como construir heredograma para determinar o padrão de herança;

sequenciar o RNAm responsável pela codificação do canal de cloreto na musculatura esquelética de um cão normal e de um cão afetado; identificar e localizar a possível mutação responsável pela enfermidade miotônica no gene CLCN1 e então conseguir padronizar um teste molecular diagnóstico para o tipo de mutação envolvida.

### **Breve descrição dos desenhos**

[0018] De modo a facilitar o entendimento do método da presente invenção, esta patente traz as figuras, algumas em forma de tabelas, descritas na sequência:

[0019] A figura 1 apresenta o eletroferograma parcial do sequenciamento do produto de PCR.

[0020] A figura 2 traz a tabela 1 com a sequência de referência NC\_006598.3 (NM\_001003124.2): Localização e tamanho, em número de pares de bases, dos 23 exóons, do gene CLCN1 na espécie *Canis familiaris* (NCBI - Gene ID: 403723).

[0021] A figura 3 traz a tabela 2 com a identificação e tamanho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento do gene CLCN1, bem como a abrangência de cada região amplificada por seu respectivo par de oligonucleotídeo iniciador.

[0022] A figura 4 ilustra cão da raça Buldogue-americano apresentando miotonia hereditária, em diferentes posições. “A” é uma vista cranial que exhibe hipertrofia muscular nos membros torácicos. “B” e “C” são vistas laterais, presença de hipertrofia generalizada pronunciada na musculatura do pescoço e região proximal dos membros torácicos e pélvicos e “D” é uma

vista da região posterior demonstrando hipertrofia muscular dos membros pélvicos.

[0023] A figura 5 ilustra o Alinhamento da sequência da proteína CLC-1 humana (Human\_6QVC) e a sequência proteica predita a partir da sequência codificante do animal miotônico (Myotonic\_dog\_CLC1).

[0024] A figura 6 apresenta a etapa do gel de agarose com produtos de PCR das amostras de cDNA *wildtype* e miotônico.

### **Descrição da invenção**

[0025] A inovação proposta para desenvolver um método de detecção da miotonia canina hereditária utilizou no desenvolvimento do método a biópsia muscular e coleta de sangue dos animais, a fim de obtenção de amostras para extração de RNA, a partir do músculo, e DNA, a partir de sangue. Ambas as amostras permitem identificação de possíveis alterações que justifiquem os achados de manifestações clínicas sugestivas de miotonia hereditária.

[0026] Para a análise histopatológica, amostras de músculo esquelético do primeiro cão em estudo foram acondicionadas em formol à 10% e posteriormente submetidas ao corte histológico. Após procedimento envolvendo o uso de parafina, cortes com 6 a 8 µm permitiram a confecção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O material obtido foi analisado, subjetivamente, quanto a alterações morfológicas e presença de processos degenerativos ou necróticos.

[0027] Uma amostra de sangue total de aproximadamente 3mL, referente ao cão 1, foi acondicionada em tubo com anticoagulante EDTA, e

refrigerada, para posterior extração de DNA. Amostras de sangue de dez cães geneticamente relacionados com o primeiro cão do estudo, com diferentes tipos de parentescos, tal como: irmãos, pai, mãe, tia, sobrinha e cães com o avô em comum, foram também obtidas, acondicionadas em tubo contendo EDTA e refrigeradas para posterior extração de DNA e processamento das análises. Outros 33 cães, sem parentesco com o cão 1, foram submetidos a colheita de amostra de sangue venoso para extração de DNA e realização de testes genéticos. O procedimento consistiu na colheita de sangue venoso, utilizando agulha 21G após assepsia do local de punção com algodão e álcool. O acondicionamento das amostras foi realizado em tubos estéreis com EDTA e, em sequência, as amostras foram refrigeradas a 4°C. A amostra biológica de sangue pode ser substituída por swab bucal ou outros tecidos.

[0028] O procedimento de biópsia incisional foi realizado no Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás (UFG), apenas no cão que apresenta distúrbios de contração muscular, visando obtenção de amostra para realização de exame histológico e molecular, a fim de confirmar a suspeita diagnóstica.

[0029] O planejamento anestésico consistiu no uso de 2µg/kg de fentanil e 5mg/kg de propofol para indução anestésica e manutenção com isoflurano a 2,5 V%, sob ventilação intermitente sincronizada. O paciente foi posicionado em decúbito lateral e procedeu-se a tricotomia na região lateral distal do úmero e antissepsia com clorexidina degermante e alcoólica. Sobre a porção escapular do músculo deltóide, uma abordagem de aproximadamente 3 cm foi suficiente para permitir a biópsia muscular, após incisão cutânea e divisão dos tecidos subjacentes retirou-se um fragmento

com dimensões próximas a 2,0 x 1,0 x 0,5cm (comprimento, profundidade e largura). Após a retirada da amostra de músculo, efetuou-se a dermorrafia com fio de náilon 3-0, em padrão Wolff.

