

BRUNA TRENTINARO IBIAPINA

Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos

São Paulo

2021

BRUNA TRENTINARO IBIAPINA

Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D' Avila
Assumpção

Co-Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4110
FMVZ

Ibiapina, Bruna Trentinaro
Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos / Bruna Trentinaro Ibiapina. – 2021.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpção.
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis.

1. Verificação de parentesco. 2. Microssatélite. 3. *Multiplex*. 4. Equinos. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento e validação de kit multiplex para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos.", protocolada sob o CEUA nº 4972261018 (ID 006176), sob a responsabilidade de **Mayra Elena Ortiz D' Ávila Assumpção** e equipe; *Bruna Trentinaro Ibiapina* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/02/2019.

We certify that the proposal "Development and validation of a Equine Genotyping kit based on microssatellites markers for individual identification and parentage testing.", utilizing 50 Equines (males and females), protocol number CEUA 4972261018 (ID 006176), under the responsibility of **Mayra Elena Ortiz D' Ávila Assumpção** and team; *Bruna Trentinaro Ibiapina* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/20/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 03/2019 a 07/2020

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [2 a 10 anos](#)

N: [50](#)

Linhagem: [Quarto de Milha](#)

Peso: [380 a 550 kg](#)

Local do experimento: O experimento será realizado no Laboratório Centervet, localizado na rua Alfredo Bueno, 450, Jaguariúna - SP, o qual receberá somente as amostras de sangue, não tendo manipulação direta dos animais na propriedade,

São Paulo, 09 de agosto de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: IBIAPINA, Bruna Trentinaro

Título: **Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A meus pais, Hugo e Clotilde, e a meu irmão Matheus, os quais são
minha base e inspiração para me tornar alguém cada vez melhor*

A meu amor e amigo Henrique pelo apoio sempre

A meu querido e amado afilhado Rafa

Com muito AMOR dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, simplesmente por *tudo* e pela oportunidade de evolução em nossa caminhada.

À minha **família**, por serem os primeiros a acreditar e torcer por mim e por compreenderem minha ausência quando necessária, especialmente ao **Rafinha**. A **meus pais**, por terem feito sempre tudo para que eu pudesse aproveitar todas as oportunidades; ao meu irmão **Matheus**, que desde que me conheço por gente é meu amigo e melhor exemplo, e o qual já me reconhece como sua mestra mesmo muito antes do início deste projeto e qualquer título formal (rssss). Ao **Buz e Farol**, que estavam sempre ao meu lado durante os estudos e produção dessa dissertação, pela *cia*, ronronados e carinho e aos outros “filhotes” pela reconexão, escape e renovação de energia.

Ao **Henrique**, por todo o suporte, parceria, paciência e apoio; por estar ao meu lado nos momentos difíceis, por dividir tanto do nosso tempo com meus projetos, torcendo sempre para meu sucesso. Você é muito importante na minha vida!

Gostaria de agradecer imensamente aos orientadores **Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D’Ávila Assumpção** e **Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis** pela confiança em meu potencial, por toda ajuda e disponibilidade sempre desde o início! Por todo o aprendizado, mais que técnico, de motivação, de capricho, de renovação, de humildade, de competência, de exemplo, de amor ao que se faz. Espero ter correspondido ao grande privilégio de ter vocês dois como orientadores!

Ao **Lucas Botega Spinelli** por apoiar meu crescimento, acreditar no sucesso desse projeto e prover todas condições necessárias para execução, mesmo em períodos difíceis e de incertezas. Por me oferecer flexibilidade nos horários de trabalho para que eu pudesse realizar essa etapa tão importante! Gratidão!!

A minha companheira e amiga **Gabis** (Gabrieli Cardozo Modolo Guardia) por ser quem você é para mim! Pela amizade, pela convivência diária, por compartilhar ansiedades, receios, sonhos, aprendizado, e muitas muitas muitas risadas! Esse projeto só foi possível pelo seu carinho e disposição em assumir tanta coisa na rotina, para que eu tivesse o tão precioso tempo necessário para desenvolver! Muito obrigada de coração!! Conte sempre comigo!

Aos amigos que fiz no **Centervet**, para toda uma vida, por todo o carinho, pelos muitos momentos divertidos, muito aprendizado e colaboração dentro e fora do laboratório, em especial a **Julys**, **Cleitão** e **Ewertonis**, companheiros de bancada, pessoas brilhantes cheias de sucesso pela frente!

A todos os funcionários do Centervet pela convivência e ajuda durante todo o tempo, pelos momentos de descontração, pela disposição sempre de ajudar uns aos outros, pelo dia a dia mais do que agradável.

Aos amigos novos do VRA que pude conhecer e conviver durante a disciplina cursada no departamento! Obrigada por me receberam tão bem e estarem sempre dispostos a me ajudar, **Vivian**, **Carol**, **Felipe**, **Paco** e em especial a **Júlia** pelo apoio, força e toda ajuda! Obrigada Ju!!!!

Aos amigos não tão novos do VRA que o mestrado me deu a oportunidade de reencontrar, **Thais**, **Profa. Camilla**, **Driiii**, **Tomás**!! Desenvolver o projeto em outro lugar me deixou com gostinho de saudade dessa convivência, que por muito tempo ficou mais virtual! Cada vez que lia no grupo “tem ovários hoje” minha vontade era escrever “uuu” e sair correndo para participar!

Ao **Programa de Pós Graduação**, representado aqui em especial pela **Harumi** pela paciência e toda ajuda burocrática, e pelas tantas novas oportunidades geradas.

À **ESALQ**, em especial a **Nirlei**, **Prof. Coutinho** e **Aline** pelos valiosos ensinamentos e por terem sido sempre tão receptivos.

À **FEA**, em especial ao **Prof. Pedroso, Rafa, Feng e Tavares** pela oportunidade, pelo conhecimento, por acreditarem no meu potencial e abrirem caminhos de um mundo onde é possível unir ciência, tecnologia e empreendedorismo.

À **FMVZ-USP** por desde a graduação ter me proporcionado (e continuar me proporcionando) tantas oportunidades de aprendizado, de contato com pessoas excepcionais, de momentos inesquecíveis e fazer toda diferença na minha vida.

Ao amigo **Renato Astorino**, por ter sempre me incentivado e por ter me introduzido no mundo dos microssatélites quando eu ainda nem sequer sabia o que era STR, antes mesmo da oportunidade de mestrado! Pelas conversas científicas, financeiras e de vida!

À **Fulvia Di Pillo** e ao **Eduardo Rodrigues** pela sempre disposição na colaboração deste projeto!

À **Exxtend** pela parceria na síntese dos primers marcados e ajuda sempre que possível em relação aos prazos.

Aos “**amigosemférias**” por serem os melhores amigos que a faculdade me deu para vida.

"... é aquela pessoa que sabe que não sabe tudo. É aquela que sabe que não é a única que sabe. Aquela que sabe que outra pessoa sabe o que ela não sabe. Aquela que sabe que ela e outra pessoa saberão muitas coisas juntas. Aquela que sabe que ela e a outra pessoa nunca saberão tudo aquilo que pode ser sabido."

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

IBIAPINA, B T. **Desenvolvimento e validação de kit *multiplex* para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos.** 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O desenvolvimento da indústria equina tem aumentado a demanda por testes de verificação de parentesco para fins de registro na raça, os quais são realizados pela análise de regiões microssatélites de repetições curtas (STR). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento exige, atualmente, a análise de 12 marcadores para o painel principal (sendo 9 obrigatórios e 3 a escolher entre outros 8) e 12 marcadores para um painel adicional (a escolher entre possíveis 15). No Brasil há apenas um kit comercial disponível para um painel principal, o qual possui elevado custo, e nenhum kit comercial disponível para o painel adicional. Desta forma, muitos laboratórios são levados a desenvolver seus próprios testes, os quais são realizados utilizando-se várias reações de PCR. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de reações múltiplas (*multiplex*) para cada um dos painéis com custo baixo e alta eficiência. Foi realizada análise *in silico* dos *primers* recomendados pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG), organização responsável pela padronização desses testes, para 17 marcadores do painel principal (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 e VHL20) e para 15 marcadores do painel adicional (TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 e TKY394), os quais foram testados, quanto a sua eficiência, em formato monoplex e depois em formato *multiplex*. Foram redesenhados *primers* para 11 marcadores STR visando a melhor eficiência do sistema *multiplex* para cada painel. As concentrações de cada *primer* foram ajustadas para obtenção de uma amplificação equilibrada para todos os *loci*. As amostras foram sequenciadas no equipamento ABI 3130XL® (*Applied Biosystems*) e posteriormente analisadas no software Genemapper® v 5.0 (*Applied Biosystems*). Foi desenvolvido parcialmente um sistema *multiplex* com 14 marcadores para o painel principal de genotipagem de equinos (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3 e VHL20), uma vez que o marcador obrigatório HTG10 obteve resultado satisfatório apenas no

formato monoplex, precisando ser testado em uma reação de PCR a parte. Os resultados das 50 amostras analisadas pelo sistema desenvolvido neste estudo, para o painel principal, foram consistentes quando comparados aos do kit comercial *Equine Genotypes*® (*Thermo Fisher Scientific*). Para o painel adicional (série TKY) foi possível o desenvolvimento composto de dois sistemas *multiplex*, um contemplando 8 marcadores (TKY 279, TKY297, TKY301, TKY312, TKY325, TKY337, TKY374 and TKY394) e outro contemplando 5 marcadores (TKY287, TKY321, TKY333, TKY343 and TKY344). Ambos os sistemas reproduziram os resultados das amostras referências provenientes da ISAG e testadas neste estudo. Pode ser concluído que ambos os painéis apresentaram bons resultados para análises, sendo possível desenvolver dois sistemas multiplex, atendendo o objetivo de desenvolver um método de baixo custo a alta eficiência, embora em duas etapas. Mais estudos deverão ser desenvolvidos com a finalidade de reunir em um único sistema multiplex todos os marcadores necessários.

Palavras-chave: Verificação de Parentesco. Microsatélite. Marcadores Genéticos STR.

ABSTRACT

IBIAPINA, B T. **Development and validation of a equine genotyping multiplex kit based on microsatellite marker analysis for individual identification and parentage testing.** 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The development of the modern horse industry has increased the demand for equine parentage tests for pedigree verification, which are based in short tandem repeats (STR) analysis. These tests use 12 STR markers (of which 9 are compulsory and 3 chosen from another 8) for a main panel and other 12 STR (chosen from possible 15) for an additional panel and are regulated by the Ministry of Agriculture, Cattle and Supply (MAPA). There is only one imported commercial kit available in Brazil for the main panel, which it is costly and there are not any commercial kits available for the secondary panel. Thus, many laboratories must customize their own tests, which are performed by several PCR reactions. This work aimed to develop a novel multiplex STR typing system for each panel with low cost and high efficiency. Seventeen primers recommended by ISAG for the main panel (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 and VHL20) and fifteen recommended for the additional panel (TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 and TKY394) were submitted to *in silico* analysis. Then primers were validated individually and then jointly to test the efficiency of the multiplex system. Eleven primers were redesigned to establish a novel multiplex PCR system for each panel. Primer concentrations were adjusted in order to achieve a well-balanced set of amplicons for all markers. Samples were loaded into ABI 3130XL® Analyzer (Applied Biosystems) and then analyzed in Genemapper® v5.0 software (Applied Biosystems). A single multiplex STR genotyping system was partially developed for the main equine panel containing 14 *loci* (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3 and VHL20) because HTG10 – which is compulsory - only amplified well in a separately PCR reaction. Results from 50 tested samples were concordant between Equine Genotypes® kit (Thermo Fisher Scientific) and the system developed in this study for the main panel. Two multiplex PCR systems were developed for the additional panel, one containing 8 markers (TKY279, TKY297,

TKY301, TKY312, TKY325, TKY337, TKY374 and TKY394) and other containing 5 markers (TKY287, TKY321, TKY333, TKY343 and TKY344). The developed multiplex systems were able to detect all alleles from ISAG reference samples tested in this work. Results indicate that multiplex systems worked well and are cost-effective while performed in 2 PCR reactions for each panel. Further studies are needed to include all markers in a single multiplex PCR reaction.

Keywords: Parentage testing. Microsatellite. STR Genetic Markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de qualificação de parentesco do produto testado com a égua e o garanhão.	27
Figura 2: Representação esquemática da separação por tamanho e cor dos amplicons.	40
Figura 3: Comparação da sequência do <i>primer</i> recomendado com a base de dados pública de nucleotídeos (NCBI Blast) para a espécie equina (NC_009159.3).	43
Figura 4: Classificação dos eletroferogramas obtidos.....	48
Figura 5: Eletroferograma com ausência de amplificação para o marcador TKY279.	49
Figura 6: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o marcador HTG10 em formato monoplex utilizando o <i>primer reverse 1</i>	50
Figura 7: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema <i>mutiplex</i> , sem amplificação para o marcador HTG10.	50
Figura 8: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o marcador HTG10 em formato monoplex utilizando o <i>primer reverse 2</i>	50
Figura 9: Distribuição dos marcadores conforme tamanho e marcação com fluoróforo na versão final do painel principal.	52
Figura 10: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema <i>mutiplex</i> para o painel principal.	52
Figura 11: Distribuição dos marcadores conforme tamanho e marcação com fluoróforo na versão final do painel adicional.	54
Figura 12: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema <i>mutiplex</i> para o painel adicional 1.	54
Figura 13: Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema <i>mutiplex</i> para o painel adicional 2.	55
Figura 14: Classificação dos picos obtidos com o kit desenvolvido neste estudo.	57
Figura 15: Eletroferogramas gerados pela amplificação de 10ng de DNA com o kit <i>Equine Genotypes®</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>) e pelo sistema <i>mutiplex</i> desenvolvido neste estudo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos novos <i>primers</i> com respectivas temperaturas de <i>melting</i> , conteúdo CG e motivo pelo qual os <i>primers</i> originais foram redesenhados - painel principal.	44
Tabela 2: Sequência dos novos <i>primers</i> com respectivas temperaturas de <i>melting</i> , conteúdo CG e motivo pelo qual os <i>primers</i> originais foram redesenhados – painel adicional.	45
Tabela 3: Agrupamento dos marcadores por tamanho do <i>amplicon</i> e tipo de fluoróforo usado na marcação – Painel Principal.	45
Tabela 4: Agrupamento dos marcadores por tamanho do <i>amplicon</i> e tipo de fluoróforo usado na marcação – Painel Adicional.	46
Tabela 5: Agrupamento dos marcadores por tamanho, marcação com fluoróforo e concentração de cada <i>primer</i> após inclusão dos novos <i>primers</i> desenhados – Painel Principal.	51
Tabela 6: Agrupamento dos marcadores por tamanho, marcação com fluoróforo e concentração de cada <i>primer</i> após inclusão dos novos <i>primers</i> desenhados – Painel Adicional 1 e 2.	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Painel de marcadores STR recomendados pela ISAG para a identificação genética de equinos.	39
Quadro 2: Painel de marcadores STR do painel adicional para a identificação genética de equinos.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
µM	Micromolar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Cal Fluor Red 590	<i>CAL Fluor Red 590 Carboxylic Acid</i>
CG	Citosina e Guanina
Crom	Cromossomo
Cy3	<i>Cyanine 3-dUTP</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonuceotídeo 5'-trifosfato
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAM	<i>Carboxi-64 fluoresceína</i>
HEX	<i>Hexametilrodamina</i>
ISAG	<i>International Society for Animal Genetics</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emissions of Radiation</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Min	Minuto
n	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de Base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
s	Segundo
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
Ta	Temperatura de Anelamento
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
μ	Micro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	MICROSSATÉLITES STR	25
2.2	TESTE DE GENOTIPAGEM EM EQUINOS	26
2.3	TÉCNICA STR E SNPS	28
2.4	TÉCNICA DE PCR <i>MULTIPLEX</i> E ELETROFORSE CAPILAR AUTOMATIZADA	30
2.5	VALIDAÇÃO DO SISTEMA <i>MULTIPLEX</i> DE GENOTIPAGEM	31
2.6	KITS COMERCIAIS	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	GERAL	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	35
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA	36
4.3	DESENHO E MARCAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	36
4.4	REAÇÃO DE PCR	41
4.5	ELETROFORESE CAPILAR E ANÁLISE DE DADOS	42
4.6	VALIDAÇÃO	42
5	RESULTADOS	43
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS <i>PRIMERS</i> RECOMENDADOS	43
5.2	MARCAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> COM FLUORÓFORO	43
5.3	ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS <i>PRIMERS</i> EM FORMATO MONOPLEX	47
5.4	ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS <i>PRIMERS</i> EM FORMATO <i>MULTIPLEX</i>	49
5.5	DESEMPENHO DOS <i>PRIMERS</i> REDESENHADOS	49
5.6	PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> NO SISTEMA <i>MULTIPLEX</i> – PAINEL PRINCIPAL	51
5.7	PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> NO SISTEMA <i>MULTIPLEX</i> – PAINEL ADICIONAL	53
5.8	VALIDAÇÃO	56

6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	71

1 INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio do cavalo apresenta elevada importância no país, movimentando anualmente cerca de R\$ 16,1 bilhões, segundo estudo realizado pela Câmara de Equideocultura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) com uma tropa, estimada, superior a 5 milhões de cavalos. Além disso, o nível de competitividade e exigência de qualidade destes animais é cada vez maior, levando a um processo seletivo rigoroso acompanhado de melhoramento genético expressivo. A genotipagem de um animal serve para verificar sua origem e garantir seu valor genético e econômico. Considerando a importância desses fatores na moderna indústria do cavalo, torna-se fundamental a realização de um controle genealógico, o qual deve ser aplicado com eficiência uma vez que erros resultarão em falsas estimativas de herdabilidade gerando perdas reprodutivas, produtivas e econômicas (RIVETTI JR, 2016).

