



47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

Diagnóstico Molecular das Doenças Hereditárias *BLAD* e *DUMPS* em bovinos da raça Girolando^{1,2}

Daisyléa de Souza Paiva³, Tatiane Ribeiro de Siqueira⁴, Larissa Helena da Rocha Meira⁵, Raquel Marinho Alvino⁵, Isabela Fonseca⁶, Alexandre Rodrigues Caetano⁷, Samuel Rezende Paiva⁷, Wagner Arbex⁸, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁸, Marta Fonseca Martins Guimarães⁸

¹Parte do trabalho financiado pela FAPEMIG

²Projeto Financiado pela Embrapa

³Graduanda do Curso de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora, Bolsista EMBRAPA. e-mail: daisyuff@gmail.com

⁴Graduanda do Curso de Biologia – Centro de Ensino Superior, Juiz de Fora, MG. e-mail: tatirsiqueira@yahoo.com.br

⁵Graduandas do curso de Biomedicina Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG. e-mail:

laribiomedica@gmail.com, raquelmabiomed@yahoo.com.br

⁶Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. e-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

⁷Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: acaetano@cenargen.embrapa.br, samuel@cenargen.embrapa.br

⁸Embrapa Gado de Leite, e-mail: arbex@cnpgl.embrapa.br, marcos@cnpgl.embrapa.br, mmartins@cnpgl.embrapa.br

Resumo: Dentre as doenças hereditárias que foram mais estudadas em animais de produção, temos a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina, conhecida como BLAD (*Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*), que é causada por uma mutação pontual recessiva no gene *CD18*. Animais homocigotos para o alelo mutante desenvolvem a doença e morrem ainda novos com pneumonia, crescimento atrofiado, perda de dentes e comprometimento do sistema imune. Outra doença hereditária recessiva importante é DUMPS (Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase), caracterizada por uma mutação não sentido no códon 405 do gene *UMPS* (Uridina Monofosfato Sintetase) que resulta em uma total deficiência da enzima funcional. Para as duas doenças, a identificação dos animais portadores pode ser feita por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Utilizando essa técnica foram genotipados 90 touros pertencentes ao teste de progênie da Raça Girolando para BLAD e DUMPS. A visualização dos genótipos foi realizada após a digestão com as enzimas de restrição *Hae* III e *Taq* I para o gene *CD18* e *Ava* I para o gene *UMPS*. A frequência dos animais portadores foi 1,11% e 0% para BLAD e DUMPS, respectivamente. Os resultados permitiram concluir que, para BLAD e DUMPS a população se encontra estatisticamente em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Palavras-chave: gene *CD18*, gene *UMPS*, melhoramento animal, PCR-RFLP

Molecular Diagnosis of Hereditary Diseases BLAD and DUMPS in Girolando cattle

Abstract: Among the hereditary diseases that were widely studied in production cattle, there is Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, known as BLAD that is caused by a recessive mutation in the *CD18* gene. Animals homozygous for the mutant allele develop disease and die with pneumonia, stunted growth, loss of teeth and impaired immune system. Another important recessive hereditary disease is DUMPS (Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase), characterized by a nonsense mutation at codon 405 of the *UMPS* gene (Uridine monophosphate synthase) resulting in a total deficiency of the enzyme function. For both diseases, the identification of carriers it can be done by PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Using this technique were genotyped 90 bulls belonging to the progeny test for BLAD and DUMPS. Visualization of genotypes was performed after digestion with restriction enzymes *Hae* III and *Taq* I to *CD18* gene and *Ava* I to *UMPS* gene. The frequency of carriers was 1.11% and 0% for BLAD and DUMPS, respectively. The results showed that the population is Hardy-Weinberg equilibrium for BLAD and DUMPS.

Keywords: animal breeding, *CD18* gene, PCR-RFLP, *UMPS* gene.



47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

Introdução

Das doenças hereditárias que foram mais estudadas em animais de produção, temos a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina, conhecida como BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*). Esta é causada por uma mutação pontual recessiva no gene *CD18*. Animais homocigotos para o alelo mutante desenvolvem a doença e morrem ainda novos com pneumonia, crescimento atrofiado, perda de dentes e comprometimento do sistema imune. No entanto, os animais heterocigotos desenvolvem-se normalmente e ainda estão relacionados com aumento na produção de leite e porcentagem de gordura e proteína. (Shuster et al., 1992). Os sintomas ocorrem devido à deficiência de uma família de proteínas da superfície dos leucócitos, responsáveis pelo movimento dos mesmos na corrente sanguínea (Nasreen et al, 2009).

Outra doença hereditária recessiva importante é DUMPS (Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase). Esta doença é caracterizada por uma mutação não senso (citosina por timina) no códon 405 do gene *UMPS* (Uridina Monofosfato Sintetase) que resulta em uma total deficiência da enzima funcional. Esta enzima é responsável pela conversão do ácido orótico para uridina monofosfato (UMP), fazendo parte de uma via essencial de síntese das pirimidinas. Como durante o desenvolvimento embrionário são requeridas grandes quantidades de pirimidinas para a síntese de ácidos nucleicos, embriões homocigotos para o alelo mutante morrem por volta do 40º dia (Schwenger et al., 1993). Animais heterocigotos apresentam um fenótipo normal, entretanto apresentam apenas metade da atividade normal da enzima UMPS (Rezaee et al., 2009).