[0030] As amostras foram acondicionadas em criotubos contendo formalina tamponada a 10% e criotubos com solução de estabilização de RNA (RNAlater tissue collection, Invitrogen™, Waltham, MA, USA), visando as análises histológicas e teste genético para o gene CLCN1, respectivamente. Os tubos foram imersos em nitrogênio líquido para posterior envio às análises. Após a extração de RNA, as amostras foram armazenadas em freezer próprio para o material biológico, a -80°C.

[0031] Todo o processo descrito acima para identificação da miotonia hereditária em cães a partir da extração do RNA é complexo e causa uma situação de pós-exame, com necessidade de processo de recuperação da região na qual ocorreu a retirada da amostra de músculo. Este processo somente foi realizado apenas como contraprova ao método de detecção da miotonia hereditária em cães a partir da extração do DNA, método inovador proposto como solução para a detecção da miotonia de forma rápida, com menor custo e sem a necessidade de cuidados especiais no pós-exame, e com o resultado para a enfermidade obtido muito mais rápido do que o método tradicional de extração de RNA.

[0032] O DNA das amostras de sangue total foi purificado e armazenado em freezer para a conservação do material, a -20°C. Inicialmente, duas amostras de DNA foram obtidas a partir de amostras de sangue de um cão clinicamente normal e do cão afetado e receberam as respectivas identificações: wiltdype e 1. Em seguida, amostras de DNA

foram extraídas de outros 43 cães e identificadas com a sequência de números 2 ao 44.

[0033] Para a purificação do RNA e a confecção do cDNA foram obtidas amostras de músculo de dois cães para que a amostra de cDNA fosse confeccionada a partir do RNA extraído. A amostra do cão 1 foi colhida por biópsia muscular, enquanto um fragmento de músculo de um cão clinicamente normal, wildtype sem sinais de miotonia, foi gentilmente cedido pela Patologia Veterinária, da UNESP - Campus Botucatu. O cão wildtype não possuía anormalidade genética, foi encaminhado à Patologia Veterinária já em óbito e a amostra foi colhida logo após a morte.

[0034] Para extração do RNA total das amostras, utilizou-se o kit de extração RNeasy® Mini Kit (Qiagen®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a análise de espectrofotometria realizada no aparelho Nanodrop™ (Thermo Scientific™, EUA) permitiu avaliação da pureza e concentração das amostras, consideradas aceitáveis as amostras cuja razão entre os valores de absorbância foi aproximadamente 1,8.

[0035] Posteriormente, as amostras viáveis foram tratadas com a enzima RQ1 RNase-FreeDNase (Promega®, EUA) para eliminação de DNA genômico residual, e novamente a amostra foi submetida à mensuração de pureza e concentração, no espectrofotômetro.

[0036] O próximo passo consistiu na confecção da fita complementar de DNA (cDNA), um volume final de 45 µL, seguindo as recomendações do fabricante, a partir de 500 ng de RNA, “random primers” e a enzima Improm-IITM RT (Promega®, EUA). No término do processo, duas amostras de

cDNA foram obtidas, identificadas e armazenadas a -20°C, sendo uma correspondente à pesquisa do gene CLCN1 do cão wildtype e outra do miotônico.

[0037] A próxima etapa foi a de sequenciamento do RNAm do gene CLCN1, de modo que, todos os éxons do gene CLCN1, codificadores dos canais de cloreto da musculatura esquelética, fossem sequenciados a partir da amostra do animal clinicamente normal, bem como de um cão afetado, pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados ao longo da sequência codificante de RNAm do CLCN1, utilizando a base de dados disponível no Ensembl: chloride voltage-gated channel 1NC\_006598.3 (NM\_001003124.2), visando cobertura total dos 23 éxons.

[0038] Oito pares de oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* e *Reverse*, descritos na figura 3 (tabela 2), permitiram cobertura total dos exons codificantes, a partir de amostra de cDNA, a fim de comparação entre os genes CLCN1 do cão wildtype e do cão miotônico com o gene referência disposto no GenBank™. Posteriormente, diante da dificuldade de obtenção de um bom produto resultante das regiões éxon 6 e éxon 7, a partir de amostra de cDNA do cão miotônico, outro par de oligonucleotídeo iniciador foi desenhado para sequenciamento da região. O novo oligonucleotídeo iniciador foi identificado como I6, conforme apresentado na figura 3 (tabela 2).

[0039] A etapa seguinte foi a reação em cadeia da polimerase, no qual as amostras obtidas e os oligonucleotídeos iniciadores foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para realização de cada PCR, o volume final de 25 µl foi obtido, sendo a composição da reação: 9,5 µl de nuclease free water; 12,5 do mix enzima GoTaq Green; 0,5 µl do

oligonucleotídeo iniciador *Forward*; 0,5 µl do oligonucleotídeo iniciador *Reverse*; e 2 µl da amostra. A PCR foi realizada em termociclador Mastercycler® PRO SERIES (Eppendorf). As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 min.; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 60°C por 30 seg.; extensão a 72°C por 50 seg.; seguido por extensão a 72°C por 5 min.