Nesse contexto, a demanda por métodos confiáveis para identificação individual de cavalos, testes de verificação de parentesco e outras análises genéticas tem crescido significativamente, uma vez que constituem ferramentas primordiais para o controle genealógico (VAN DE GOOR; VAN HAERINGEN, 2007; CHEN et al., 2010). Atendendo a essa necessidade, as Associações das diversas raças de equinos exigem para registro de novos produtos o teste de confirmação de parentesco dos supostos pais, realizado hoje por meio da técnica de análise de microssatélites *Short Tandem Repeats* (STRs). Os STRs são repetições curtas de nucleotídeos que variam de dois (CTCTCTCTCTCT...) a seis nucleotídeos (CTGGATCTGGATCTGGAT...), por exemplo, e ocorrem frequentemente no genoma eucarioto, constituindo a identificação genética individual, inalterável com a idade ou condições fisiológicas. Por apresentarem alto polimorfismo e dispersão uniforme, são os marcadores mais comumente utilizados para genotipagem. As principais vantagens da utilização dos microssatélites são a pouca quantidade de amostra biológica necessária, a variedade de tipo de amostra (sangue, pelos com bulbos, sêmen, entre outras) que pode ser utilizada, a possibilidade de uma análise rápida, fácil, eficiente e com alto conteúdo informacional (ELLEGREN, 2004).

O teste de paternidade se baseia na herança mendeliana e em uma comparação de distribuição de perfis alélicos, transmitidos dos pais para o filho. A genotipagem por análise de fragmentos microssatélites é altamente precisa e

específica (REGITANO; VENERONI, 2009). Cabe lembrar, que os testes de paternidade são baseados no princípio da exclusão genética, ou seja, verificar se um determinado animal não pode ser o progenitor do produto em análise. A probabilidade de exclusão de falso parentesco está relacionada à probabilidade de um determinado indivíduo escolhido aleatoriamente não ser progenitor de um determinado produto (BIERMAN, 2010).

O teste consiste na amplificação do DNA pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* específicos para os marcadores STRs escolhidos. Em seguida, esse produto da PCR é submetido à corrida em eletroforese capilar em um sequenciador automático, separando os fragmentos por tamanho. A análise é realizada em um *software* permitindo identificar os alelos de cada indivíduo analisado, sendo esta uma técnica utilizada no mundo todo para registro genealógico. Um grande número de marcadores STR de equinos foi identificado por análise genômica (MITTMANN et al., 2010) e 17 di-nucleotídeo STRs foram validados para teste de verificação de parentesco e genotipagem forense (BOWLING et al., 1997; LEE; CHO, 2006; VAN DE GOOR; VAN HAERINGEN, 2007) e avaliados em raças brasileiras (SILVA, 2012).

Com o objetivo de preservar a autenticidade dos registros genealógicos, em 2004, o MAPA normatizou para bovinos e equinos o teste de verificação de parentesco (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 74, de 20 de Outubro de 2004), baseados internacionalmente nas recomendações da *International Society for Animal Genetics* (ISAG). Esta organização internacional é responsável tanto pela padronização de um sistema mundial de nomenclatura alélica, útil na identificação individual em casos de exportação, como pela organização e realização de testes regulares de proficiência, chamados *Comparison Test* para diversas espécies. Esses testes fazem uso de comparações interlaboratoriais de ensaios para as mesmas amostras analisadas, com o objetivo de avaliar a confiabilidade dos resultados gerados em laboratórios do mundo todo e estão sujeitos a um rigoroso controle de qualidade (BOWLING, 2001; LEE; CHO, 2006). No Brasil, os laboratórios credenciados devem participar obrigatoriamente de todos os testes oferecidos para as espécies as quais possuam escopo, com aproveitamento mínimo pré determinado de acordo com a quantidade de participações prévias. Por exemplo, na primeira participação no teste o credenciado deve obter, no mínimo o resultado compatível com o nível 3 (90,0 % a 94,9 % de acerto), já a partir da terceira

participação, é exigido um resultado compatível com nível 1 (acima de 98,0 % de acerto).

Rivetti Jr (2018) relatou uma considerável heterogeneidade entre os laboratórios brasileiros credenciados, dos quais 25% apresentaram nota mínima no teste de comparação por STR para bovinos, promovidos pela ISAG em 2016-2017. Ainda no resultado deste mesmo teste, entre todos os laboratórios internacionais participantes, apenas cinco apresentaram desempenho insatisfatório, sendo 2 deles laboratórios brasileiros, em um total de 85 participantes. Essas falhas ocorrem, entre outras causas, por erros de interpretação, principalmente devido a ampliações de baixa qualidade, como por exemplo a presença de ruídos ou de picos de baixa intensidade que acabam não sendo detectados. Um dos potenciais motivos é a falta de padronização das condições do teste, como composição dos grupos de PCR *mutliplex* e concentração dos *primers*. Inconsistências de resultados também são relatadas por associações de raças e criadores que apresentam dificuldades de registro e resultados divergentes entre laboratórios.

A recomendação de um painel adicional foi acrescentada em 2017, para aumentar a confiabilidade do teste quando há apenas uma discrepância no painel principal. Neste caso, deverão ser testados outros 12 marcadores e a relação de parentesco só é qualificada caso permaneça apenas uma única discrepância. No entanto, ainda há poucos estudos para esses marcadores de equinos no Brasil. Este painel é baseado em 15 marcadores estudados e desenvolvidos por Tozaki e colaboradores (2001), conhecidos como série TKY. Além disso, por esses marcadores não serem obrigatórios nos testes comparativos da ISAG, os resultados dos laboratórios brasileiros ainda não foram comparados entre si e nem com os resultados oficiais da ISAG.

Apesar da demanda e da importância destes testes, ainda não há kits comerciais viáveis para genotipagem de marcadores STRs. Os kits quando disponíveis são importados, algumas vezes obsoletos, com custo elevado e com qualidade baixa para alguns marcadores, despendendo muito tempo para análise e interpretação de resultados (GASTALDO, 2017). Além disso, nem sempre contemplam todos os marcadores recomendados pela ISAG ou exigidos pelo MAPA (GASTALDO, 2017; SHANG et al., 2018). Vale ressaltar que o painel adicional, série TKY, não possui nenhuma opção comercial disponível. Desse modo, muitos laboratórios que realizam o serviço de genotipagem de animais optam pelo

desenvolvimento de seus próprios painéis de marcadores STR. Tal saída dificulta uma padronização entre laboratórios, gerando impactos na qualificação de animais, uma vez que os resultados de identificação genética podem ser inclusive compartilhados e utilizados como referência na qualificação ou não de um produto por outro laboratório. Outra desvantagem na rotina laboratorial é que estes painéis próprios não são elaborados para amplificar todos os marcadores em apenas uma reação de PCR, demandando uma maior quantidade de DNA inicial, além do aumento de tempo e custo de execução de cada genotipagem.

Dessa maneira, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de dois kits para identificação genética de equinos, sendo um para o painel principal e outro para o painel adicional, com alta eficiência e custo acessível ao mercado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A base da identificação genética entre os indivíduos está no DNA. As diferentes sequências do DNA presentes em cada ser os tornam indivíduos únicos. Regiões extra-gênicas ou não codificantes para nenhuma característica podem ocorrer de forma repetitiva, apresentando um alto grau de polimorfismo e dessa forma podem ser utilizadas como marcadores para fins de identificação genética (FOWLER et al., 1988; TAKEZAKI; NEI, 1996).

O DNA não-codificador repetido pode ser dividido em três classes distintas: DNA-satélite, minissatélite e microsatélite, de acordo com a ocorrência de variação dos tamanhos médios das unidades de repetições nucleotídicas. Enquanto os minissatélites apresentam sequências repetitivas de tamanho moderado, os microsatélites, conhecidos como *Short Tandem Repeats* (STR) apresentam essas sequências repetitivas em *tandem* de tamanho curto, dispersas em todo o genoma. São formados por unidades de repetição cujas sequências nucleotídicas apresentam de 2 a 6 pares de bases, formando blocos de repetição de 50 a 500 pb (GLOWATZKI-MULLIS et al., 1995; MACHUGH et al., 1998). Uma vantagem das regiões STR para identificação genética é a utilização de quantidades mínimas de DNA ou até mesmo amostras altamente degradadas, ao contrário dos marcadores mini-satélites, que apesar do alto grau de polimorfismo, requerem DNA em maiores quantidades e altamente preservado (PENA, 1995).

2.1 MICROSSATÉLITES STR

Os marcadores STR são elementos repetitivos de DNA, com número de repetições variáveis. Assim, em alguns indivíduos a unidade de repetição (exemplo GA) pode acontecer 8 vezes, em outros 10, 12, 18 ou n vezes. A variação do número de repetições gera alelos de diferentes tamanhos, tornando-os interessantes marcadores para populações genéticas (GLOWATZKI-MULLIS et al., 1995; MACHUGH et al., 1998). O grau de polimorfismo de determinado marcador indica sua qualidade para estudos genéticos e está relacionado ao número de alelos e suas frequências. Bowling et al. (1997) destacaram como aspectos importantes para a escolha dos microsatélites o conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de

paternidade (IP), poder de exclusão (PE), baixa taxa de mutação, segregação independente, facilidade de execução, não ter evidência de alelos nulos e facilidade técnica.

Em equinos estes marcadores são amplamente utilizados para identificação genética e verificação de parentesco. A primeira descrição dos *loci* STR nos anos 90 direcionou a Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG) a desenvolver o painel de recomendação internacional desses marcadores em 1998.

O poder de discriminação genética está relacionado à quantidade de *loci* STR analisados, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas *multiplex*. A vantagem deste sistema é a amplificação, em uma única reação de PCR, de vários marcadores simultaneamente, reduzindo a quantidade de amostra de DNA utilizada na análise (BUDOWLE et al., 2000) além do tempo e do custo do procedimento. A genotipagem das amostras resultará em uma tabela em que cada indivíduo apresentará dois alelos por *locus*.

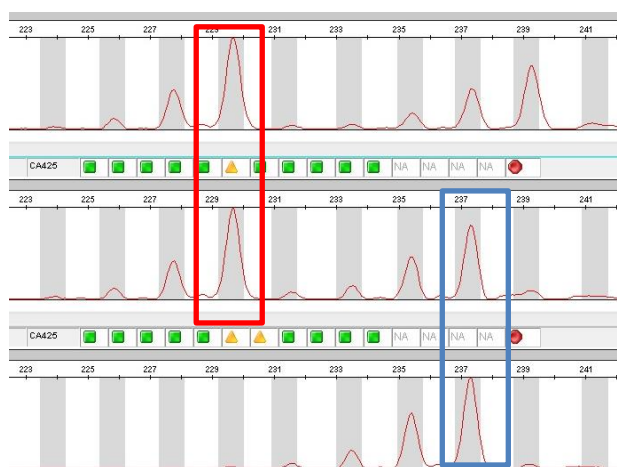
É fundamental para a estimativa dos valores genéticos dos animais que essas informações de paternidade sejam acuradas (BARON et al., 2002, CHOI et al., 2008). Em bovinos por exemplo, as taxas de erros de identificação e verificação de parentesco variam de 5 a 23%, provocando viés na estimativa de parâmetros genéticos e de valores de melhoramento e seleção genética (RON et al., 1996; ISRAEL; WELLER, 2000; BANOS et al., 2001). Segundo Woodward e Van der Lende (2008), estes erros de genealogia estão associados a quedas de 2,5 a 15% no ganho genético de populações sob seleção.

2.2 TESTE DE GENOTIPAGEM EM EQUINOS

Muitas associações de raças de cavalos exigem para registro de um produto um teste de verificação de parentesco. Além disso, os testes de verificação também podem ser utilizados para os casos em que os pais são desconhecidos por qualquer motivo, por exemplo na possibilidade de dois potenciais ganhões. A análise de parentesco é baseada na premissa da exclusão, que por sua vez se baseia em 2 princípios genéticos: (1) cada alelo presente no produto obrigatoriamente precisa estar presente em pelo menos um dos alelos do susposto reprodutor ou reprodutora e (2) os reprodutores devem contribuir com 1 alelo para cada um dos marcadores

analisados do produto. Quando um reprodutor não pode ser excluído, considera-se que ele qualifica, conforme figura 1. O número de marcadores utilizados é dependente do quanto se considera suficiente para detectar uma exclusão. Como os alelos apresentam diferentes tamanhos entre os indivíduos (baseado no número de repetições), o teste consiste em determinar os tamanhos de alelos em cada *locus* investigado. Os alelos do produto são comparados com os alelos dos possíveis reprodutores, utilizando os princípios de exclusão.

Figura 1 – Exemplo de qualificação de parentesco do produto testado com a égua e o garanhão.



Legenda: O eletroferograma superior é referente à possível mãe, o intermediário ao produto testado e o inferior ao suposto pai. Destacado em vermelho o alelo compartilhado entre a suposta mãe e o produto e em azul o outro alelo do produto compartilhado com o suposto pai.

Fonte: Ibiapina (2021).

A natureza internacional da indústria equina, da movimentação de cavalos, de sêmen e de embriões pelo mundo, bem como a exigência do teste de verificação genética para registro dos animais, tornou indispensável uma padronização dos marcadores utilizados e da nomenclatura dos respectivos alelos. Isso possibilita que resultados entre laboratórios possam ser compartilhados e que os resultados de genotipagem de possíveis reprodutores já testados em um laboratório possam ser utilizados para comparação com o genótipo obtido de um produto realizado por outro laboratório.

