



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021002047-4 A2



(22) Data do Depósito: 03/02/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 16/08/2022

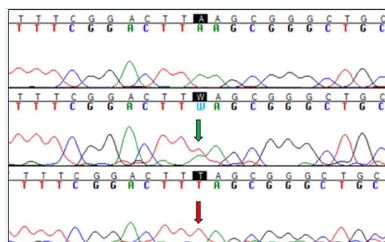
(54) **Título:** MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO G.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS; KIT DE DETECÇÃO E USO DO MÉTODO

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

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

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

(57) **Resumo:** MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS; KIT DE DETECÇÃO E USO DO MÉTODO. O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção da mutação g.95271115A>T no gene agrecano, associada ao nanismo condrodisplásico em equinos, assim como o kit de detecção apropriado para tal, e ao uso do referido método. O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção que pode ser aplicado na confirmação diagnóstica de animais portadores da doença clínica (homozigotos) e na identificação dos animais sem manifestação clínica da doença, mas carreadores de um alelo mutado (heterozigotos) e, portanto, possibilita a orientação dos acasalamentos. O público-alvo é o de criadores de equinos de raças pônei, filiados ou não às associações das raças Pônei (ABCC Pônei) ou Mini-Horse (ABCMH). Os objetivos estão relacionados também à descoberta de uma nova mutação responsável pela doença em equinos e esta mutação está presente em heterozigose em aproximadamente 10% da população brasileira de Mini-Horses.



MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS; KIT DE DETECÇÃO E USO DO MÉTODO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção da mutação g.95271115A>T no gene agrecano, associada ao nanismo condrodissplásico em equinos, assim como o kit de detecção apropriado para tal e ao uso do método.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção que pode ser aplicado na confirmação diagnóstica de animais portadores da doença clínica (homozigotos) e na identificação dos animais sem manifestação clínica da doença, mas carreadores de um alelo mutado (heterozigotos) e, portanto, possibilita a orientação dos acasalamentos.

[003] O público-alvo é o de criadores de equinos de raças pônei, filiados ou não às associações das raças Pônei (ABCC Pônei) ou Mini-Horse (ABCMH).

ESTADO DA TÉCNICA

[004] O nanismo condrodissplásico em cavalos em miniatura é um distúrbio autossômico recessivo previamente associado a quatro mutações (D1, D2, D3* e D4) no gene agrecan (ACAN). O objetivo deste estudo foi identificar variantes adicionais no gene ACAN candidato associado ao nanismo condrodissplásico em cavalos em miniatura. Descobriu-se que quinze cavalos anões em miniatura possuíam apenas uma das variantes causadoras do nanismo, e dois não possuíam nenhuma das variantes. Os exões ACAN (EquCab3.0) de sete cavalos anões miniatura foram sequenciados. Um SNP missense no exon de codificação 11 (g.95271115A> T, c.6465A> T — RefSeq XM_005602799.2), que resultou na substituição de aminoácido p.Leu2155Phe (RefSeq XP_005602856.2), foi inicialmente associado ao fenótipo anão . A variante foi testada e encontrada em 14 potros anões, bem como em um dos pais de cada um, e em ambos os pais de um anão que possui duas cópias. Testes genéticos de 347 cavalos miniatura fenotipicamente normais demonstraram que nenhum tinha mais de um dos alelos anões ou c.6465A> T. No entanto, um estudo de raças grandes revelou a presença de c.6465A> T, que estava presente em homozigose em dois Cavalos Mangalarga

Marchador. Sugeriu-se que c.6465A> T como um marcador de desequilíbrio ou interações complexas no genoma do cavalo em miniatura pode contribuir para o nanismo associado (Abranches de Andrade *et al*, 2020). No entanto, as mutações apresentadas diferem das identificadas e propostas na presente invenção.