[0040] A próxima etapa foi o Gel de Eletroforese, na qual objetivando confirmar se o produto esperado foi adequadamente amplificado na etapa anterior, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A fonte Kasvi de eletroforese foi utilizada, de acordo com recomendação do fabricante, para geração de corrente elétrica, com uso em cubas Major Science Maior e Major Science Menor. Para visualização dos produtos em gel de agarose, fez-se uso do transiluminador UV para eletroforese e imagens do gel foram obtidas.

[0041] A etapa seguinte foi a de genotipagem, para o procedimento de purificação do DNA, através da purificação dos produtos de PCR, o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) foi utilizado, seguindo recomendações do fabricante. Os produtos de purificação, com volume final de 50 µl, foram novamente submetidos à confirmação da presença do material genético esperado, através da eletroforese. O material genético purificado foi então adicionado ao seu respectivo oligonucleotídeo iniciador *Forward* ou *Reverse*, no volume final de 15 µl, sendo 10 µl do material purificado e 5 µl de oligonucleotídeo iniciador e então enviado para realização do sequenciamento Sanger.

[0042] Ainda na etapa de genotipagem, o passo seguinte foi o de sequenciamento gênico. A cobertura total da região codificante do RNAm,

no cão wildtype e no cão 1, foram realizadas através do sequenciamento genético, a partir das amostras de cDNA. As amostras de DNA do cão 1 e do cão wildtype foram submetidas a análise da porção final do exon 3 (a partir do 96º pb) e inicial do exon 4 (a partir do 15º pb). As amostras de DNA dos cães geneticamente relacionados com o cão 1 e dos 33 cães clinicamente normais foram utilizadas para amplificação e sequenciamento da região de interesse no gene, compreendendo regiões de porção final de exon 3, íntron 3 e porção inicial de exon 4. O sequenciador automático de DNA (Sanger), Modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) foi utilizado pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para realização do sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas quanto a qualidade, tamanho dos produtos obtidos e comparadas com a sequência CLCN1 *Canis familiaris*, utilizando a sequência NM\_001003124.2 para cDNA e a sequência referência NC\_006598.3 para DNA. Para alinhamento e análise das sequências resultantes do sequenciamento, os programas Geneious prime e Sequencher DNA Sequence Analysis foram utilizados.

[0043] Na sequência foram realizadas as análises dos dados com o uso dos softwares de análise de sequenciamentos, Geneious prime e Sequencher DNA Sequence Analysis, foram utilizados para conferência, alinhamento e comparação dos genes CLCN1 de todos os cães submetidos a pesquisa com a sequência referência NM\_001003124.2. A conferência dos materiais genéticos foi realizada por comparação em cada par de base. As comparações dos produtos sequenciados permitiram a interpretação dos resultados.

[0044] Durante o exame físico do animal 1, constatou-se parâmetros de normalidade no sistema gastrointestinal, geniturinário, respiratório e cardiovascular. No exame neurológico, o nível de consciência, nervos cranianos, reações posturais e reflexos espinhais também não apresentaram alterações. Os sinais clínicos apresentados pelo paciente foram hipertrofia muscular, rigidez ao andar e, quando estimulado a atividades físicas, apresentava rigidez muscular que levava a quedas (startle response) que o mantinha em decúbito durante alguns segundos. A miotonia apresentou melhora com a repetição do movimento, fenômeno warm up. A miotonia hereditária foi o diagnóstico presuntivo do cão 1. O cão apresentava hipertonía muscular generalizada sem envolvimento do sistema nervoso. Foram observadas hipertrofia muscular pronunciada na região proximal dos membros torácicos, pélvicos e pescoço, como observado na figura 4. As manifestações clínicas citadas estão presentes desde os 45 dias de idade

[0045] O exame de eletromiografia realizado no cão 1 indicou traçados eletromiográficos em padrão crescente-decrescente (descargas miotônicas) de ondas e som semelhante a um “motor de motocicleta”, “avião de bombardeiro”, característicos da miotonia. Os achados se repetiram nos diferentes locais de inserção da agulha e nos diferentes tempos de realização do exame. Na avaliação histopatológica do tecido muscular do cão miotônico, não foram constatadas alterações distróficas, apenas hipertrofia das fibras. A ausência de alterações adicionais sugeriu padrão de normalidade das fibras musculares. A distribuição das fibras foi homogênea com núcleo periférico e tecido conjuntivo normalmente distribuído.