Essa padronização da genotipagem equina por STR foi realizada pela Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG - *International Society of Animal Genetics*), por meio de pesquisas e *workshops*, sendo o primeiro em 1996 na

França. Atualmente um painel de 12 marcadores foi estabelecido e é utilizado pelos laboratórios. A padronização da nomenclatura alélica se dá com letras do alfabeto, do menor para o maior tamanho, sendo o alelo “M” representado pelo de tamanho médio para cada marcador (BELLONE; AVILA, 2020). Um painel adicional foi sugerido pela ISAG baseado em Tozaki e colaboradores (2001) que selecionaram 15 marcadores para realização apenas em casos de dúvidas de qualificação, quando da utilização do painel principal.

No Brasil está em vigor a Instrução Normativa Nº 45, 15 de Dezembro de 2017, aprovando os critérios e requisitos específicos para o credenciamento de laboratórios que realizam testes de identificação genética e verificação de parentesco de animais pela análise do DNA, visando o registro genealógico e a inscrição de reprodutores. Esta Instrução Normativa ainda atualiza os marcadores STRs que devem ser empregados. Para a espécie equina, os indivíduos devem ser genotipados, no mínimo, em 12 *loci* microssatélites sendo compulsoriamente AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4 e VHL20 e outros três microssatélites a serem escolhidos entre ASB17, ASB23, LEX3, HTG6, HTG7, HMS1, HMS2 e CA425. No caso de discrepância em apenas um microssatélite do painel principal, deve-se testar o painel adicional de 12 microssatélites da série TKY, em todos os indivíduos envolvidos no teste de identificação genética, escolhidos entre: TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 e TKY394. Caso permaneça apenas uma discrepância neste painel, pode-se qualificar o produto.

2.3 TÉCNICA STR E SNPS

O conhecimento do genoma equino vem sendo amplamente melhorado desde os anos 90, quando os marcadores STR foram descobertos. Na última década, o genoma completo de milhares de cavalos permitiu a revelação de milhões de variações genéticas. Os polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) são variações de uma única base em relação a uma sequência referência, e são o tipo de variação mais abundante no genoma. No entanto, a quantidade de SNPs necessária para atingir o mesmo poder de exclusão é muito maior comparada com a análise por STR, e seu número exato depende da

raça e da frequência alélica encontrada naquela população. Apesar de já terem sido desenvolvidos estudos e testes, a genotipagem por SNP em equinos ainda não é oficialmente reconhecida pela ISAG.

Apesar da Instrução Normativa 45 (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 45, de 15 de Dezembro de 2017) ter permitido pela primeira vez o uso de SNPs como metodologia para genotipagem e verificação de parentesco para a espécie bovina, a técnica de microssatélites (STRs) permanece sendo exigida para indivíduos ou materiais genéticos importados com genótipos pré estabelecidos pelo teste de SNPs. Da mesma forma, ainda não é permitida a imputação de dados entre as duas técnicas, uma vez que a correlação varia de 96 a 97% dependendo dos marcadores (RIVETTI JR, 2018).

Para as demais espécies, como a equina, ainda não há liberação de uso para registro no Brasil, sendo recomendado utilizar a quantidade de marcadores definidos pela ISAG (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 45, 2017).

Apesar de diferentes grupos estarem pesquisando a técnica de SNPs para análise de paternidade em equinos, ainda há informações insuficientes, com poucos painéis publicados e não avaliados para as diversas raças. Como o poder do teste de paternidade se baseia nas frequências alélicas, é de vital importância a avaliação desse marcadores nas raças que se desejam realizar os testes (HOLL et al., 2017; KUN et al., 2018).

Além disso, a acurácia da genotipagem por STR e o extenso banco de dados históricos existentes nas associações de raças não motivam ainda a indústria equina a substituir a tecnologia de STR por SNP (BELLONE; AVILA, 2020). O alto custo também pode ser um fator limitante para a implantação da técnica inicialmente, uma vez que exige para escala comercial um equipamento de sequenciamento de Nova Geração. Outro fator, a se considerar, é que a personalização de um painel SNP não é comum – como acontece com os kits próprios para STRs, sendo mais usual o uso de chips comerciais importados, o que poderia gerar uma limitação quanto ao preço e prazos praticados hoje no mercado.

2.4 TÉCNICA DE PCR *MULTIPLEX* E ELETROFORSE CAPILAR AUTOMATIZADA

A técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) foi descrita por Kary Mullis, em meados da década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Esta consiste em uma reação catalisada pela enzima DNA Polimerase e apoiada em propriedades físico-químicas do DNA, na qual uma região específica do genoma é amplificada *in vitro*, resultando em milhões de cópias de um único segmento do DNA.

A reação *multiplex* é uma variação do PCR e consiste na amplificação simultânea de mais de um segmento genômico em uma única reação, utilizando pares de *primers* específicos, sendo descrita inicialmente em 1988. Neste tipo de reação, quanto maior o número de alvos adicionados, maior a limitação dos reagentes utilizados, especialmente enzima e nucleotídeos; maior o tempo necessário para a enzima polimerase completar a síntese, e maiores as dificuldades encontradas como falha ou desuniformidade de amplificação e baixa reprodutibilidade (HENEGARIU et al., 1997). Muitos componentes são importantes para o sucesso da reação de PCR, sendo que os *primers* são provavelmente os mais valiosos. Dessa forma, para uma reação com qualidade e amplificação satisfatória, devem ser analisados de forma criteriosa parâmetros como temperatura de anelamento, tamanho, conteúdo CG, além do estudo de formação de complementaridade entre si (homodímero) ou entre *primers* diferentes (heterodímeros). O tampão, a concentração de enzima e dos nucleotídeos utilizados também são importantes para o sucesso da reação (BIERMAN, 2010; INNIS et al., 1989).

A eletroforese tradicional consiste na separação de bandas de DNA em um gel, utilizando a carga negativa do DNA que migra por atração ao polo positivo originado por uma corrente elétrica aplicada. A eletroforese capilar utiliza o mesmo princípio, porém o gel é substituído por capilares bem finos e um polímero. Os fragmentos separados são detectados por *laser* através da parede do capilar e os dados são processados em forma de eletroferograma, de acordo com a migração da amostra e a fluorescência obtida (GROSSMAN; COLBURN, 1992).

Para genotipagem, o produto da PCR é submetido à eletroforese capilar em um sequenciador automático, separando os fragmentos por tamanho. Dentre as vantagens do sistema *multiplex* automatizado, destaca-se a possibilidade de análise

simultânea de número maior de *loci* STR. Isto é possível, pela utilização de fluoróforos diferentes para marcação dos *primers*, visando a discriminação de alelos para marcadores que apresentam sobreposição de tamanho do produto de PCR - *amplicon* (SCHYMA et al., 1999; EVETT; GILL, 1991). A análise, com a identificação dos alelos para os marcadores de cada indivíduo é então realizada utilizando um *software* específico de genotipagem.

2.5 VALIDAÇÃO DO SISTEMA *MULTIPLEX* DE GENOTIPAGEM

Para ser utilizado como sistema de identificação, uma série de estudos deve ser realizada para avaliação de parâmetros para validação (MICKA et al., 1999). Esses estão relacionados com a sensibilidade do sistema *multiplex*, a presença de artefatos na reação de PCR, o estudo de reprodutibilidade em diferentes amostras e a capacidade de discriminação do sistema *multiplex*, quando submetido a um padrão de misturas de distintas amostras de DNA.

Os testes de sensibilidade estão relacionados com a determinação da quantidade mínima de DNA necessária para a amplificação de todos os *loci* STR que constituem o sistema de tipagem (SILVA et al., 2004).

O aparecimento de artefatos podem estar relacionados a diversos fatores incluindo falhas na reação de PCR e pode dificultar a interpretação correta dos picos verdadeiros. O *stutter*, por exemplo, é um pico de menor tamanho com diferença de uma unidade de repetição, devendo ser distinguido de um alelo real. Os *stutters* podem ocorrer em decorrência da adenilação dos produtos da PCR pela enzima Taq DNA polimerase durante a reação e são artefatos muito comuns na amplificação de dinucleotídeos STR (BROOKES et al., 2012; BUCKLETON et al., 2019).

A reprodutibilidade está relacionada a diferentes fontes de material biológico de DNA, sendo importante que o sistema *multiplex* utilizado amplifique satisfatoriamente os marcadores analisados.

2.6 KITS COMERCIAIS

Baseados nos marcadores recomendados pela ISAG, os kits de verificação de parentesco *StockMarks® (Applied Biosystems)* foram os primeiros painéis a serem lançados. Este kit porém, já é considerado obsoleto e não está mais disponível comercialmente, apresentando histórico de problemas na qualidade das amplificações, fornecendo resultados que despendem muito tempo de análise e interpretação. O kit *Equine Genotypes® Panel 1.1* foi desenvolvido e comercializado pela empresa finlandesa *Finnzymes Diagnostic*, contudo, devido à ocorrência de fusões e aquisições, este produto é comercializado, desde 2014, pela empresa norte-americana *Thermo Fisher Scientific*.

Os kits comerciais apresentam problemas que inviabilizam seu uso como: custo proibitivo quando comparado ao valor de venda do teste no mercado nacional. O kit *Equine Genotypes® Panel 1.1 (ThermoFisher Scientific)* é comercializado, atualmente, a um valor de R\$ 83,27 por reação, em sua apresentação mais econômica, quando o valor de venda do teste praticado no mercado é de R\$ 45,00 por amostra. O mercado de genotipagem de cavalos no Brasil é formado atualmente por 9 laboratórios credenciados, os quais realizam juntos cerca de 50 mil testes ao ano. Cabe lembrar que há outros custos importantes envolvidos no teste como, por exemplo, recurso humano, manutenção e calibração de equipamentos. Outras limitações apresentadas pelos kits comerciais são a indisponibilidade para compra a curto prazo devido ao processo de importação; variação de preço com o dólar e problemas reportados na qualidade de amplificação para alguns marcadores. Além disso, nem sempre os produtos comerciais incluem todos os marcadores genéticos recomendados pela ISAG, como é caso do painel adicional para equinos da série TKY exigida pelo MAPA. Nesse caso não há nenhuma opção comercial disponível até o momento.

Dessa forma, visando contornar a limitação de ofertas no mercado, muitos laboratórios que realizam o serviço de genotipagem de animais optam por elaborar seus próprios painéis de marcadores STR, sintetizando os *primers* dos *loci* recomendados pela ISAG. A desvantagem em elaborar e utilizar o próprio painel de marcadores genéticos na rotina laboratorial é que a maioria não é elaborada para amplificar todos os *loci* necessários em apenas uma reação de PCR, requisitando

maior quantidade de DNA, além de aumentar o custo de cada genotipagem (WICTUM et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

A proposta deste projeto foi desenvolver e validar dois kits no formato *multiplex* para identificação genética por análise de regiões STR em equinos.

3.2 ESPECÍFICOS

Este projeto apresentou como objetivos específicos:

- a) Desenvolvimento de um sistema de genotipagem equina 13-Plex contemplando os marcadores STR do painel principal determinado pelo MAPA.
- b) Desenvolvimento de um sistema de genotipagem equina 13-Plex contemplando os marcadores STR do painel adicional (série TKY) determinado pelo MAPA.
- c) Validação de ambos os sistemas *multiplex* para uso em genotipagem equina por meio de reprodução de resultados conhecidos, obtidos pelo teste comparativo internacional promovido pela ISAG em 2018-2019.
- d) Verificação da qualidade de amplificação do painel principal em amostras de sangue de 50 animais por meio de comparação qualitativa com os resultados obtidos com as mesmas amostras utilizando o kit comercial *Equine Genotypes®* (Thermo Fisher Scientific).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP - Protocolo n° 4972261018). O experimento foi realizado no Setor de Biologia Molecular do Laboratório Centervet (Laboratórios Botega LTDA, Jaguariúna - SP).

Os reagentes químicos e soluções utilizados em cada etapa do experimento foram adquiridos conforme descritos no texto.

4.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As 22 amostras de DNA recebidas para o Teste de Proficiência de equinos promovido pela ISAG em 2018-2019 foram consideradas como controle em relação as amostras extraídas neste estudo, uma vez que tinham resultados reconhecidos oficialmente como consenso entre laboratórios participantes do mundo todo. Essas amostras apresentavam concentração entre 30 e 50 ng/μl e foram extraídas de sangue utilizando o kit *Puregene*® (Qiagen) conforme informado pelo laboratório responsável pela distribuição das amostras de equinos (*Veterinary Genetics Laboratory*, Davis-CA). Desse modo foi possível a verificação da eventual ocorrência de eventuais alelos faltantes (*dropout*) utilizando o kit desenvolvido neste estudo.

Foram utilizadas amostras de sangue periférico coletadas por meio do sistema *vacutainer* contendo EDTA como anticoagulante. Esse procedimento foi realizado como já ocorre rotineiramente pelo Médico Veterinário da propriedade, com consentimento do proprietário para utilização em estudos científicos e encaminhado ao Laboratório Centervet, onde foram recebidas e armazenadas em geladeira (2 a 8°C) para utilização no projeto. O tempo de armazenamento da amostra original foi de até 7 dias para início do processo de extração, detalhado a seguir. Após extração, o DNA foi conservado em freezer (-20°C) até a conclusão das análises. Foram utilizadas amostras de 50 cavalos da raça Quarto de Milha, sendo 29 fêmeas e 21 machos, com idade variada entre 2 a 10 anos.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O método de extração de DNA realizado foi do tipo precipitação com sal (*Salting out*), utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) conforme instruções do fabricante. Basicamente, o processo de extração de DNA foi realizado em duas etapas, sendo a primeira referente ao rompimento das membranas celulares (e conseqüente exteriorização do DNA) e segunda à purificação do DNA em solução, ou seja, eliminação dos outros componentes celulares da solução. Neste caso, utilizando altas concentrações de sal para precipitação e separação de proteínas.

As amostras foram então analisadas e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® (*Thermo Fisher Scientific*). Nesta análise foram observados os resultados de absorbância para 260 e 280 nm e sua razão, uma vez que a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação de qualidade referente à contaminação com proteína (GLASEL, 1995). As amostras foram diluídas em água ultra-pura (Sigma) para concentração final de 10 ng/μl. Os microtubos com DNA extraído foram armazenadas em freezer (-20 °C) até realização da análise.

4.3 DESENHO E MARCAÇÃO DOS *PRIMERS*

A escolha dos *loci* para desenvolvimento dos *primers* em ambos os painéis (principal e adicional) foi baseada na Instrução Normativa Nº 45, 15 de Dezembro de 2017, sendo:

- a) Para o painel principal: AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4 e VHL20 e outros a serem escolhidos entre: ASB17, ASB23, LEX3, HTG6, HTG7, HMS1, HMS2 e CA425. Foram estudados e desenvolvidos *primers* para todos os marcadores, para posterior seleção, contemplando os 9 obrigatórios.

- b) Para o painel adicional, a serem escolhidos entre: TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374 e TKY394. Da mesma forma, foram estudados e desenvolvidos *primers* para todos os 15 marcadores, para seleção de no mínimo 13 para integrar o sistema *multiplex*.

Foi realizado inicialmente um estudo dos *primers* sugeridos pela ISAG, conforme quadro 1, por meio de uma análise de cada um deles *in silico*, utilizando a plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o software Oligo Analyzer® 3.1 integrated platform (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Visando o desenvolvimento do sistema *multiplex* foram modificados oito pares de *primers* (referentes aos marcadores: AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS7, HTG10, HTG7 e LEX3) para o painel principal.

