

## EXTRAÇÃO DE DNA DE PELO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HERDA<sup>1</sup>

Isaac Emanuel Neckel<sup>2</sup>, Carla Ivane Ganz Vogel<sup>3</sup>, Stéfane Gracia Montipo<sup>4</sup>, Marina Biolchi<sup>5</sup>, Flávia Anan Saiki<sup>5</sup>, Joandes Henrique Fontque<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Vinculado ao projeto “Caracterização funcional e expressão de genes envolvidos no sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em modelos de tripanossomatídeos submetidos a agentes genotóxicos.”

<sup>2</sup>Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC/UDESC

<sup>3</sup>Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – carla.vogel@udesc.br

<sup>4</sup>Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV

<sup>5</sup>Acadêmico do Curso de Pós-Graduação Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular – CAV

<sup>6</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária - CAV

A astenia regional dérmica hereditária equina (HERDA) é uma doença genética que consiste em displasia do tecido conjuntivo caracterizada por pele solta, facilmente hiperextensível e anormalmente frágil tornando-se predisposta a lesões de difícil cicatrização ocasionada por traumas. Os animais afetados também apresentam pele fina no dorso e abdome ventral; edemas, hematomas e seromas na pele, sendo que a pele se torna facilmente lecionável. Ocorre principalmente em equinos Quarto de Milha, onde os sintomas clínicos geralmente aparecem na idade de 1,5 a 2 anos. Em humanos, é a doença Ehlers-Danlos.

A causa genética da doença é uma mutação no gene *PPIB* (peptidylprolyl isomerase B) que codifica a proteína ciclophilina B, responsável pela produção colágeno. É uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação *missense* no códon 115 do gene *PPIB*, causando na substituição de uma Glicina por uma Argenina. Para o diagnóstico molecular, é necessário a extração do DNA do animal, reação de *PCR* (polymerase chain reaction) e sequenciamento. Como o material obtido foi pelo da crina do animal, dois protocolos de extração de DNA de pelo foram testados. Inicialmente, os fios de cabelo com bulbos foram inseridos em tubos de micro centrifuga com Tampão ATL, solução DTT e proteinase K, resultando em um líquido com propriedades saponificantes, oxidantes e solvente de proteínas, capaz de dissolver membranas, oxidar pontes dissulfeto e quebrar proteínas presentes ao redor do material genético, como as histonas, sem danificar o DNA.

A quantidade de proteinase K refere-se, conforme o protocolo, a 20uL, mas foi modificada para 30ul, devido a espessura dos fios de cabelo da crina do cavalo. A mistura foi encubada por 24 horas, sendo necessário realizar uma mistura com o vórtex a cada período de 4-6 horas. A purificação deste material, no dia seguinte, ocorreu com diversas etapas de diluição do material genético em colunas com filtro e soluções de tampão, além da utilização do etanol para a precipitação do DNA.

A partir da análise de absorbância do material previamente eluído, constatou-se que a utilização desta metodologia teve efeito positivo para a extração de material genético, apesar de sua baixa concentração final. Desta forma, diferentes testes são realizados para aumentar a eficácia da extração. O segundo teste, realizado com concentrações mais altas de proteinase K, além da comparação com pelos corporais de gato e cachorro e humano, mostrou-se mais eficiente

para a extração do DNA da crina, contudo a quantidade de material genético presente nas amostras de cão, gato e humano mostraram-se ínfimas para a adequada extração. Desta forma, pretende-se a seguir realizar a extração de DNA utilizando o primeiro protocolo para a confirmação molecular da doença.

**Palavras-chave:** HERDA. Astenia equina. Extração de DNA.