[0046] No sequenciamento do RNAm do CLCN1, ao se comparar a sequência do RNAm do *Canis lupus familiaris* chloride voltage-gated channel 1 (CLCN1) obtida de amostra de músculo do cão wildtype com a sequência do RNAm NM\_001003124.2, depositado no GeneBank™(NC\_006598.3) observou-se a presença de três polimorfismos sinônimos (exóns 1, 6 e 23), i.e.; c.72C>T - 24TAC>ATC (Tirosina); c.714T>C - 238ATT>ATC (Isoleucina) e c.2709 T>C - 903AGT>AGC (Serina). A comparação da sequência obtida a partir de amostra de músculo do cão miotônico com a do cão wildtype e a NM\_001003124.2 resultou na presença dos mesmos polimorfismos observados no cão wildtype. No animal miotônico foi observado a inserção de quatro nucleotídeos (CTCT) no início do éxon 4, logo após o 3ªpb do éxon (NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT), conforme ilustrado na figura 1. Essa inserção alterou a sequência de leitura do RNAm, provocando a formação de um stop códon prematuro (M194X). A mutação NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT implica na inserção de um aminoácido p.Y145S e alteração da localização de vários aminoácidos subsequentes, resultando em um stop códon prematuro p.M194X.

[0047] Para análise do impacto da mutação sobre a estrutura proteica, a sequência proteica do animal miotônico foi predita a partir da sequência codificante 33 (Myotonic\_dog\_CLC1) e alinhada com a sequência da proteína CLC-1 humana (Human\_6QVC). Na sequência Myotonic\_dog\_CLC1 foram observados resíduos conservados, stop códon prematuro (M194X) e os principais aminoácidos que participam da formação do poro condutor seletivo para o íon Cl<sup>-</sup> (S189, E232 e Y578). Em S189 ocorre uma substituição do resíduo de Serina (S) por um resíduo de Triptofano (W) e a ausência de E232 e Y578, conforme ilustra a figura 5, na

qual as estruturas secundárias são indicadas acima do aminoácido sequência, as hélices alfas foram nomeadas de acordo com a estrutura cristalográfica de raios-x proposta por FENG et al. (2010), resíduos conservados são ressaltados em preto. As barras amarelas representam diferentes aminoácidos a partir do ponto de inserção (NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT). O asterisco ressaltado em vermelho representa o stop códon prematuro formado (M194X). Em verde estão representados os principais aminoácidos que participam da formação do poro condutor seletivo para o íon Cl<sup>-</sup> (S189, E232 e Y578). Na sequência Myotonic\_dog\_CLC1 em S189 ocorre uma substituição do resíduo de Serina (S) por um resíduo de Triptofano (W) e a ausência de E232 e Y578.

[0048] Os produtos correspondentes às amostras de RNAm do cão 1, quando amplificados a partir dos oligonucleotídeos iniciadores F2R2 e I6 apresentaram banda dupla, mesmo após repetidas reações de PCR. A PCR realizada com amostras de cDNA do cão miotônico, utilizando o par de oligonucleotídeo iniciador F2R2, os quais flanqueiam as regiões de éxon 4, 5, 6 e 7, resultou na presença de banda dupla em gel de agarose, conforme ilustrado na figura 6. Um produto de 500 pb e outro de aproximadamente 600 pb foram observados no produto de PCR do cão afetado. No cão *wildtype*, submetido as mesmas condições de PCR, ocorre apenas o produto do tamanho aproximado de 500 pb.

[0049] Diante da persistência da banda dupla, as bandas foram individualmente recortadas para sequenciamento, a fim de possibilitar adequada análise da região correspondente ao gene *CLCN1* do cão miotônico. O produto de 500 pb observado no gel com a amostra do cão miotônico, mostrou-se semelhante ao observado no cão *wildtype*. O produto

de aproximadamente 600 pb, observado apenas no cão miotônico, diferiu no acréscimo de 79 nucleotídeos “ACCGCGTCTGGGCAGCTTGATCTCCTGGTGTCTGGCCTGCGCGGTGG GCGTGGGATGCTGCTTTGCAGCCCCTGTCTGGAG”. Na sequência de nucleotídeos do animal *wildtype* e na sequência NC\_006598.3, esses 79 nucleotídeos são encontrados na região central do íntron 6, na posição 6442\_6520. No animal miotônico esses 79 nucleotídeos foram inseridos na junção éxon 6 e éxon 7 no produto transcrito de RNAm. Desta forma, constatou-se a presença de um transcrito alternativo NC\_006598.3 (NM\_001003124.2): c.774\_775ins [6442\_6520]. Foi realizada PCR a partir da amostra de cDNA do animal miotônico e do cão *wildtype*, utilizando o par de oligonucleotídeo iniciador I6. O produto resultante dessa nova PCR foi de 156 pb para o cão *wildtype*. Para o cão miotônico, as bandas possuíam os tamanhos de 156 e 235 pb.

[0050] A figura 1 visa clarificar o método proposto, com a apresentação do eletroferograma parcial do sequenciamento do produto de PCR que amplifica a região da a mutação NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT do gene CLCN-1. Observa-se o ponto de inserção das bases CTCT entre os nucleotídeos 436 e 437 no cão com miotonia hereditária (sequência Myotonic), ausência da inserção de bases em um cão wild type (sequência WT) e o pico duplo formado a partir da base 436b em um animal heterozigoto para a mutação (dog 5), esta imagem foi obtida no software Geneious® version 10.2.3 – Biomatters, Auckland-New Zealand.