As sequências de *primers* para o painel adicional foram baseadas em Tozaki e colaboradores (2001), conforme quadro 2, sendo redesenhados *primers* para três marcadores (TKY279, TKY294 e TKY297).

Os novos *primers* de sequenciamento foram desenhados utilizando o Primer3Plus (disponível em: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e a plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para avaliar sua homologia com as sequências previamente depositadas e eventuais hibridizações inespecíficas em outras regiões do genoma equino.

Os *primers* desenvolvidos foram analisados em relação às suas características como formação de estruturas secundárias, grampos, dímeros e estabilidade na região terminal 3' utilizando o software Oligo Analyzer® 3.1 integrated platform (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Conforme estudos prévios de condições ótimas de PCR (HENEGARIU et al., 1997; INNIS et al., 1989; MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988; SHANG et al., 2018), procurou-se desenhar os iniciadores com tamanhos entre 18-26 pb, Tm entre 57 °C e 63 °C para ambos os *primers* com diferença entre eles menor que 2°C, conteúdo CG entre 40-60%. O tamanho do *amplicon* foi considerado entre 100-400 pb, baseado na capacidade de amplificação do método, bem como levado em consideração que tamanhos maiores podem aumentar a dificuldade de amplificação.

O intervalo de tamanho inicial era amplo, porém conforme o estabelecimento dos primers era necessário a acomodação nas janelas dos demais marcadores já estabelecidos.

Os *primers* foram separados em grupos de acordo com o tamanho, sendo marcados por fluoróforos diferentes para os *amplicons* de comprimento sobreposto (figura 2). As sequências iniciadoras foram marcadas na região 5' com os fluoróforos Hexametildamina (HEX), Carboxi-64 fluoresceína (FAM), CAL Fluor Red 590 Carboxylic Acid (Cal Fluor Red 590) e Cyanine 3-dUTP (Cy3). Uma vez definidos, os iniciadores foram então sintetizados, com purificação HPLC, pela empresa Exxtend (Paulínia, SP, Brasil).

Quadro 1 – Pannel de marcadores STR recomendados pela ISAG para a identificação genética de equinos.

<i>Locus</i>	Crom	Unidade de Repetição	Referência original	Sequencia de <i>primers</i> sugeridas	Tamanho do amplicon (pb)
AHT4	24	(AC) _n AT(AC) _n	BINNS et al. (1995)	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT	144-164
AHT5	8	(GT) _n	BINNS et al. (1995)	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	126-144
ASB2	15	(GT) _n	BREEN et al. (1997)	F: CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG R: CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	216-250
ASB17	2	(AC) _n	BREEN et al. (1997)	F: ACCATTCAAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC	87-129
ASB23	3	(TG) _n e (TG) _n TT(TG) ₄	IRVIN et al. (1998)	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC	175-211
CA425	28	(GT) _n	EGGLESTON-STOTT et al. (1997)	F: AGCTGCCTCGTTAATTCA R: CTCATGTCCGCTTGCTC	226-246
HMS1	15	(TG) _n	GUERIN et al. (1994)	F: CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG R: TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	170-186
HMS2	10	(CA) _n (TC) ₂	GUERIN et al. (1994)	F: CTTGCAGTCGAATGTGTATTAATG R: ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG	222-248
HMS3	9	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n e (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n GA(CA) ₅	GUERIN et al. (1994)	F: CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT R: CCAACTCTTTGTACATAACAAGA	148-170
HMS6	4	(GT) _n	GUERIN et al. (1994)	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA	151-169
HMS7	1	(AC) ₂ (CA) _n	GUERIN et al. (1994)	F: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT R: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC	165-185
HTG4	9	(TG) _n AT(AG) ₅ AA G(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃	ELLEGREN et al. (1992)	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	127-139
HTG6	15	(TG) _n	ELLEGREN et al. (1992)	F: GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT R: CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT	84-102
HTG7	4	(GT) _n	MARKLUND et al. (1994)	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	118-128
HTG10	21	(TG) _n e TATC(TG) _n	MARKLUND et al. (1994)	F: TTTTTATTCTGATCTGTACATTT R: CAATCCCCGCCACCCCCGGCA	95-115
LEX3	X	(TG) _n	COOGLE et al. (1996)	F: ACATCTAACCAGTGCTGAGACT R: GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC	142-164
VHL20	30	(TG) _n	VAN HAERINGEN et al. (1994)	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCTCAG	87-105

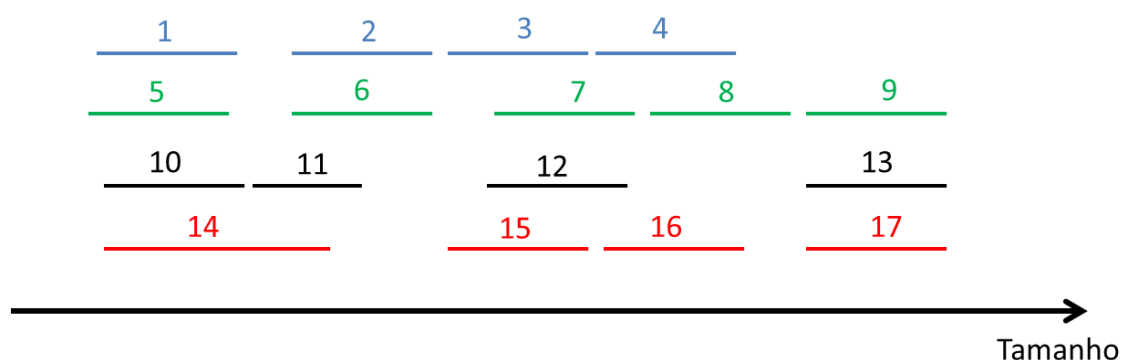
Fonte: Van de Goor et al. (2009)

Quadro 2 – Pannel de marcadores STR do pannel adicional para a identificação genética de equinos.

<i>Locus e Número de acesso</i>	<i>Unidade de Repetição e Tamanho amplicon</i>	<i>Primers Forward e Reverse</i>
TKY279 AB033930	(CA)18 127 pb	AATGAATGAGACTTGAACCC TCTGCTGTTTTAGGCTCGG
TKY287 AB033938	(CA)17...(CA)12 230 pb	ATCAGAGAACACCAAGAAGG TCTCTGCTATAGGTAAGGTC
TKY294 AB034603	(CA)12GA(CA)5 221 pb	GATCTATGTGCTAGCAAACAC CTAGTGTTTCAGATAGCCTC
TKY297 AB034606	(CA)15 228 pb	GTCTTTTTGTGCCTCTGGTG TCAGGGGACAGTGGCAGCAG
TKY301 AB034610	(CA)15 151 pb	AATGGTGGCTAATCAATGGG GTGTATGATGCCCTCATCTC
TKY312 AB034621	(CA)3TA(CA)13 114 pb	AACCTGGGTTTTCTGTTGTTG GATCCTTCTTTTTATGGCTG
TKY321 AB034629	(CA)20 200 pb	TTGTTGGGTTTAGGTATGAAGG GTGTCAATGTGACTTCAAGAAC
TKY325 AB044826	(AC)20TC(AC)4(GC)4 191pb	GGATGGAGTGAGATAATACC TGGATGAACCATGAATAGTG
TKY333 AB044834	(CA)19 107pb	CCTTCACTAGCCTTCAAATG TTGTGTTTAGACAGTGCTGC
TKY337 AB044838	(CA)15 175pb	AGCAGGGTTTAATTACCGAG TAGATGCTAATGCAGCACAG
TKY341 AB044842	(AC)21 156pb	TATCCAGTCACCCATTTTAC TTGTGTCAGTACACTCTATG
TKY343 AB044844	(CA)5CT(CA)19(TA)5(CA)3 171pb	TAGTCCCTATTTCTCCTGAG AAACCCACAGATACTCTAGA
TKY344 AB044845	(CA)20 109pb	GTGTCCATCAATGGATGAAG CTTAAGGCTAAATAATATCCC
TKY374 AB044874	(CA)13 204pb	CTGGTCCCTCTGGATGGAAG TCCAAGAGGGAGTACAATC
TKY394 AB048299	(CA)17 244pb	GCATCATCGCCTTGAAGTTG CCTTTCTGGTTGGTATCCTG

Fonte: Tozaki et al. (2001)

Figura 2 – Representação esquemática da separação por tamanho e cor dos amplicons.



Legenda: A cor azul representa o fluoróforo FAM, a verde o HEX, a preta o CY3 e a vermelha o CAL FLUOR RED 590.

Fonte: Ibiapina (2021).

4.4 REAÇÃO DE PCR

Para definição das condições da PCR, cada *primer* foi dissolvido em água ultrapura (Sigma) para a concentração final de 100 μM de solução estoque e posteriormente diluídos para concentração de uso de acordo com a concentração final ajustada no *multiplex* (apresentada em resultados).

Cada par de *primers* foi testado em formato monoplex para verificação da qualidade mantendo-se 0,5 μM de concentração final em reações de PCR de 10 μl de volume final, utilizando o PCR mix *FIREPol 5x Master Mix*[®] (*Solis BioDyne*) e amostra inicial na concentração de 10 ng/ μl .

Uma vez que os *primers* foram verificados sozinhos, uma reação de PCR *multiplex* foi realizada utilizando todos os *primers* juntos na concentração final de 0,3 μM de cada um em reações de volume final de 10 μL para cada painel.

Foi realizado um PCR gradiente testando diferentes temperaturas entre 53^o e 63^oC para cada um dos painéis (principal e adicional), a fim de se identificar qual apresentaria melhor resultado considerando a maioria dos marcadores. Foram utilizadas 3 amostras escolhidas de forma aleatória para realização dos ajustes da PCR. Cada PCR foi realizada em volume final de 10 μl , utilizando 2 μl de *FIREPol 5x Master Mix*[®] (*Solis BioDyne*), todos os *primers* na concentração final de 0,3 μM cada e água ultrapura q.s.p.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo *Mastercycler Gradient*[®] (Eppendorf) nas seguintes condições: 10 min a 95^oC, 35 ciclos de 30s a 95 ^oC para denaturação, 60s a 53-63^oC (gradiente) para anelamento dos *primers* e 45s a 72 ^oC para extensão, e após os ciclos por 1 hora a 72^oC para extensão final, sendo mantidas a 4^oC até a sua utilização.

As concentrações de *primers* foram ajustadas a partir de diferentes misturas, alterando gradativamente sua concentração e observando seu efeito tanto para o marcador selecionado como para os demais marcadores, de forma empírica, visando:

- a maior intensidade de fluorescência dos produtos na amplificação;
- o equilíbrio dos *primers* na amplificação;
- obtenção de picos balanceados e bem definidos;
- a T_m de cada *loci* STR.

Para a realização dos testes com o kit comercial foi utilizado o *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as instruções do fabricante.

4.5 ELETROFORESE CAPILAR E ANÁLISE DE DADOS

As amostras para eletroforese capilar foram preparadas adicionando-se 1 µl do produto de PCR a um mix de Formamida Hi-DI[®] (*Thermo Fisher Scientific*) e *Gene Scan 500Liz Size Standard*[®] (*Thermo Fisher Scientific*), sendo 25 uL de *500Liz Size Standard*[®] diluídos em 1.000 uL de Formamida Hi-DI. Foi então realizado choque térmico, colocando a placa no termociclador a 95°C por 5 min e imediatamente levando-a ao freezer (-20 °C) por três minutos.

Os produtos obtidos da PCR foram então submetidos à corrida eletroforética em sequenciador de DNA automático modelo ABI 3130XL[®] (*Applied Biosystems*) e seus resultados analisados pelo programa *GeneMapper v.5.0*[®] (*Applied Biosystems*).

4.6 VALIDAÇÃO

Foram realizados os testes com as amostras com resultado conhecido provenientes do Teste Comparativo promovido pela ISAG 2018-2019.

Da mesma forma, foram realizadas as análises das amostras de DNA extraídas neste estudo utilizando o kit *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*) e o sistema multiplex desenvolvido neste estudo para o painel principal.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* DOS *PRIMERS* RECOMENDADOS

Durante análise *in silico* dos *primers* recomendados pela ISAG foi observado que o marcador AHT4 apresentava elevada diferença de temperatura de *melting* entre o par de oligos, sendo o *primer forward* com T_m de 59,4 °C e o *reverse* com T_m de 50,1 °C. Foi observado também, durante verificação com o genoma equino (NC_009159.3) na plataforma BLAST, o não pareamento de uma base, conhecido como *mismatch*, para o *primer* TKY279 *reverse* (figura 3). Ambos os marcadores tiveram seus *primers* redesenhados ainda nesta fase. As sequências e características dos *primers* redesenhados estão sumarizados nas tabelas 1 e 2.

Figura 3 - Comparação da sequência do *primer* recomendado com a base de dados pública de nucleotídeos (NCBI Blast) para a espécie equina (NC_009159.3).

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AATGAATGAGACTTGAACCC	20	53.16	40.00	3.00
Reverse primer	TCTGCTGTTTTAGGCTCGG	19	57.47	52.63	3.00

Products on target templates
 >NC_009159.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 16, EquCab3.0

```

product length = 133
Forward primer 1      AATGAATGAGACTTGAACCC  20
Template      8094899  ..... 8094918

Reverse primer 1      TCTGCTGTTTTAGGCTCGG  19
Template      8095031  .....T. 8095013
  
```

Legenda: Evidenciado na figura discordância (*mismatch*) de um nucleotídeo para o *primer* TKY279 *reverse*.

Fonte: Ibiapina (2021).

5.2 MARCAÇÃO DOS *PRIMERS* COM FLUORÓFORO

No intuito de evitar sobreposição entre *loci* vizinhos no eixo espectral do painel, o agrupamento dos *primers* foi estabelecido considerando as características específicas referentes à cada *locus* selecionado, como tamanho dos *amplicons* produzidos e intervalo de variação alélica (tabelas 3 e 4).

Tabela 1 – Sequência dos novos *primers* com respectivas temperaturas de *melting*, conteúdo CG e motivo pelo qual os *primers* originais foram redesenhados - painel principal.

Locus	Sequência <i>Primer</i>		Tm (°C)	CG (%)	<i>Primers</i> Originais
	Desenhado				
AHT4-FOR	AACCGCCTGAGCAAGGAAGTCC		61,9	59	DTM>9
AHT4-REV	GCTCCCAGAGAGTTTACCCTGG		59,2	59	
AHT5-FOR	CAACCAGCCACGGACACATC		58,8	60	RI.MULTI
AHT5-REV	*GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC		60,6	65	
ABS2-FOR	CCCCTAAGTGTCTGTTTCAGAAGG		57,4	50	RI.MULTI
ASB2-REV	AACACAACCTGAGTTCTCTGATAGG		54,3	41	
HMS3-FOR	**ACATCAGTCAGAAGCTGCGAAC		57,5	50	RI.MULTI
HMS3-REV	TCCCTCTTGCTCTAAAGCCCCA		60,2	54	
HMS7-FOR	TGTTGTTGAAACATACCTTGAC		55	36	RI.MULTI
HMS7-REV	AGGAAACTCATGTTGATACCATCC		54,7	41	
HTG7-FOR	GAAGCAGAACATCCCTCCTTGTCG		59,6	54	RI.MULTI
HTG7-REV	GTGTCTGGGCAGAGCTGCTACACG		63,6	62	
HTG10-FOR	TGGGCTTTTTATTCTGATCTGTC		53	39	AA.MONO
HTG10-REV1	CCTAATGTCATATGGAAAGCCTTG		53,8	41	
HTG10-REV2	CCTCTGTCTATTTCTCATTCTGG		53	41	RI.MULTI
LEX3-FOR	AGGGTACATCTAACCAGTGC		54	50	RI.MULTI
LEX3-REV	GAAGGAAAAAAGGAGGAAGACTGG		55,9	44	

Legenda: DTM>9: Diferença de Temperatura de *Melting* entre *primers* maior que 9°C. RI.MULTI: Resultados insatisfatórios no formato *multiplex*. AA.MONO: Ausência de amplificação no formato *monoplex*. *AHT5-REV: mantendo sem alterações. **HMS3-FOR: foi baseado na nova sugestão da ISAG após os Testes Comparativos de 2018-2019.