Para essas duas doenças, a identificação dos animais portadores pode ser feita por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Schwenger, 1993). Após a amplificação da região específica no gene, os alelos são diferenciados por meio da digestão do produto com enzimas de restrição (Rezaee et al., 2009).

Determinar o genótipo de touros para doenças é importante, pois, à medida que o criador tem informações dos touros e das vacas que são portadores dos alelos indesejáveis, poderá tomar decisões de descarte e de estratégias de acasalamentos. Da mesma forma, identificar esses animais na população é uma estratégia para diminuir a frequência dos alelos desfavoráveis no rebanho e, consequentemente, reduzir a incidência das doenças hereditárias em bovinos utilizados no Teste de Progenie (TP).

Neste contexto, o objetivo do trabalho é estimar as frequências alélicas e genotípicas dos genes *CD18* e *UMPS* e verificar se os mesmos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em animais da raça Girolando participantes do Teste de Progenie da raça.

Material e Métodos

Foram genotipados todos 90 touros Girolando (Grupo 1 ao 11) pertencentes ao Teste de Progenie da raça coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. O DNA foi extraído das células do sêmen desses animais utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop®, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Para a amplificação da região de interesse dos genes *CD18* e *UMPS* foram utilizados *primers* já descritos (Shuster et al., 1992; Schwenger, 1993). Para cada par de *primer*, as condições da PCR foram otimizadas. O genótipo foi estabelecido após a digestão dos produtos da PCR utilizando-se a enzima de restrição *Taq* I e *Hae* III para o gene *CD18* e *Ava* I para o gene *UMPS*. Todas as reações foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para estabelecimento dos genótipos para BLAD, o produto digerido foi observado em gel de agarose 3%. Os animais portadores apresentam o padrão de 58, 32 e 26 pb para *Taq* I e 49, 30, 19 e 9 pb para *Hae* III. Já os animais normais apresentam o padrão de 32 e 26 para *Taq* I e 49 e 9 pb para *Hae* III. Para o gene *UMPS*, a determinação do genótipo dos animais, também, foi visualizada em gel de agarose 3%, após restrição, observando o padrão de bandas de 53 e 36 pb para animais normais e 89, 53 e 36 pb para os portadores. As análises de frequências gênicas e genotípicas e o teste de probabilidade de EHW foram estimados pelo programa *GENEPOP web version 3.4* (Raymond e Rousset, 1995). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 e nível de significância de 5%.



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

Resultados e Discussão

A Tabela 1 descreve as frequências gênicas, genotípicas e o EHW para os genes *CD18* e *UMPS* na população estudada. Para o gene *CD18*, as frequências alélicas diferiram muito entre si, sendo 1,11% para o alelo letal e 98,89% para o alelo normal. Além disso, observou-se uma baixa frequência de portadores (0,6%). Esses resultados estão diferentes das frequências relatadas na raça holandesa por Nasreen et al. (2009) nos Estados Unidos (15%), mas próximas daquelas do Paquistão (1%), Turquia (0,84%) e Brasil (2,8%).

Não foram encontrados animais portadores da mutação no gene *UMPS* na população estudada. Apesar de estar em acordo com os resultados de Rezaee et al. (2009), essa baixa frequência do alelo letal pode ter acontecido devido ao tamanho da amostra, já que somente os touros em teste foram genotipados.

De acordo com a análise estatística, para os genes *UMPS* e *CD18*, as frequências encontradas estão semelhantes às esperadas. Sendo assim, estatisticamente, a população se encontra em EHW. Pelo fato de ter sido genotipado um pequeno número de animais, e por haver uma tentativa de diminuição da frequência do alelo letal em touros Holandês, o alelo normal está fixando-se na população. Isso faz com que no teste de EHW a população estudada esteja em equilíbrio, apesar de estar havendo seleção.

Tabela 1- Frequências genotípicas, gênicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genes	Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW*
		Esperado	Observado	Genotípica	Alélica	
<i>CD18</i>	BL ¹	0,98	1,00	0,01	0,01 (B)	0
	TL ²	89,00	89,00	0,99	0,99 (T)	
<i>UMPS</i>	TD ³	90,00	90,00	1,00	1,00 (T)	0
	DP ⁴	0,00	0,00	0,00	0,00 (D)	

* = $P < (0,05)$, ¹Heterozigoto para o Alelo BLAD, ²Homozigoto não portador do alelo para BLAD, ³Homozigoto não portador do alelo para DUMPS, ⁴Heterozigoto para o alelo DUMPS.

Conclusões

Foi constatado que a população estudada encontra-se em EHW. No entanto, esses resultados são preliminares, sendo, necessário um estudo com maior número de animais, incluindo as vacas participantes do Teste de Progênie, para estimar a frequência dos alelos letais na população e traçar estratégias para a sua diminuição na raça.

Literatura citada

- NASREEN, F.; MALIK, N.A.; RIAZ, M.N. et al. Detection and screening of bovine leukocyte adhesion deficiency in Pakistan using molecular methods. **Hereditas**, v.146, p.74-78, 2009.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249. 1995.
- REZAAE, A. R.; NASSIRY, M. R.; SADEGHI, B. et al. Implication of complex vertebral malformation and deficiency of uridine monophosphate synthase on molecular-based testing in the Iranian Holstein bulls population. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.6077-6081, 2009.
- SCHWENGER, B.; SCHÖBER, S.; SIMON, D. DUMPS Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. **Genomics**, v.16, p.241-244, 1993.
- SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN JR., M.R. et al. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.89, p.9225-9229, 1992.