[0051] Para o sequenciamento das amostras de DNA oriundas dos cães que possuem vínculo genético com o cão 1, os oligonucleotídeos iniciadores escolhidos foram o *Forward 2* (F2) e *Reverse 1* (R1), resultando

em um produto de aproximadamente 600 pb no gel de agarose submetido a eletroforese. O oligonucleotídeo iniciador *Forward 2* (F2) foi o que resultou em melhores produtos amplificados e sequenciados. O resultado do sequenciamento Sanger possibilitou análise da região inicial do éxon 4, permitindo identificar se os cães são *wildtype*, heterozigotos ou homozigotos para a mutação NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT.

[0052] A ausência de inserção das bases “CTCT” e de picos duplos de ondas no eletroferograma indicaram a tia (4), um cão cujo avô é um ancestral comum (10), a sobrinha (9) e a irmã de mesmo pai e mãe, mas de ninhada diferente (8), como cães não afetados e não portadores da mutação.

[0053] Os pais do cão miotônico, 2 e 3, assim como os meios-irmãos, 5 e 6, e também a 11, cujo avô é um ancestral comum, são heterozigotos para a mutação. Foram observados picos duplos no eletroferograma de dois cães heterozigotos. Por fim, o cão número 7, irmã de mesma ninhada, também apresentou homozigose para a mutação NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT.

[0054] A genotipagem dos 33 cães não relacionados à família do cão 1, revelou que os 33 cães eram *wildtype* para a mutação NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT. Após análise dos resultados de sequenciamento, conclui-se que nenhum dos cães carrega alelos para a mutação, não havendo afetados ou heterozigotos para a mutação descrita.

### **Exemplos de concretizações da invenção**

[0055] Este estudo constitui a primeira descrição clínica e molecular de miotonia hereditária em cães da raça Buldogue-americano. O histórico familiar, os sinais clínicos, achados eletromiográficos e moleculares

confirmam a suspeita diagnóstica. Animais geneticamente relacionados foram genotipados e indivíduos heterozigotos foram identificados, bem como outro cão afetado pela miotonia. Progenitores não são afetados, sendo heterozigotos para a mutação NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT no gene CLCN1, caracterizando a MH de padrão de herança 46 autossômico recessivo. A análise de Pedigree e o estudo genealógico confirmam a presença de um ancestral comum entre os indivíduos afetados e heterozigotos.

[0056] O teste molecular foi padronizado para diagnóstico da mutação NM\_001003124.2: c.436\_437insCTCT, através do método de sequenciamento Sanger, realizado a partir de amostras de DNA. A orientação de acasalamentos de cães da raça Buldogue-americano poderá ser realizada a partir do teste molecular desenvolvido neste estudo.

[0057] Os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre o desenvolvimento e as causas da miotonia hereditária. A mutação no gene CLCN1 deverá ser incluída no painel de diagnósticos diferenciais para miopatias de origem genética em cães desta raça.

[0058] O desenvolvimento dessa pesquisa implica na expansão da lista de raças afetadas pela miotonia hereditária e possibilita que animais dessa espécie sejam potenciais modelos para doenças genéticas humanas. Por fim, esse trabalho permite a elaboração de estudos futuros para avaliar a prevalência da mutação no Brasil e avaliar se existem diferenças fenotípicas entre os animais acometidos pela MH.

## REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a. coletar a amostra biológica do animal;
- b. extrair o DNA da amostra biológica;
- c. submeter o DNA a uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores F2 e R1;
- d. submeter os produtos de PCR purificados ao sequenciamento direto utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos F2 ou R1;
- e. analisar as sequências obtidas de um programa específico.

2. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a amostra biológica ser sangue ou swab bucal ou outros tecidos.

3. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com a reivindicação 1,

**caracterizado por** os oligonucleotídeos iniciadores específicos F2 ou R1 flanquearem a região da mutação NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT no gene CLCN-1.

4. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a amostra final do PCR conter um volume de 25 µl, sendo 2 de DNA, 0,2 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, 12,5 µl de DNA polimerase e 9,5 µl de água livre de nucleases.

5. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** as condições de termociclagem compreender:

- a. desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos;
- b. quarenta ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos;
- c. anelamento a 60°C por 30 segundos;
- d. extensão a 72°C por 50 segundos;
- e. extensão a 72°C por 5 minutos.

6. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com a reivindicação 1,

**caracterizado por** os produtos do PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz violeta.

7. MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a reação de sequenciamento ser composta por 5 µl de um dos oligonucleotídeos iniciadores, F2 ou R1 e 10 µl do produto de PCR purificado.

8. KIT PARA O MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES, definido na reivindicação 1, **caracterizado por** permitir a execução do método de detecção com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores F2 e R1.

9. KIT PARA O MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES de acordo com a reivindicação 8 **caracterizado por** preferencialmente o oligonucleotídeos iniciadores F2 ser do tipo -GGAGCATGGATTATGTCAGTGC-3.