Fonte: Ibiapina (2021)

Tabela 2 – Sequência dos novos *primers* com respectivas temperaturas de *melting*, conteúdo CG e motivo pelo qual os *primers* originais foram redesenhados – painel adicional.

<i>Locus</i>	Sequência <i>Primer</i> Desenhado	T _m (°C)	CG (%)	<i>Primers</i> Originais
TKY279-REV	TCTGCTGTTTTAGGCTCTG	52,2	47	MISM
TKY279-FOR	ATAAATGTAGGTCCCCTTCC	51,2	45	AA.MONO
TKY279-REV2	AATCGCCTCTGCTGTTTTAG	53	45	
TKY294-FOR	TATTGTA CTATTCTGCTCTCA	53,2	39	RI.MULTI
TKY294-REV	TACAGGCAAGCAATGGAAAG	53,3	45	
TKY297-FOR	*GTCTTTTGTGCCTCTGGTG	54,2	50	RI.MULTI / DTM>7
TKY297-REV	GATCAGGGGACAGTGGCAG	57,9	63	

Legenda: AA.MONO: Ausência de amplificação no formato monoplex. MISM: verificado *mismatch* na plataforma BLAST. RI.MULTI: Resultados insatisfatórios no formato *multiplex*. DTM>7: Diferença de Temperatura de *Melting* entre *primers* maior que 7°C. *TKY297-FOR: mantido sem alterações.

Fonte: Ibiapina (2021)

Tabela 3 – Agrupamento dos marcadores por tamanho do *amplicon* e tipo de fluoróforo usado na marcação – Painel Principal.

Marcador	Tamanho <i>Amplicon</i> (pb)	Fluoróforo
VHL20	87-105	FAM
HTG4	127-139	FAM
AHT4	144-164	FAM
HMS7	165-185	FAM
HTG6	84-102	HEX
AHT5	126-144	HEX
HMS6	151-169	HEX
ASB23	175-211	HEX
ASB2	216-250	HEX
ASB17	87-129	Cal Fluor Red 590
LEX3	142-164	Cal Fluor Red 590
HMS1	170-186	Cal Fluor Red 590
CA425	226-246	Cal Fluor Red 590
HTG10	95-115	Cy3
HTG7	118-128	Cy3
HMS3	148-170	Cy3
HMS2	222-248	Cy3

Fonte: Adaptado de Van de Goor (2009)

Tabela 4 – Agrupamento dos marcadores por tamanho do *amplicon* e tipo de fluoróforo usado na marcação – Painel Adicional.

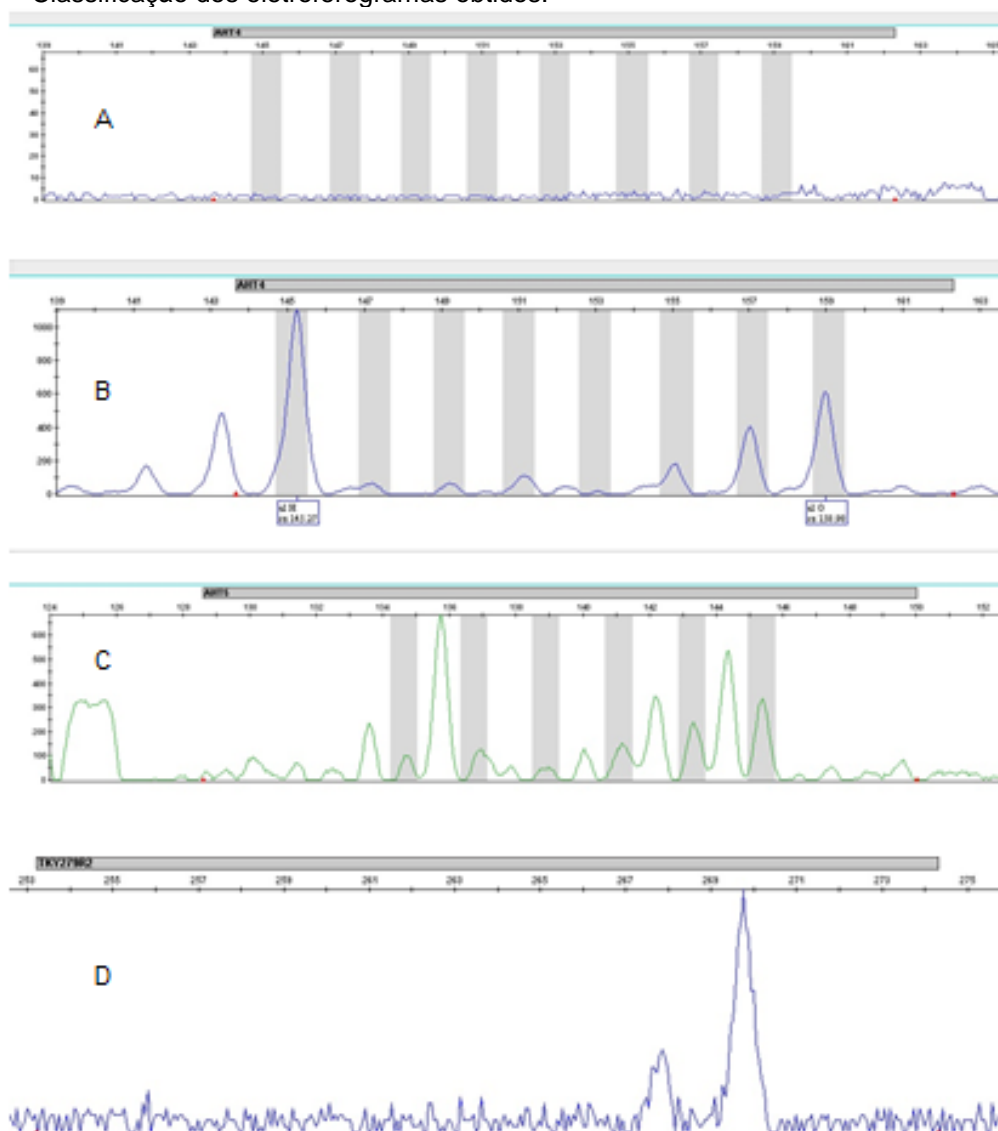
Marcador	Tamanho Médio <i>Amplicon</i> (pb)	Fluoróforo
TKY312	114	FAM
TKY301	151	FAM
TKY337	175	FAM
TKY374	204	FAM
TKY297	228	FAM
TKY333	107	HEX
TKY341	156	HEX
TKY325	191	HEX
TKY294	221	HEX
TKY394	244	HEX
TKY344	109	Cal Fluor Red 590
TKY279	127	Cal Fluor Red 590
TKY343	171	Cal Fluor Red 590
TKY321	200	Cal Fluor Red 590
TKY287	230	Cal Fluor Red 590

Fonte: Adaptado de Tozaki et al. (2001)

5.3 ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS *PRIMERS* EM FORMATO MONOPLEX

Os eletroferogramas foram classificados em ausentes, insatisfatórios e satisfatórios (figura 4). As amplificações por PCR foram realizadas em sistema monoplex, a fim de avaliar a funcionalidade dos *primers*. Os *primers* para o marcador HTG10 não tiveram amplificação mesmo após testes com diferentes temperaturas (PCR gradiente 53 a 63°C) e concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 µM). Os *primers* para o marcador TK279 (figura 5) também não apresentaram amplificação mesmo após correção do *mismatch* do *primer reverse* na etapa anterior. Os dois marcadores tiveram seus *primers* redesenhados (tabelas 1 e 2).

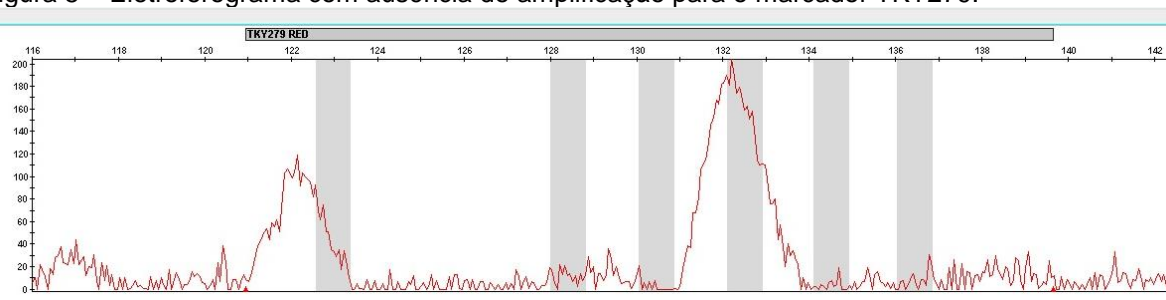
Figura 4 – Classificação dos eletroferogramas obtidos.



Legenda: A: eletroferograma ausente: não detectado sinal de fluorescência. B: Eletroferograma satisfatório: picos bem definidos, estrutura típica dos alelos. C e D: eletroferogramas insatisfatórios: picos indefinidos, presença de ruídos e detecção de fluorescência inespecífica.

Fonte: Ibiapina (2021).

Figura 5 – Eletroferograma com ausência de amplificação para o marcador TKY279.



Fonte: Ibiapina (2021).

5.4 ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS *PRIMERS* EM FORMATO *MULTIPLEX*

Para cada painel foi realizado um ensaio *multiplex*, com a concentração de 0,3 μ M para cada *primer* utilizado. Não houve amplificação satisfatória para os marcadores AHT5, ABS2, HMS3, HMS7, HTG7 e LEX3 do painel principal e para os marcadores TKY294 e TKY297 do painel adicional, mesmo após testes com tentativas de ajustes de concentração dos *primers*. Esses oito marcadores tiveram seus *primers* redesenhados (tabelas 1 e 2).

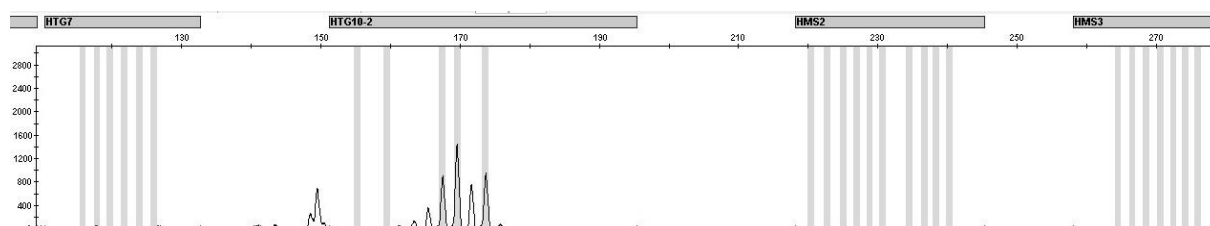
No teste de PCR gradiente encontrou-se a melhor temperatura de anelamento para cada conjunto *multiplex*, sendo 61,0°C para o painel principal e 55,0°C para o painel adicional. As demais condições da reação de PCR foram mantidas.

5.5 DESEMPENHO DOS *PRIMERS* REDESENHADOS

Os *primers* com amplificação insatisfatória foram redesenhados visando acomodação na composição do painel, em função do intervalo de tamanho esperado dos *amplicons*. Os marcadores HTG10, HMS3 e TKY279 foram realocados de posição no painel. O TKY279 teve sua marcação alterada para o fluoróforo FAM e o TKY294 para o fluoróforo Cy3. A nova composição dos painéis está demonstrada nas tabelas 5 e 6. O marcador HTG10 obteve resultados satisfatórios em formato *monoplex* utilizando os novos *primers forward* e *reverse* (figura 6), porém não foi possível obter resultados satisfatórios em formato *multiplex* (figura 7). Foi desenhado um novo *primer reverse*, porém também com resultado satisfatório apenas em

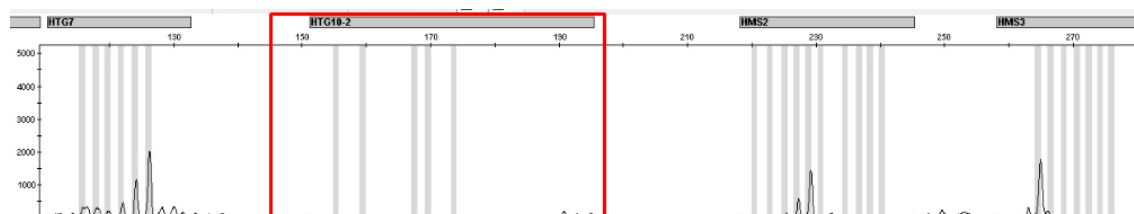
formato monoplex (figura 8). Não foi possível obter uma maior temperatura de *melting* para o primer HTG10 devido a janela de tamanho disponível entre os marcadores, porém no formato monoplex ele obteve resultado satisfatório utilizando a temperatura de anelamento de 61°C.

Figura 6 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o marcador HTG10 em formato monoplex utilizando o *primer reverse 1*.



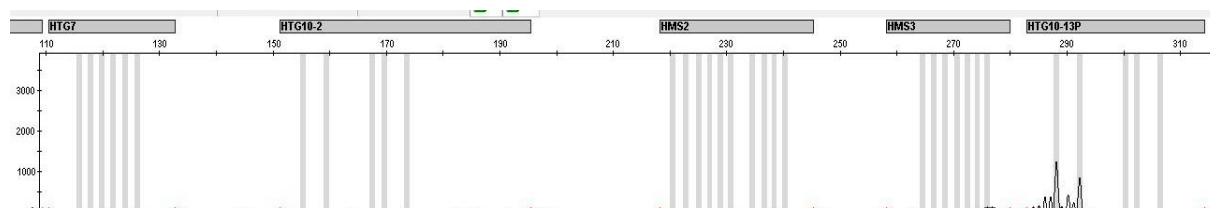
Fonte: Ibiapina (2021)

Figura 7 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema *mutiplex*, sem amplificação para o marcador HTG10.



Fonte: Ibiapina (2021)

Figura 8 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o marcador HTG10 em formato monoplex utilizando o *primer reverse 2*.