[005] O nanismo condrodissplásico é um distúrbio genético que leva a uma redução desproporcional do tamanho corporal e pode interferir negativamente no desenvolvimento e reprodução do indivíduo afetado¹. Além disso, fetos abortados podem ser observados em algumas espécies como um sinal clínico dessa doença. Em cavalos, os relatos de nanismo estão principalmente relacionados a cavalos Frísios, pôneis Shetland e cavalos em miniatura. Em todas essas raças, o distúrbio apresenta um padrão de herança autossômica recessiva, mas as mutações causais estão em genes diferentes. Em cavalos frísios, o gene da beta-1, 4 galactosiltransferase 7 (B4GALT7) está envolvido; em cavalos miniatura e pôneis Shetland em miniatura, as mutações causais estão no gene agrecan (ACAN) ou no gene homeobox de baixa estatura (SHOX).

[006] O gene ACAN codifica o grande proteoglicano agrecano, que fornece uma estrutura de gel hidratado para o bom funcionamento da cartilagem articular, uma vez que as articulações são dependentes da integridade da matriz extracelular, que é composta por proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno tipo II, glicoproteínas e fibras elásticas. Além disso, entre os proteoglicanos, o agrecan é o mais crucial para o bom funcionamento da cartilagem articular e é essencial na morfogênese condroesquelética.

[007] Mutações no gene ACAN também causam nanismo semelhante à condrodissplasia em outras espécies. Em humanos, pelo menos 25 mutações ACAN patológicas foram identificadas como a causa da baixa estatura. A displasia espondiloepifisária do tipo Kimberley, caracterizada por encurtamento de membros e tronco, é uma dessas doenças e é causada pela inserção de um único par de bases (bp) no exon 12 do gene ACAN9. Em ratos, a deficiência da matriz cartilaginosa, caracterizada por fenda palatina e membros curtos, cauda e focinho, é causada por uma deleção de sete pb no gene ACAN, resultando em um códon de parada prematura. Por sua vez, fetos de gado Dexter afetados por nanismo relacionado a

alterações no gene ACAN morrem por volta do sétimo mês de gestação.

[008] Em cavalos miniatura, quatro variantes do gene ACAN (D1, D2, D3 * e D4) já foram descritas como causadoras do nanismo condrodissplásico. A maioria dos genótipos D1 (D1 / D1, D1 / D2, D1 / D3 * e D1 / D4) causam morte fetal, enquanto os outros genótipos (D2 / D2, D2 / D3 *, D2 / D4, D3 * / D3 *, D3*/ D4 e D4 / D4) estão envolvidos no nascimento de potros anões. O diagnóstico clínico do nanismo condrodissplásico em cavalos miniatura já foi descrito no Brasil, e o genótipo D4 / D4 foi recentemente caracterizado no mesmo país. No entanto, ainda não é possível associar todos os cavalos anões miniatura com as variantes ACAN descritas anteriormente.

[009] A novidade tecnológica do presente pedido de patente de invenção está no método que se baseia na identificação da mutação g.95271115A>T no gene *agrecano*, associada ao nanismo condrodissplásico em equinos de raças pônei, a partir do sequenciamento gênico de um fragmento de DNA obtido após reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de *primers* específicos que flanqueiam o ponto da mutação, os quais compõem o kit.

[010] A presente invenção é útil no diagnóstico de animais homocigotos e heterocigotos para a mutação, agregando valor à comercialização dos animais após a comprovação de que o mesmo não é portador da mutação em heterocigose.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[011] O presente pedido de patente de invenção propõe um método de detecção da mutação g.95271115A>T no gene *agrecano*, associada ao nanismo condrodissplásico em equinos, assim como o kit de detecção apropriado para tal e a aplicação do método. Os objetivos estão relacionados também à descoberta de uma nova mutação responsável pela doença em equinos e esta mutação está presente em heterocigose em aproximadamente 10% da população brasileira de Mini-Horses.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DA FIGURA

[012] A metodologia foi padronizada em 21 animais fenotipicamente anões, destes, dois apresentaram a mutação em homocigose e 15 em heterocigose (também heterocigotos para outras mutações associadas anteriormente ao nanismo condrodissplásico). Então, realizou-se genotipagem de 347 equinos da raça Mini-Horse

fenotipicamente normais. Todos os resultados corroboraram com a associação entre a mutação e o nanismo condrodisplásico.

[013] O método de detecção da mutação foi padronizado e consiste nas seguintes etapas:

- a) Coletar a amostra biológica do animal de interesse;
- b) Extrair o DNA das amostras biológicas;
- c) Submeter o DNA a uma reação de PCR com os *primers* específicos (DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13);
- d) Submeter os produtos de PCR purificados ao sequenciamento direto utilizando os *primers* específicos (DG_ACAN_Eq_F13 ou DG_ACAN_Eq_R13);
- e) Analisar as sequências obtidas em um programa específico.