10. KIT PARA O MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES de acordo com a reivindicação 8 **caracterizado por** preferencialmente o oligonucleotídeos iniciadores R1 ser do tipo – GTTGGGCTGCATCTGGTAGT-3.

## DESENHOS

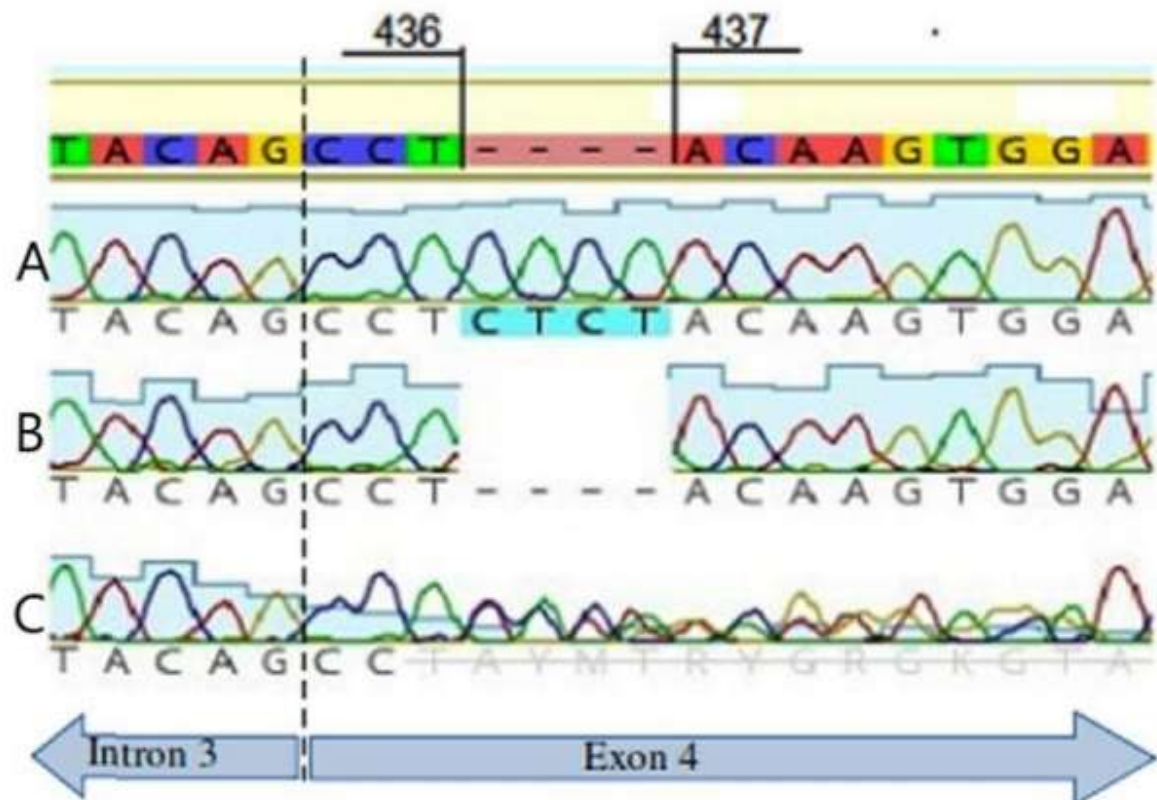


Figura 1

TABELA 1

| ÉXON | TAMANHO<br>(Pares de Bases) | ÍNTRON | TAMANHO<br>(Pares de Bases) |
|------|-----------------------------|--------|-----------------------------|
| 1    | 271                         | 1      | 2.858                       |
| 2    | 121                         | 2      | 391                         |
| 3    | 132                         | 3      | 559                         |
| 4    | 129                         | 4      | 252                         |
| 5    | 134                         | 5      | 1.242                       |
| 6    | 78                          | 6      | 1.002                       |
| 7    | 79                          | 7      | 5.322                       |
| 8    | 126                         | 8      | 281                         |
| 9    | 85                          | 9      | 188                         |
| 10   | 102                         | 10     | 303                         |
| 11   | 85                          | 11     | 255                         |
| 12   | 150                         | 12     | 4.975                       |
| 13   | 70                          | 13     | 175                         |
| 14   | 111                         | 14     | 1.968                       |
| 15   | 214                         | 15     | 236                         |
| 16   | 134                         | 16     | 1.647                       |
| 17   | 227                         | 17     | 302                         |
| 18   | 112                         | 18     | 330                         |
| 19   | 80                          | 19     | 250                         |
| 20   | 39                          | 20     | 2.973                       |
| 21   | 105                         | 21     | 89                          |
| 22   | 87                          | 22     | 496                         |
| 23   | 2.044                       | -      | -                           |