Fonte: Ibiapina (2021)

5.6 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS *PRIMERS* NO SISTEMA *MULTIPLEX* – PAINEL PRINCIPAL

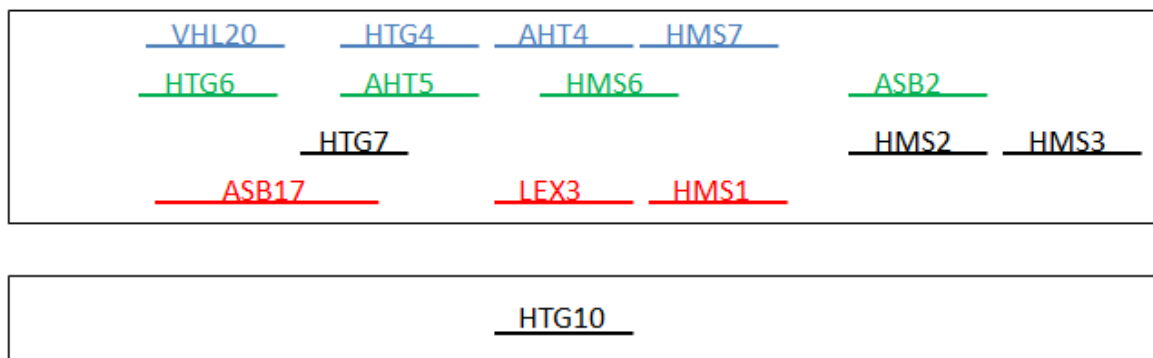
Após os testes e ajustes com diferentes versões do sistema *multiplex*, preparadas com variadas concentrações dos pares de *primers*, a versão com amplificação mais equilibrada dos *loci* STR foi desenvolvida e apresentada na tabela 5. Foram selecionados 14 marcadores, porém não foi possível a inclusão do marcador obrigatório HTG10 com os testes realizados. A versão final dos marcadores distribuídos é representada na figura 9 e o eletroferograma correspondente é demonstrado na figura 10.

Tabela 5 – Agrupamento dos marcadores por tamanho, marcação com fluoróforo e concentração de cada *primer* após inclusão dos novos *primers* desenhados – Painel Principal.

Marcador	Tamanho <i>Amplicon</i> (pb)	Fluoróforo	Concentração <i>Primer</i> (μ M)
VHL20	87-105	FAM	0,3
HTG4	127-139	FAM	0,3
AHT4	147-167*	FAM	0,1
HMS7	168-188*	FAM	1,5
HTG6	84-102	HEX	0,1
AHT5	129-147*	HEX	0,6
HMS6	151-169	HEX	0,3
ASB2	219-253*	HEX	0,6
ASB17	87-129	Cal Fluor Red 590	0,3
LEX3	147-169*	Cal Fluor Red 590	0,6
HMS1	170-186	Cal Fluor Red 590	0,3
HTG7	110-120*	Cy3	0,03
HMS2	222-248	Cy3	0,1
HMS3	261-283*	Cy3	0,1
HTG10	147-167*	Cy3	RP
ASB23	175-211	RP	-
CA425	226-246	RP	-

Legenda: (*): Evidenciadas na tabela as modificações. RP: retirado do painel.
Fonte: Ibiapina (2021)

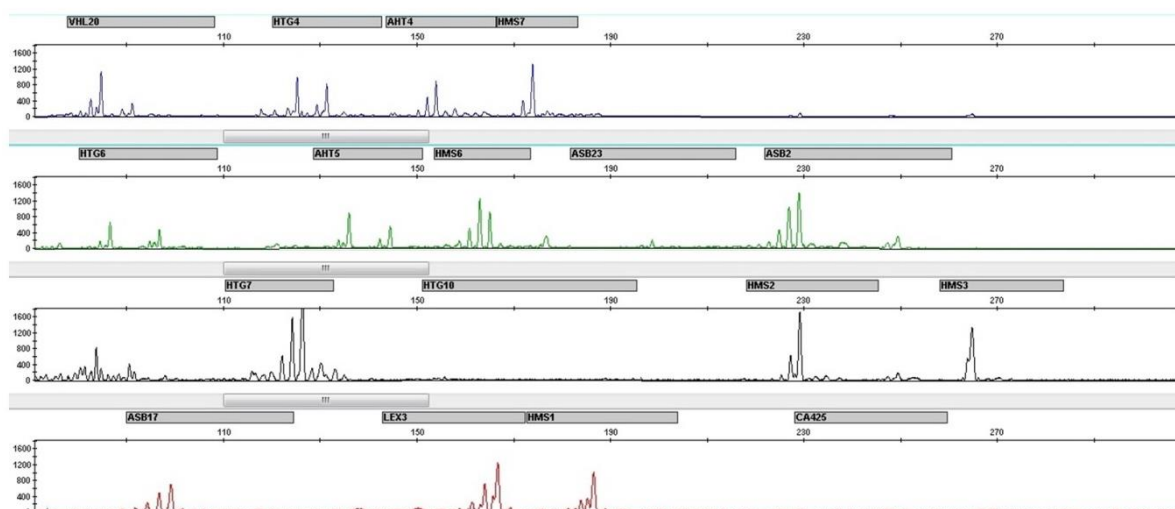
Figura 9 – Distribuição dos marcadores conforme tamanho e marcação com fluoróforo na versão final do painel principal.



Legenda: O marcador HTG10 é realizado em uma reação de PCR separada. Os marcadores CA425 e ASB23 não estão contemplados no painel.

Fonte: Ibiapina (2021).

Figura 10 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema *multiplex* para o painel principal



Legenda: Os marcadores HTG10, CA425 e ASB23 não estão contemplados no painel.

Fonte: Ibiapina (2021).

5.7 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS *PRIMERS* NO SISTEMA *MULTIPLEX* – PAINEL ADICIONAL

Para o painel adicional foram desenvolvidos dois sistemas *multiplex*, contemplando 13 marcadores no total. Não foi possível neste trabalho o desenvolvimento de um único sistema *multiplex* para este painel. A composição e características de cada sistema estão demonstradas na tabela 6 e figura 11. Os eletroferogramas correspondentes nas figuras 12 e 13.

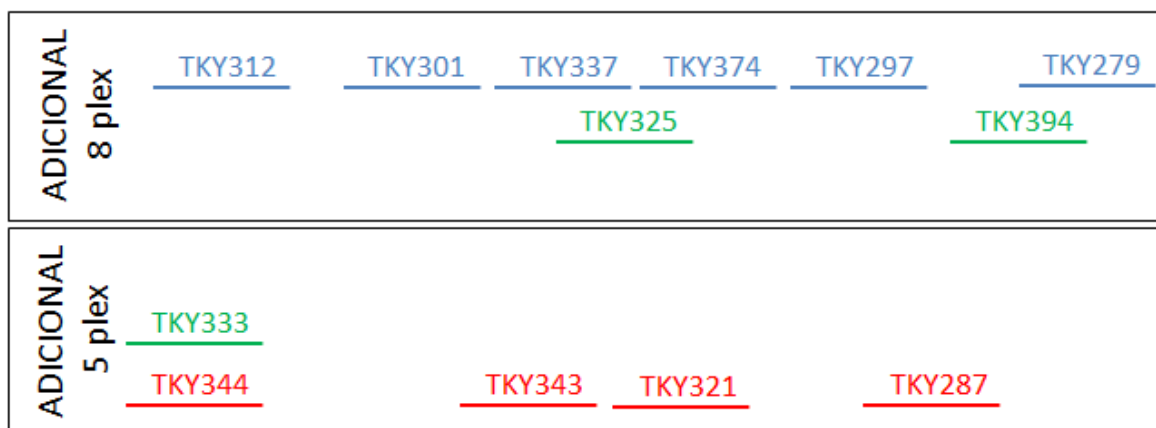
Tabela 6 – Agrupamento dos marcadores por tamanho, marcação com fluoróforo e concentração de cada *primer* após inclusão dos novos *primers* desenhados – Painel Adicional 1 e 2.

Marcador	Tamanho Médio <i>Amplicon</i> (pb)	Fluoróforo	Concentração <i>Primer</i> (μ M)	Painel Adicional
TKY297	230*	FAM	0,1	1
TKY312	114	FAM	0,3	1
TKY301	151	FAM	0,3	1
TKY337	175	FAM	0,9	1
TKY374	204	FAM	0,6	1
TKY279	271*	FAM*	0,6	1
TKY325	191	HEX	0,3	1
TKY394	244	HEX	0,3	1
TKY344	109	Cal Fluor Red 590	0,4	2
TKY343	171	Cal Fluor Red 590	0,4	2
TKY321	200	Cal Fluor Red 590	0,3	2
TKY287	230	Cal Fluor Red 590	0,6	2
TKY333	107	HEX	0,6	2
TKY294	262*	Cy3*	RP	-
TKY341	156	HEX	RP	-

Legenda: (*): Evidenciadas na tabela as modificações. RP: retirado do painel.

Fonte: Ibiapina (2021)

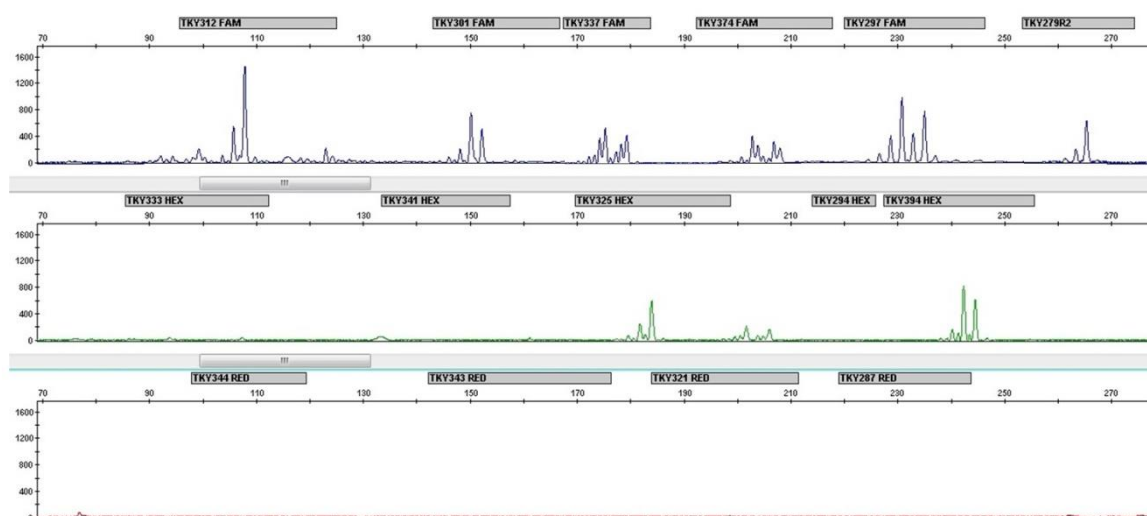
Figura 11 – Distribuição dos marcadores conforme tamanho e marcação com fluoróforo na versão final do painel adicional.



Legenda: Marcadores distribuídos em 2 reações de PCR.

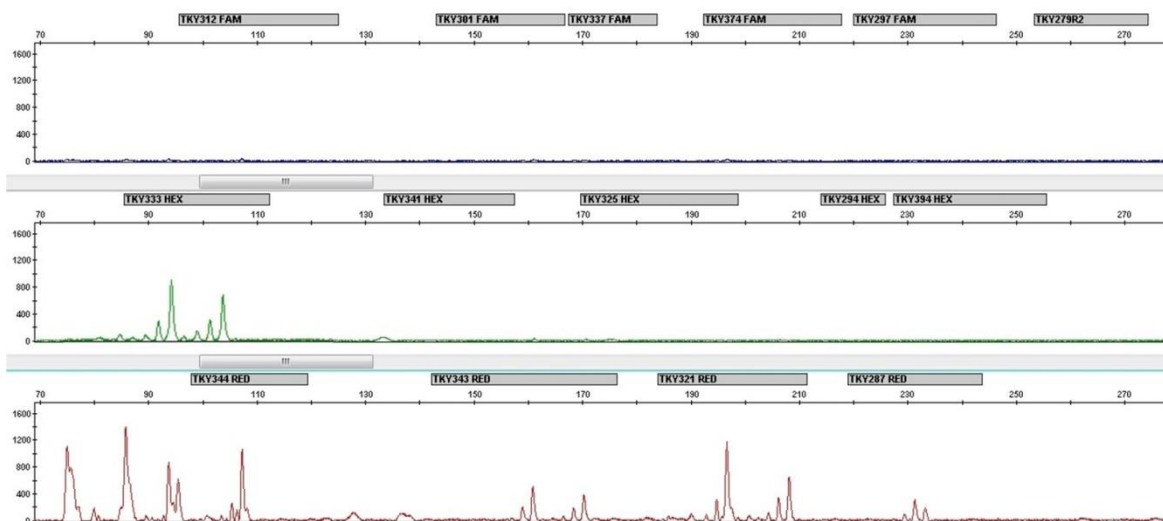
Fonte: Ibiapina (2021).

Figura 12 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema *multiplex* para o painel adicional 1.



Fonte: Ibiapina (2021).

Figura 13 – Eletroferograma gerado pela amplificação de 10ng de DNA com o sistema *multiplex* para o painel adicional 2.



Fonte: Ibiapina (2021).

5.8 VALIDAÇÃO

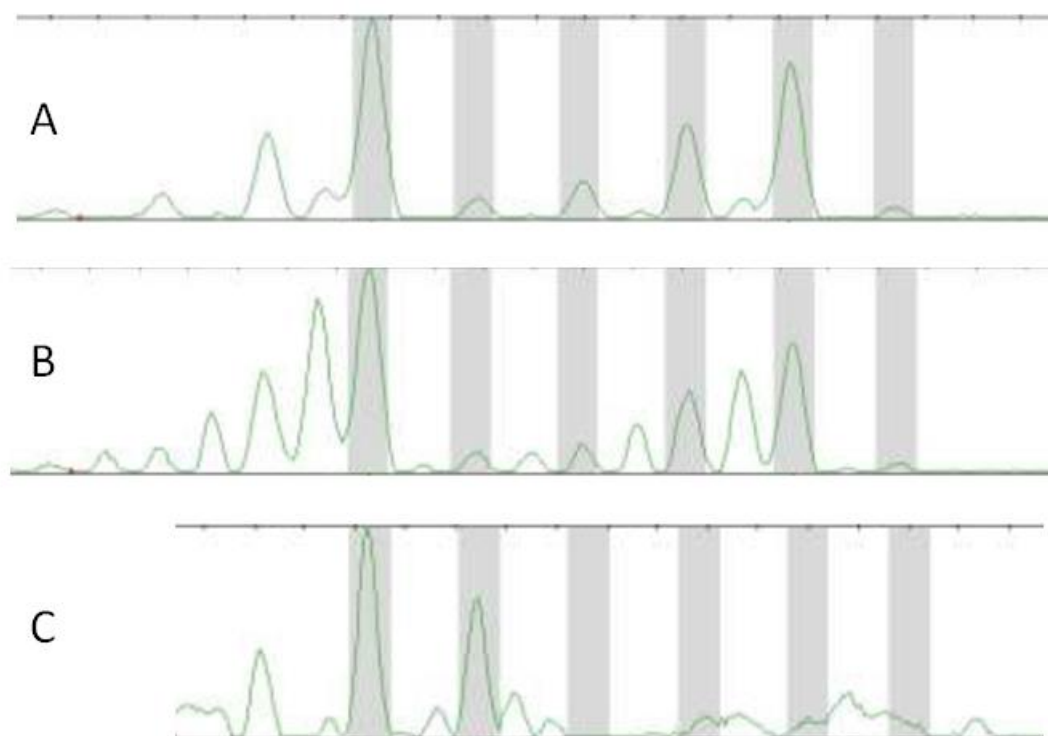
Os resultados obtidos utilizando as amostras provenientes do Teste Comparativo promovido pela ISAG 2018-2019 foram satisfatórios, detectando todos os alelos reportados no resultado com 100% de concordância do teste.

No estudo comparativo do painel principal com o kit *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*) obteve-se também concordância de resultados. O eletroferograma obtido com o kit comercial é demonstrado na figura 15.