[014] Na etapa (a), a amostra biológica consiste em sangue, pele, bulbos pilosos ou outros tecidos.

[015] Em seguida, o DNA das amostras é extraído e submetido a uma PCR utilizando os *primers* específicos e definidos como DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13, que correspondem aos *primers* que flanqueiam a região da mutação g.95271115A>T. Cada PCR é realizada em uma amostra contendo volume final de 25 µl: 2,5 µl de DNA, 0,3 µM dos *primers*, 12,5 µl de DNA polimerase e 8,5 µl de água livre de nucleases. As condições de termociclagem são: 95°C por 5 min (para promover a desnaturação inicial), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 30s, 63°C por 60s e 72°C por 60s. Por fim, faz-se uma extensão final de 72°C por 5 min.

[016] Os produtos de PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, sendo corados de forma apropriada e visualizados sob luz ultravioleta. Em seguida, os mesmos são purificados e submetidos ao sequenciamento direto em uma aparelhagem adequada. A reação de sequenciamento é composta por 5 µl de um dos *primers*, DG_ACAN_Eq_F13 ou DG_ACAN_Eq_R13 e 10 µl do produto de PCR purificado. Por fim, as sequências obtidas são analisadas usando um programa específico.

[017] A Figura 1 apresenta a avaliação de uma nova variante no gene *agrecan* potencialmente associada ao nanismo condrodisplásico em cavalos miniatura, em que: a linha superior representa: animal normal (A/A); linha do meio: animal heterozigoto,

substituição (A/T) em um alelo (seta verde); linha inferior: animal afetado (T/T), substituição (A/T) nos dois alelos (seta vermelha).

[018] O kit de detecção para a execução do método proposto consiste nos *primers*, definidos como DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13.

[019] *Primer*: DG_ACAN_Eq_F13 5'-CAGTGGGACAACATCTGGAA-3'; *Primer*: DG_ACAN_Eq_R13 5'-CTTCTCCACTGGACTCAACAA-3'; Tamanho do produto: 803 pb.

[020] O método de detecção ora proposto apresentou 100% de eficiência na identificação dos animais tipo selvagem, animais heterozigotos e homozigotos para a mutação g.95271115A>T.

[021] No tocante à comercialização, o objetivo do presente pedido de patente de invenção é o de oferecer teste genético que permita orientar os acasalamentos dos animais com o intuito de diminuir a prevalência do nanismo condrodissplásico em equinos de raças pônei no Brasil.

REIVINDICAÇÕES

1. **“MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, o dito de método **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a) Coletar a amostra biológica do animal de interesse;
- b) Extrair o DNA das amostras biológicas;
- c) Submeter o DNA a uma reação de PCR com os *primers* específicos (DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13);
- d) Submeter os produtos de PCR purificados ao sequenciamento direto utilizando os *primers* específicos (DG_ACAN_Eq_F13 ou DG_ACAN_Eq_R13);
- e) Analisar as sequências obtidas em um programa específico.

2. **“MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por**, na etapa (a), a amostra biológica consistir em sangue, pele, bulbos pilosos ou outros tecidos.

3. **“MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelo** DNA das amostras ser extraído e submetido a uma PCR utilizando os *primers* específicos e definidos como DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13, que correspondem aos *primers* que flanqueiam a região da mutação g.95271115A>T.

4. **“MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, de acordo a reivindicação 3, **caracterizado por** cada análise de PCR ser realizada em uma amostra contendo volume final de 25 µl: 2,5 µl de DNA, 0,3 µM dos *primers*, 12,5 µl de DNA polimerase e 8,5 µl de água livre de nucleases; em que as condições de termociclagem são: 95°C por 5 min (para promover a desnaturação inicial), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 30s, 63°C por 60s e 72°C por 60s; e em que, faz-se uma extensão final de 72°C por 5 min.