Figura 2

TABELA 2

| IDENTIFICAÇÃO DO PRIMER | PRIMER (5'-3')           | TAMANHO DO PRODUTO A SER AMPLIFICADO | ABRANGÊNCIA               |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| F1                      | AGGCTTAAGGAGCTGTATTGGG   | 536                                  | Éxon 1, 2, 3              |
| R1                      | GTTGGGCTGCATCTGGTAGT     |                                      | e parte do éxon 4         |
| F2                      | GGAGCATGGATTATGTCAGTGC   | 504                                  | Éxon 4, 5, 6 e 7          |
| R2                      | TCCGCACAGCAAAGTATGTA     |                                      |                           |
| F3                      | TGTGCTGTAGGAGTTGGCTG     | 476                                  | Éxon 8, 9, 10 e 11        |
| R3                      | TCGAATAGGGTGCTGATGGC     |                                      |                           |
| F4                      | CGCCTGCTGTATCCTGGAAT     | 498                                  | Éxon 12, 13 e 14          |
| R4                      | GTGGGCAATCTGACCCGTTA     |                                      |                           |
| F5                      | AGGCTATGCGGTAATTGGGG     | 510                                  | Éxon 15, 16               |
| R5                      | TGGTGTCCCTTCCCATCGTA     |                                      | e parte do éxon 17        |
| F6                      | GAGCGCTCAGAGCTACAGTC     | 496                                  | Éxon 17, éxon 18, 19 e 20 |
| R6                      | GGTCGATGCAGCAGTAGTCA     |                                      |                           |
| F7                      | GGATTTAGTGGACAACATGTCACC | 574                                  | Éxon 21, 22 e 23          |
| R7                      | GAGGACGAGCTGATTCTTTGA    |                                      |                           |
| F8                      | TCCCTTGCTCTCTGAGGCT      | 480                                  | Éxon 23 e UTR             |
| R8                      | TGCCGGAACAAGAAGACCAA     |                                      |                           |
| I6 (Forward)            | GCCCTTTCGTCCACATCGC      | 156                                  | Éxon 6 e Éxon 7 (cDNA)    |
| I6 (Reverse)            | CTCCAAGTGGCGTCCCAAAA     |                                      |                           |

Figura 3



Figura 4

**Human\_6QVC**

1 10 20 30 40 50 60  
Human\_6QVC MEQSRSQQRGGEQSWWGS DPQYQYMPFEHCTSYGLPSENG LQHRLRKDAGPRNNV HPTQ  
Myotonic\_dog\_CLC1 MQPSQLRRGGEQSWWGSAPQYQYMPFEHCTSYGLPSENGALQHRLHRDAGLRANTR RPTQ

**Human\_6QVC**

70 80 90 100 110 120  
Human\_6QVC IYGHKKQOFSDREQDI GMPKKGSSSTVD SKDEDHYSKCD CIIHRLGVVRRLGEDWIF  
Myotonic\_dog\_CLC1 IYGHYKQOFSDREQDT GMSKKMGSSSMD SKDEDHYSKCG CVRRLGHVVRRLKLGEDWIF

**Human\_6QVC**

αA αB  
130 140 150 160 170 180  
Human\_6QVC LVLLGLLMALVSWMDYVS AKSLQA YKWSYAQM QPFSI PQFLVWVFIPF ILIFSALFCF  
Myotonic\_dog\_CLC1 LVLLGLLMALVSWMDYVS AKSLQA SLQVELLPDAAC PASAVPG LGHLPA NSHPLQRRLT

**Human\_6QVC**

TT αC ηA αD αE  
190 200 210 220 230 240  
Human\_6QVC LISPPAQVGSGIP EMKTLIRGVVLKEYLT MKAFVAKVVAITAGL GSGIPVKG GPFFVHIAS  
Myotonic\_dog\_CLC1 PPHLSPGCWLDPF . . . . .

**Human\_6QVC**

αF αG  
250 260 270 280 290 300  
Human\_6QVC ICAAVLSKFMSVFCGV YEQPYYSDILTVGC AVGVGCCFG TPLGGVLFSIEVTISTYFAVR  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

αH  
310 320 330 340 350 360  
Human\_6QVC NYWRGF AATFSAF VFRVLAVN KDAVITI ALFRTNF RMDFPF DLKLPAFAAIGICCGL  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

αI αJ αK πA  
370 380 390 400 410 420  
Human\_6QVC LGAVFYV LHRQVM LGVRKH KALSQ FLAKHR LLYPGI VTFVI ASFTFP PGMGQFMAGELMP  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

αL ηB αM  
430 440 450 460 470 480  
Human\_6QVC REAISTLF DNNTWVK HAGDPES LGQSA VWIH PRNVN VIIIF LFFVM KFNM SIVATT MPIP  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

αN βA βB αO  
490 500 510 520 530 540  
Human\_6QVC CGGFMP VFVLGA AFGRVL GEIMAM LFDPG ILFDD IIYK ILPGGY AVIGA AALTGA VSHTV  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