Nos testes realizados com o kit desenvolvido houve amplificação para todos os marcadores analisados. Foram gerados 1.080 resultados para o painel principal, considerando os 15 marcadores da versão final, obtidos tanto das 22 amostras provenientes do teste comparativo da ISAG como das 50 amostras extraídas neste estudo. Para o painel adicional, foram gerados 286 resultados para os 13 marcadores testados, obtidos das 22 amostras provenientes do teste comparativo da ISAG. Em uma análise subjetiva de qualidade, foi possível classificar os picos em excelentes, regulares e ruins (figura 14). Nesta classificação, obteve-se 1.148 considerados excelentes (84,0%), 146 regulares (10,7%) e 72 ruins (5,3%). Cabe ressaltar, que apesar da maior dificuldade de interpretação para os picos considerados ruins, foram gerados resultados concordantes tanto em comparação com resultado da ISAG como em comparação com o resultado obtido com o kit comercial.

Devido à confidencialidade, os resultados obtidos em comparação com os teste da ISAG não podem ser reproduzidos, mas a variedade alélica encontrada com as 72 amostras utilizadas neste trabalho estão demonstradas no apêndice 1.

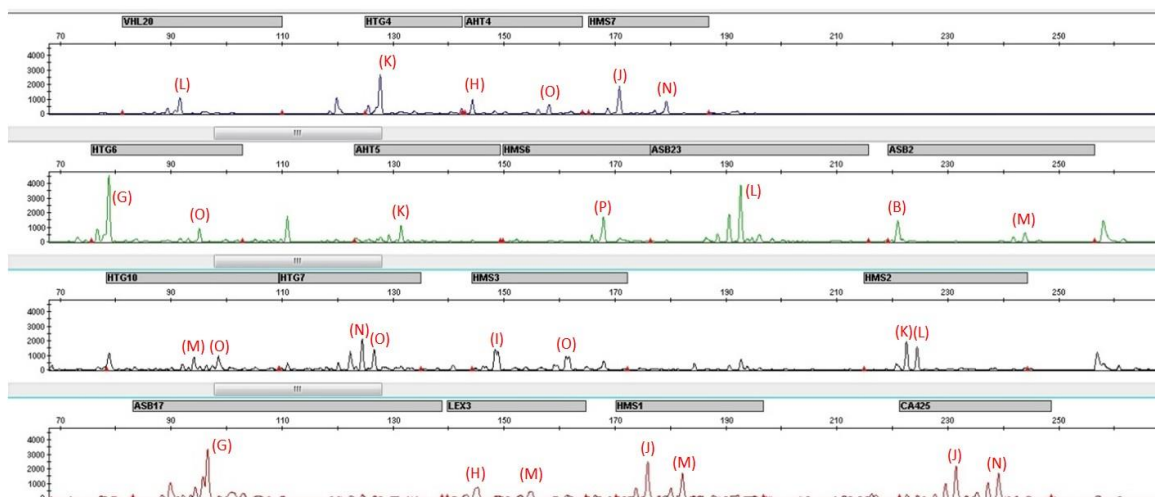
Figura 14 – Classificação dos picos obtidos com o kit desenvolvido neste estudo.



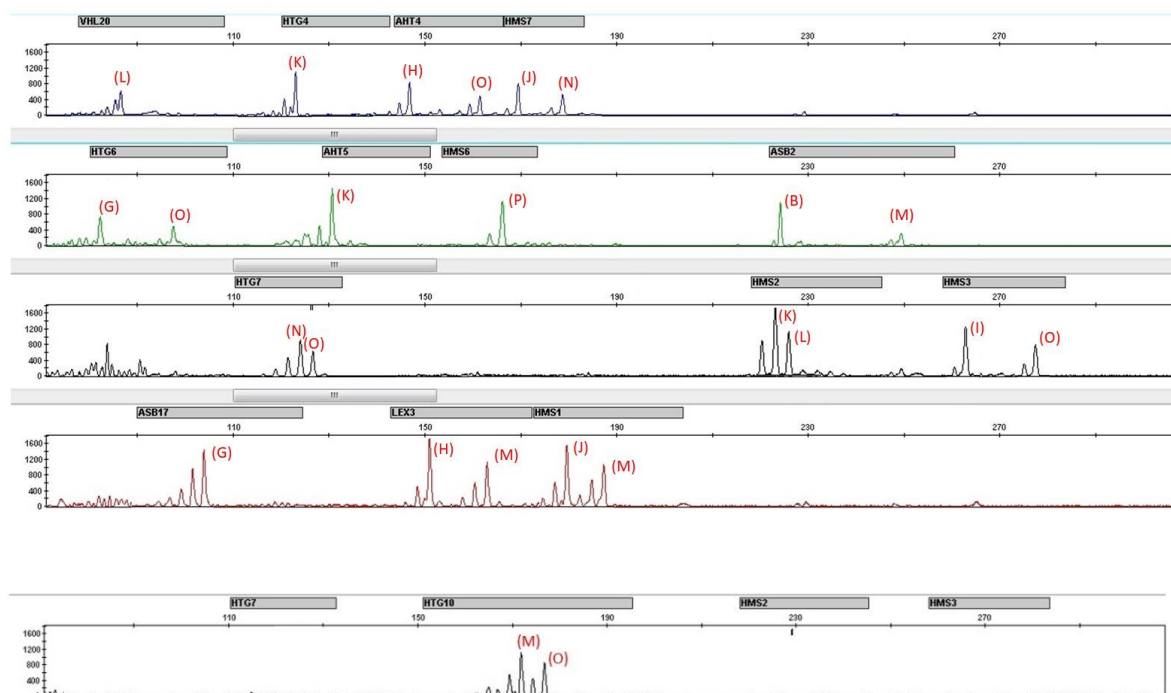
Legenda: A: excelente: Picos bem definidos, de fácil interpretação. B: regular: picos verdadeiros com *stutters* com diferença de 1pb. C: ruins: picos de baixa intensidade, com formato menos definido. Ainda é possível a correta identificação dos alelos, porém a interpretação é mais trabalhosa, exigindo maior atenção e cuidado.
Fonte: Ibiapina (2021).

Figura 15 – Eletroferogramas gerados pela amplificação de 10ng de DNA com o kit *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*) e pelo sistema multiplex desenvolvido neste estudo.

A)



B)



Legenda: A) kit *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*). B) Sistema Multiplex desenvolvido para painel principal + HTG10. Os dois sistemas apresentam resultados concordantes para os marcadores testados da mesma amostra. Os alelos estão representados pelas letras conforme nomenclatura da ISAG.

Fonte: Ibiapina (2021).

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo produzir um sistema *multiplex* que promovesse a amplificação simultânea de múltiplos *loci* STR da espécie equina. Esse sistema seria aplicado para o painel principal e para o painel adicional, sendo selecionados 13 marcadores para cada um. Apesar da obrigatoriedade de apenas 12 marcadores em cada painel (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 45, de 15 de Dezembro de 2017), este estudo procurou utilizar o mínimo de 13 marcadores, visando aumentar o poder de exclusão em testes de verificação de parentesco e manter um marcador adicional em caso de falhas em algum outro (devido, por exemplo, à alguma mutação no indivíduo analisado).

Erros de genotipagem podem estar relacionados a falhas no ensaio ou no manuseio das amostras, porém a principal causa desses erros se deve a própria natureza do DNA (BONIN et al., 2004). Os microssatélites selecionados para espécie equina consistem em repetições de dinucleotídeos que geram picos *stutters* durante a amplificação dos fragmentos de DNA na PCR. Esses picos *stutters* dificultam os processos de interpretação e de identificação correta do alelo verdadeiro (TOZAKI et al., 2001). Dessa maneira, a qualidade da amplificação é muito importante para correta análise e confiabilidade dos resultados. Este estudo considerou como “amplificação insatisfatória” os *primers* para marcadores que pudessem gerar dúvidas durante a interpretação seja pela baixa definição dos picos, seja pelo aparecimento de produtos inespecíficos. Para estes oligonucleotídeos, foram realizadas tentativas de ajuste nas concentrações dos *primers* utilizados, na concentração de DNA inicial, nas temperaturas de anelamento e no tempo de extensão. Após os ajustes, caso o resultado permanecesse insatisfatório o *primer* era redesenhado.

Os *primers* recomendados pela ISAG para amplificação de regiões STR de equinos não foram desenvolvidos originalmente para funcionarem em uma única reação, ao contrário, foram associados a partir de estudos diversos e apresentam deficiências como ineficientes temperaturas de anelamento, conteúdo CG e sequências que não os tornam ideais para os propósitos de genotipagem (BIERMAN, 2010; MARKLUND et al., 1994; TOZAKI et al., 2005). Neste estudo, durante análise *in silico*, foram observadas essas deficiências como, por exemplo, diferenças de temperatura maiores que 9 °C entre *primers* do mesmo par e inclusive

ausência de amplificação em formato monoplex para os marcadores HTG10 e TKY279.

Em contrapartida, estes *primers* continuam sendo recomendados inclusive para participação nos testes de proficiência promovidos pela ISAG. Além disso, mutações nas regiões flanqueadoras dos microssatélites podem causar falha da ligação com os *primers* gerando alelos nulos, os quais podem levar a erros de genotipagens por falsa homozigose (DANG et al., 2019; MACAVOY et al., 2008; NARKUTI; ORAGANTI, 2009). A modificação de uma única base próxima à extremidade 5' da sequência flanqueadora dos microssatélites pode desestabilizar o pareamento, afetando a eficiência da ligação do *primer* com o DNA molde (CLAYTON et al., 1995). Grimaldi e Crouau-Roy (1997) descobriram, após o sequenciamento de uma região de microssatélite de repetição "CA", que as diferenças entre alelos são mais complexas do que se pensava e que muito da variabilidade nos microssatélites se deve às variações nas regiões flanqueadoras e não somente à variação no número de repetições. Dessa forma, os laboratórios que desenvolvem seus próprios *primers* para marcadores recomendados assumem esse risco caso não realizem um estudo populacional adequado (BIERMAN, 2010). Por estas razões, este trabalho se manteve embasado nos *primers* recomendados, procurando fazer os menores ajustes possíveis para composição do painel *multiplex*.

Para o desenho dos novos *primers*, uma das limitações foi a acomodação na composição do painel, em função do intervalo de tamanho esperado dos *amplicons*. Dependendo do novo tamanho havia interferência nos intervalos de segurança entre os marcadores STR do painel ou sobreposição com os alelos de outro *locus*. Para o painel principal, essa limitação era ainda maior e conforme as características da região de interesse não foi possível o desenho dos *primers* nas condições ideais previstas, porém foram consideradas as melhores possíveis. Assim, houve maior variação de temperatura entre *primers* de diferentes marcadores, por exemplo HMS7 e LEX3 com temperaturas abaixo de 57°C; bem como diferença entre temperaturas entre *primers* do mesmo par maiores que 2°C, sendo a maior para o marcador HTG7 que foi de 4 °C. O painel adicional, por sua vez, apresentou maior flexibilidade, uma vez que ainda havia um canal de fluorescência disponível. Dessa forma, os marcadores TKY279 e TKY294 apresentaram a maior variação em relação ao tamanho do *amplicon* original.

Para as reações do tipo *multiplex*, as condições de amplificação devem ser ajustadas de forma que possibilitem a geração de produtos de forma simultânea e equilibrada a partir de cada uma das regiões STR que constituem os marcadores do sistema *multiplex* (BUTLER, 2001). Em relação ao marcador obrigatório HTG10, inicialmente foi testado o par de *primers* original, porém como não obteve amplificação mesmo em formato monoplex foram desenhados outros três *primers*, sendo um *forward* e dois *reverse*. Os novos *primers* apresentaram amplificação de boa qualidade quando utilizados sozinhos, mas não funcionaram quando introduzidos no sistema *multiplex*. Bierman (2010) reporta variação na sequência dessa região e outros estudos (ABERLE et al., 2004; ACHMANN et al., 2004) relatam problemas de amplificação para este marcador. No painel principal foram retirados do sistema dois marcadores opcionais (ASB23 e CA425) por causa da inconsistência de qualidade de amplificação e da interação com diversos outros *primers*, diminuindo a qualidade dos demais marcadores do painel. Certamente, uma das etapas mais importantes e desafiadoras desse processo foi a definição de um sistema *multiplex* que proporcionasse amplificação equilibrada de todos os *loci* STR.

A checagem da qualidade dos *primers* utilizados é considerada o primeiro passo para o desenvolvimento de um sistema *multiplex* (SCHOSKE et al., 2003). Esses autores sugerem a verificação por metodologias refinadas como espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) anteriormente ao início dos ensaios *in vitro*. Essa etapa não foi possível no presente estudo devido a limitações financeiras, porém os fornecedores dos oligonucleotídeos adquiridos disponibilizaram todos os certificados de análise correspondentes. Vale ressaltar que os *primers* marcados foram sintetizados utilizando o método de purificação HPLC, considerado o de maior grau de pureza. O alto custo financeiro e o extenso prazo de entrega dos *primers* marcados com fluoróforos foram fatores importantes na seleção da empresa responsável pelo fornecimento dos *primers*.

Uma possível causa da dificuldade da amplificação simultânea de todos os marcadores pode estar relacionada à enzima utilizada, uma vez que estas podem apresentar diferentes desempenhos na reação de PCR. A enzima utilizada no PCR mix deste estudo possui atividade corretiva (*proofreading*) e remove a adenina extra comumente adicionada às extremidades 3' do DNA pelas enzimas convencionais, o que poderia causar picos com formatos irregulares (BROWNSTEIN et al., 1996). O tempo da extensão determinado foi de 60 min, mais longo que o usualmente

praticado, para possibilitar a adenilação adequada dos nucleotídeos e evitar formatos irregulares de pico. Em um estudo anterior, os resultados insatisfatórios de amplificação para o marcador HTG10 foram corrigidos ao substituir a enzima utilizada (DIMSOSKI, 2003). Estas enzimas mais especializadas não foram utilizadas no presente estudo devido ao elevado custo. Dessa forma, novos estudos poderiam verificar o desempenho de outras enzimas de alta especificidade e sensibilidade como a *Phusion® Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)* especialmente para os marcadores mais difíceis como o HTG10.

A concentração de reagentes na reação da PCR como a do complexo magnésio-dNTP podem promover a diminuição da quantidade dos produtos ou aparecimento de novos amplicons (LEVEDAKOU et al., 2001). Neste estudo foi utilizado o PCR mix *FIREPol 5x Master Mix® (Solis BioDyne)* com concentração de 2,5 mM de cloreto de magnésio e 200 µM de cada base dNTP. Este PCR mix foi selecionado devido ao melhor desempenho em comparação com outros em testes anteriores não publicados realizados no laboratório Centervet. Alguns aditivos podem aumentar a especificidade e o rendimento da PCR. A utilização desses aditivos como BSA (ZHAO et al., 2020) e DMSO (JIA et al., 2021) seria outra possibilidade a ser testada para inclusão dos marcadores em uma única reação de PCR.

O custo da reação de amplificação do sistema *multiplex* para o painel principal desenvolvido neste estudo foi de R\$ 7,17, considerando 2 reações, o PCR mix *FIREPol 5x Master Mix® (Solis BioDyne)* e a síntese e marcação dos *primers* pela empresa Exxtend. Esse valor representa uma redução de mais de 90% do custo por reação do kit *Equine Genotypes® Panel 1.1 (ThermoFisher Scientific)* e pode ser uma alternativa para laboratórios de diagnóstico molecular.