5. **“KIT DO MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, o dito kit de detecção para a execução do método **caracterizado por** compreender os *primers*, definidos como DG_ACAN_Eq_F13 e DG_ACAN_Eq_R13; com as seguintes condições:

Primer: DG_ACAN_Eq_F13 5'-CAGTGGGACAACATCTGGAA-3';

Primer: DG_ACAN_Eq_R13 5'-CTTCTCCACTGGACTCAACAA-3';

Tamanho do produto: 803 pb.

6. **“USO DO MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS”**, **caracterizado por** ser usado em equinos com nanismo condrodisplásico.

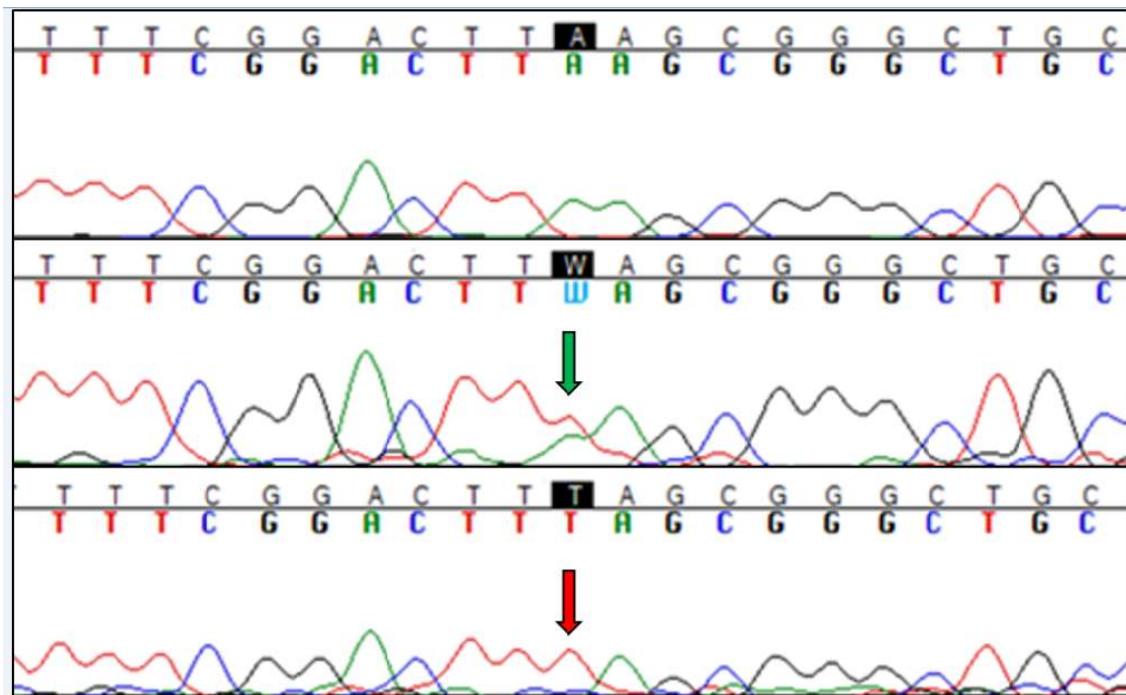


FIGURA 1

RESUMO

MÉTODO DE DETECÇÃO DA MUTAÇÃO g.95271115A>T NO GENE AGRECANO ASSOCIADA AO NANISMO CONDRODISPLÁSTICO EM EQUINOS; KIT DE DETECÇÃO E USO DO MÉTODO.

O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção da mutação g.95271115A>T no gene agrecano, associada ao nanismo condrodisplásico em equinos, assim como o kit de detecção apropriado para tal, e ao uso do referido método. O presente pedido de patente de invenção refere-se a um método de detecção que pode ser aplicado na confirmação diagnóstica de animais portadores da doença clínica (homozigotos) e na identificação dos animais sem manifestação clínica da doença, mas carregadores de um alelo mutado (heterozigotos) e, portanto, possibilita a orientação dos acasalamentos. O público-alvo é o de criadores de equinos de raças pônei, filiados ou não às associações das raças Pônei (ABCC Pônei) ou Mini-Horse (ABCMH). Os objetivos estão relacionados também à descoberta de uma nova mutação responsável pela doença em equinos e esta mutação está presente em heterozigose em aproximadamente 10% da população brasileira de Mini-Horses.