αP αQ αR TT  
550 560 570 580 590 600  
Human\_6QVC STAVIC FELTGQ IAHLF MMVA VILAN MVAQSL QPSI GD SI IQVKK LPYLPDL GWNQLSK  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

βC αS βD TTT βE αT  
610 620 630 640 650 660  
Human\_6QVC YTIFVED IMVRDV KFVSAS TYGELRTL QT TTKT LPLVD SKDSMI LLGVSER SELQAL  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

670 680 690 700 710 720  
Human\_6QVC LQRHLC PERRLRA AQEMAR KLSelpydg KARLAG Eglpgapp GRPE SFafv DEDEDEDLS  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

730 740 750 760 770 780  
Human\_6QVC GKSELPP SLALHP STTA PLSP EEFPNG LPLGH KQQPE AEPAG QRPS IFQS LHCLLGRAR  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

βF TT αU  
790 800 810 820 830 840  
Human\_6QVC PTKKK ITQD STLVD NMSPE EIAWEQE QLSQP VCDFS CCIDQ SPFQLVEQT TLHKTH TL  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

βG βH αV  
850 860 870 880 890 900  
Human\_6QVC FSLGLHLAY VTSMG KLRGV LALEEL QKAIE GHTKSG VQLRP PLASF RNTT STRKST GAP  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

910 920 930 940 950 960  
Human\_6QVC PSSAENWNLP ED RFGAT GTGDVIA ASPETVP VPSP SPEPPLSL APGKV EGEELEE ELVESP  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

**Human\_6QVC**

970 980  
Human\_6QVC GLEELAD ILQG PS LRST DEEDEDEL IL  
Myotonic\_dog\_CLC1 . . . . .

Figura 5

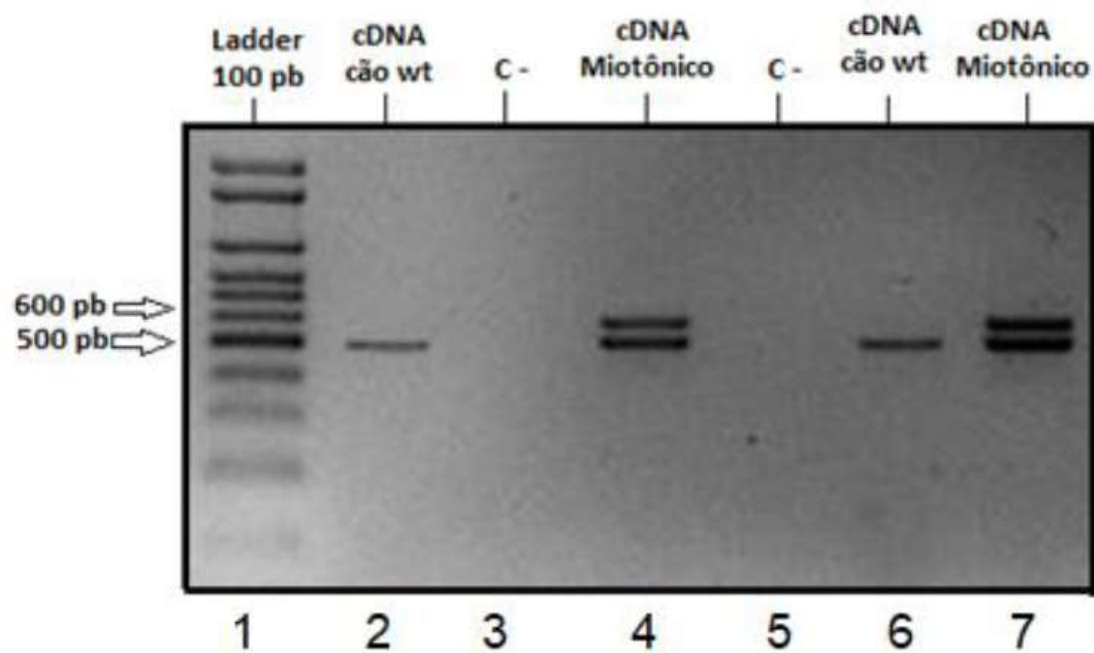


Figura 6

## **RESUMO**

### **MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO**

### **NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT NO GENE CLCN-1 ASSOCIADA A MIOTONIA HEREDITÁRIA EM CÃES E KIT PARA MÉTODO DE DETECÇÃO**

A presente patente alvitra como inovação, no campo da genética animal, mais especificamente da genética em cães, um método para diagnosticar a enfermidade associada a miotomia hereditária, tal método baseia-se na identificação em cães, no gene CLCN-1, da mutação NM\_001003124.2:c.436\_437insCTCT , a partir do sequenciamento gênico de um fragmento de DNA obtido após reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos que flanqueiam o ponto da mutação, tal invenção tem aplicação no diagnóstico de animais homozigotos e heterozigotos para a mutação, agregando valor a comercialização dos animais com a comprovação de que o animal não é portador da mutação em heterozigose, sendo tal comprovação facilmente aplicável com o uso do kit desenvolvido para aplicação deste método de detecção.