Ainda visando a disseminação do teste, na rotina de genotipagem animal, diferentes tipos de amostras biológicas podem ser utilizados como fonte de DNA genômico como sangue, pelos com bulbo ou sêmen. Neste projeto foi utilizado o mesmo tipo de amostra – sangue total com EDTA. Alguns estudos relatam, porém, que diferentes tipos de amostras podem produzir diferentes qualidades de resultados (ELLEGREN et al., 1992; ZABEK et al., 2005). O protocolo de extração utilizado neste projeto produz resultados satisfatórios no laboratório Centervet com diversos tipos de amostra na rotina de genotipagem de outras espécies animais, como caninos e bovinos. Espera-se desse modo reproduzir os resultados também

com outras fontes de amostra, porém novos estudos precisam ser realizados visando esta validação. A concentração de DNA inicial utilizada neste estudo foi de 10 ng/ μ l, a qual pode ser facilmente obtida a partir de pelos com bulbos, sangue ou sêmen.

Os resultados obtidos com as amostras extraídas foram concordantes entre o sistema desenvolvido neste estudo e o kit comercial *Equine Genotypes*[®] (*Thermo Fisher Scientific*), embora alguns marcadores como o HTG7 tenham apresentado maior dificuldade de interpretação em algumas amostras no kit comercial.

Os dois sistemas para o painel TKY em conjunto também reproduziram resultados em concordância com os das amostras provenientes da ISAG, indicado que há uma perspectiva de sucesso embora estudos populacionais mais abrangentes ainda devam ser realizados. Este sistema não foi comparado com outro devido a inexistência de kits comerciais disponíveis para o painel adicional.

Não foi realizado um estudo populacional em raças distintas com maior número de amostras, no qual seria possível verificar mutações, frequências alélicas e números de alelos observados, o que não foi a proposta do presente trabalho. As adaptações e ajustes realizados, embora não tenham atingido o objetivo de um único sistema *multiplex* em cada painel, apresentaram melhorias como a amplificação de qualidade de marcadores do painel principal, restando apenas um único *locus* para inclusão (HTG10), o qual deverá ser aprimorado e desenvolvido em novos estudos. Para o painel adicional, foi possível obter dois sistemas no formato *multiplex*, diminuindo os custos e tempos de reação em relação ao recomendado, o qual sugeria três reações separadas (TOZAKI et al., 2001). Além disso, com os novos *primers* foi possível obter amplificações para marcadores para os quais não havia sido possível com os *primers* recomendados (TKY279, HTG10), mesmo em formato monoplex. Novos estudos deverão ser desenvolvidos com a finalidade de reunir em um único sistema *multiplex* todos os marcadores de cada painel.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi desenvolvido parcialmente um sistema *multiplex* com 14 marcadores para o painel principal de genotipagem de equinos recomendado pelo MAPA, uma vez que o marcador obrigatório HTG10 não apresentou resultado satisfatório na reação com os demais e precisou ser testado em uma reação de PCR a parte.

Para o painel adicional (série TKY) foi possível o desenvolvimento composto de dois sistemas *multiplex*, contemplando juntos 13 marcadores.

Ambos os sistemas foram validados e reproduziram os resultados considerados corretos pela ISAG no teste comparativo da rodada 2018-2019.

Os resultados obtidos para o painel principal foram consistentes com os do kit comercial *Equine Genotypes*® (*Thermo Fisher Scientific*), não sendo identificados alelos nulos.

REFERÊNCIAS

- ABERLE, K. S. et al. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. **Anim. Genet.**, v. 35, p. 270-277, 2004.
- ACHMANN, R. et al. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. **Anim. Genet.**, v. 35, p. 285-292, 2004.
- BANOS, G.; WIGGANS, G. R.; POWELL, R. L. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. **J. Dairy Sci.**, v.84, n. 11, p. 2523-2529, 2001.
- BARON, E. E. et al. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 389-394, 2002.
- BELLONE, R. R.; AVILA, A. Genetic Testing in the Horse. **Vet. Clin. Equine**, v. 36, n. 2, p. 211-234, 2020.
- BIERMAN, A. **Refinement and validation of a microsatellite based identification and parentage testing panel in horses**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Onderstepoort, 2010.
- BINNS, M. M. et al. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. **The British Veterinary Journal**, v. 151, p. 9-15, 1995.
- BONIN, A. et al. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3261-3273, 2004.
- BOWLING, A. T.; EGGLESTON-STOTT, M. L.; BYRNS, G.; CLARK, R. S.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Anim. Genet.**, v. 28, n. 4, p.247-252, 1997.
- BOWLING, A. T. Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. **Livestock Production Science**, v. 72, p. 111-116, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 74, de 20 de Outubro de 2004. Aprova os requisitos para credenciamento de laboratórios para realização de testes de identificação genética de animais pela análise do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) para fins de registro genealógico e inscrição de reprodutores. In: **Diário Oficial da União**. Brasília, 2004, n. 210, Seção I, p. 2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 15 de Dezembro de 2017. Aprova os critérios e requisitos específicos para o

credenciamento de laboratórios que realizam testes de identificação genética e verificação de parentesco de animais pela análise do DNA, visando o registro genealógico e a inscrição de reprodutores. **In: Diário Oficial da União**. Brasília, 2017, n. 246, Seção I, p. 4.

BREEN, M.; LINDGREN, G.; BINNS, M. M. Genetic and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. **Mamm. Genome**, v. 8, p. 267-273, 1997.

BROOKES C. et al. Characterising stutter in forensic STR multiplexes. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, p. 58-63, 2012.

BROWNSTEIN, M.J.; CARPTEN, J.D.; SMITH, J.R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. **Biotechniques**, v. 20, p. 1004-1010, 1996.

BUCKLETON J. S. et al. Testing whether stutter and low-level DNA peaks are additive. **Forensic Science International: Genetics**, v. 43, p. 1-5, 2019.

BUDOWLE, B. et al. Source attribution of a Forensic DNA profile. **Forensic Science Communications**, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2000.

BUTLER, J. M. Forensic DNA typing: Biology and technology behind STR markers. 1st ed. San Diego, CA: Academic Press, 322p, 2001.

CHEN, J. W. P. et al. Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system. **Forensic Science International: Genetics**, n.4, p. 158-167, 2010.

CHOI, S. K. et al. Genetic characterization and polymorphisms for parentage testing of the Jeju horse using 20 microsatellite loci. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, -. 1111-1115, 2008.

CLAYTON, T. M.; WHITAKER, J. P.; MAGUIRE, C. N. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. **For. Sci. Int.**, v. 76, p. 7-15, 1995.

COOGLE, L. et al. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. **Anim. Genet.**, v. 27, p. 126-127, 1996.

DANG, W. et al. A novel 13-plex STR typing system for individual identification and parentage testing of donkeys (*Equus asinus*). **Equine Vet. J.**, v. 0, p. 1-8, 2019.

DIMSOSKI, P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. **Croatian Medical Journal**, v. 44, p. 332-335, 2003.

EGGLESTON-STOTT, M. et al. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505. **Anim. Genet.**, v. 28, p. 370-371, 1997.

ELLEGREN, H.; JOHANSSON, M.; SANDBERG, K.; ANDERSSON, L. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. **Anim. Genet.**, v. 23, p. 132-133, 1992.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

EVETT, I. W.; GILL, P. A discussion of the robustness of methods for assessing the evidential value of DNA single locus profile in crime investigations. **Electrophoresis**, v. 12, p. 226-230, 1991.

FOWLER, J. C.; BURGOYNE, L.A.; SCOTT, A. C.; HARDING, H. W. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation – A concise review relevant to forensic biology. **J. Forensic Sci.**, v. 33, p. 1111-1126, 1988.

GASTALDO, A. Z. **Identificação genética e estudos populacionais utilizando microssatélites (STR) em equinos, bovinos e caninos domésticos provenientes do Uruguai, Paraguai e Brasil.** 2017. 136f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – PUCRS, Porto Alegre, 2017.

GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. **BioTechniques**, v. 18, n. 1, p. 62-63, 1995.

GLOWATZKI-MULLIS, M. L. et al. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Anim. Genet.**, v. 26, n. 1, p.7-12, 1995.

GRIMALDI, M.; CROUAU-ROY, B. Microsatellite Allelic Homoplasmy Due to Variable Flanking Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, p. 336-340, 1997.

GROSSMAN, P.; COLBURN, J. Capillary electrophoresis: theory and practice. 1st ed. San Diego, CA: Academic Press, 352p, 1992.

GUERIN, G.; BERTAUD, M.; AMIGUES, Y. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. **Anim. Gene.**, v. 25, p. 62, 1994.

HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, v. 23, p. 504-511, 1997.

HOLL, H. M. et al. Single nucleotide polymorphisms for DNA typing in the domestic horse. **Anim. Genet.**, v.48, n.5, p.669-676, 2017.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNISKY, J. J.; WHITE, T. J. PCR Protocols: A guide to methods and applications. 1st ed. San Diego, CA: Academic Press, 482p, 1989.

IRVIN, Z. et al. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci ASB21, 23, 25 and 37–43. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 67, 1998.

ISRAEL, C.; WELLER, J. I. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. **J. Dairy Sci.**, v.83, n. 1, p.181-187, 2000.

JIA, J. et al. Development and validation of a multiplex 19 X-chromosomal short tandem repeats typing system for forensic purposes. **Sci. Rep.**, v. 11: 609, p. 1-12, 2021.

KUN, T. J.; WICTUM, E. J.; PENEDO, M. C. T. A mini-STR typing system for degraded equine DNA. **Anim. Genet.**, v. 49, p. 464-466, 2018.

LEE, S.; CHO, G. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. **J. Vet. Sci.**, v. 7, p. 66-67, 2006.

LEVEDAKOU, E. N. et al. Allele frequencies for fourteen STR loci of the PowerPlex™ 1.1 and 2.1 multiplex systems and penta D locus in caucasians, african-americans, hispanics and other Populations of the United States of America and Brazil. **J. Forensic Sci.**, v. 46, n. 3, p. 736-761, 2001.

MACAVOY, E. S.; WOOD, A. R.; GARDNER, J. P. Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. **Aquaculture**, v. 274, p. 41-48, 2008.

MARKLUND, S. et al. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. **Anim. Genet.**, v. 25, p. 19-23, 1994.

MICKA, K. A. et al. Validation of a nine-locus and a four-locus fluorescent STR multiplex system. **J. Forensic Sci.**, v. 44, n. 6, p. 1243-1257, 1999.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Revisão do estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Brasília: Câmara Setorial de Equideocultura do MAPA, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalos>.

MITTMANN, E. H.; WREDE, J.; POOK, J.; DISTL, O. Identification of 21 781 equine microsatellites on the horse genome assembly 2.0. **Anim. Genet.**, v. 41, n. 2, p. 222, 2010.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NARKUTI, V.; ORAGANTI, N. M. De novo deletion at D13S317 locus: A case of paternal-child allele mismatch identified by microsatellite typing. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, p. 264-265, 2009.

PENA, S. D. J. Pitfalls of paternity testing based solely on PCR typing of minisatellites and microsatellites. **Am J Hum. Genet.**, v. 56, p.; 1503-1506, 1995.

REGITANO, L. C. A.; VENERONI, G. B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: II SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL. São Carlos. **Anais...** Embrapa Pecuária Sudeste: São Carlos, p. 1-20, 2009.

RIVETTI JR., A. V. Atualização da Instrução Normativa para identificação genética de animais. In: Atualização LANAGRO-MG - Juiz de Fora, 2016.

RIVETTI JR., A. V. Identificação Genética e Material de Multiplicação Animal. Workshop para Avaliadores de Laboratórios e Especialistas voltados à Agricultura e Pecuária Programa MAPA. 06 de Dezembro de 2018. Disponível em: http://www.oconsumidor.gov.br/credenciamento/eventos-cgcre/terceiro-dia/23_-_Identificacao_Genetica_e_Material_de_Multiplicacao_Animal.pdf. Acesso em 08 de Março de 2021.

RON, M. et al. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **J. Dairy Sci.**, v. 79, n. 4, p. 676-681, 1996.

SAIKI, R. K. et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SCHOSKE, R. et al. Multiplex PCR design strategy used for tge simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. **Anal. Bioanal. Chem.**, n. 375, p. 333-343, 2003.

SCHYMA, C.; HUCKENBECK, W.; BONETE, W. DNA-PCR Analysis of bloodstains sampled the polyvinyl method. **J. Forensic Sci.**, v. 44, n. 1, p. 95-99, 1999.

SHANG, S.; ZHANG, M.; ZHAO, Y.; DANG, W.; HUA, P.; ZHANG, S.; WANG, Z. Development and validation of a novel 13-plex PCR system for commonly used short tandem repeats in horses (*Equus caballus*). **Equine Vet. J.**, v. 51, p. 688-695, 2018.

SILVA, D. A. et al. Statistical analyses of 14 short tandem repeat loci in Brazilian populations from Rio de Janeiro and Mato Grosso do Sul states for forensic and identity testing purposes. **Forensic Sci Int.**, v. 139, p. 173-176, 2004.

SILVA, E. A. **Avaliação de um painel de microssatélites para identificação animal/averiguação de paternidade e estrutura genética da população de cavalos da raça mangalarga marchador.** 2012. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

TAKEZAKI, N.; NEI, M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. **Genetics**, v. 144, n. 1, p. 389-399, 1996.

TOZAKI, T. et al. Population Study and Validation of Paternity Testing for Thoroughbred Horses by 15 Microsatellite Loci. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, n. 11, p. 1191-1197, 2001.

TOZAKI, T. et al. Prospects for whole genome linkage disequilibrium mapping in Thoroughbreds. **Gene**, v. 346, p. 127-132, 2005.

VAN DE GOOR, L. H. P.; VAN HAERINGEN, W.A. **Identification of horses sold for slaughter using 17 genetic markers**. In: Nonhuman DNA Typing, Theory and Casework Applications. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

VAN DE GOOR, L. H. P.; VAN DE PANNEMAN, H.; VAN HAERINGEN, W. A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. **Anim. Genet.**, v. 41, n. 2, p. 121-127, 2009.

VAN HAERINGEN, H. et al. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. **Anim. Genet.**, v. 25, p. 207, 1994.

WICTUM, E. et al. Developmental validation of dogfiler, a novel multiplex for canine dna profiling in forensic casework. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 1, p. 82-91, 2013.

WOODWARD, B. W.; VAN DER LENDE, T. Single nucleotide polymorphisms for parentage testing, individual identification, and traceability. In: 31st Conference of the International Society for Animal Genetics. Amsterdam, p. 361-374, 2008.

ZABEK, T.; RADKO, A.; SLOTA, E. Implications for the use of horse hair roots as a DNA source for microsatellite typing. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 50, n. 11, p. 499-502, 2005.

ZHAO, X. et al. Genome-based development of 15 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in captive tigers. **PeerJ**, v. 8: e8939, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Alelos identificados com o kit desenvolvido para os painéis principal e adicional, considerando as 72 amostras testadas.

Marcador	Alelos
AHT4	H I J K L M N O P
AHT5	J K L M N O Q
ASB17	F G H I K L M N O P Q R S U
ASB2	B C I K M N O P Q R S
HMS1	I J K M N Q
HMS2	H I J K L M O P R
HMS3	I M N O P Q R S
HMS6	K L M N O P
HMS7	J K L M N O Q
HTG10	I K L M N O P Q R S
HTG4	K L M N O P Q
HTG6	G I J M O P R
HTG7	K M N O
LEX3	F H I K L M N O P Q
VHL20	I J L M N O P Q R S
TKY279	J M N O P Q
TKY287	K L N O Q R S
TKY297	I L M N O P R S
TKY301	K L M N O P S
TKY312	G I M N Q R S
TKY321	H I K L M O Q R S
TKY325	F I J K L M O P R
TKY333	J K M Q R S T
TKY337	J L M O P
TKY343	F I J M N O R S T U
TKY344	I K M O P Q
TKY374	F J L M N O P
TKY394	J K L M N O P