

Determinação da frequência alélica do gene *SLC35A3* em animais da raça Girolando

Isabela Gomes Barreto da Motta, Germano Roberto da Silveira Pereira, Willian Pascoa Pereira, João Vitor Paes Retorre, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Fonseca, Wagner Antônio Arbex, Marcos Vinícius G. B. Silva, Marta Fonseca Martins

Resumo

O Complexo de Má Formação Vertebral (CVM) é uma doença hereditária autossômica recessiva caracterizada por uma mutação pontual no nucleotídeo 599 do gene *SLC35A3*, causada pela substituição de uma Guanina por uma Timina. CVM é considerada uma doença letal quando em homozigose, causando aborto e podendo levar a morte pós-nascimento devido a uma série de sequelas no animal. Este estudo foi realizado com o objetivo de estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *SLC35A3* nos animais participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando e verificar se essa população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Foram genotipados 785 animais, sendo 120 touros e 665 vacas. A genotipagem foi feita utilizando-se a técnica de AS-PCR e o diagnóstico foi estabelecido por meio de gel de agarose onde é possível a observação de uma banda de 395 pb. A frequência alélica encontrada foi de 0,9847 para o alelo *T* (alelo recessivo) e de 0,0153 para o alelo *G*.

Palavras-chave: CVM; mutação; AS-PCR.

Determining the Allele Frequency of *SLC35A3* Gene in Animal Breed Girolando

Abstract

The Complex Vertebral Malformation (CVM) is an autosomal recessive inherited disease characterized by a point mutation at nucleotide 599 of the *SLC35A3* gene, caused by an exchange of guanine by a thymine. CVM is considered a lethal disease when homozygous, causing abortion of the calf and can cause death after birth due to a series of sequels in the animal when it has the disease. This study was conducted with the purpose of estimate the allelic and genotypic frequencies of the *SLC35A3* gene in the animals participating in the Progeny Test Girolando and check if this population is in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Were genotyped 785 animals, 120 bulls and 665 cows. The genotyping was performed using the AS-PCR technique and the diagnosis was established by agarose gel where it is possible to observe a band of 395 bp. The allele frequency found was of 0.9847 for the *T* allele (recessive allele) and 0.0153 for allele *G*.

Keywords: CVM; mutation; AS-PCR.

Introdução

O Complexo de Má Formação Vertebral (CVM) é uma doença letal quando em homozigose, responsável pela morte do feto ainda no útero da fêmea. Em caso de heterozigose o animal nasce com sequelas, morrendo dias após o seu nascimento (NIELSEN et al., 2003). As principais manifestações clínicas são escoliose, artrogripose, cifose, defeito no septo ventricular, retardamento no crescimento além de diversos problemas quanto à formação da região cervical e torácica.

CVM é uma doença hereditária autossômica de caráter recessivo, causada por uma mutação pontual que ocorre na posição 599 do gene *SLC35A3* ocasionando a troca de uma Guanina por uma Timina (AGERHOLM et. al., 2001). O gene *SLC35A3* é responsável pela codificação da proteína transportadora de UDP-N-acetilglicosamina que está envolvida na formação das vértebras. Quando ocorre uma mutação na conformação desta proteína tem-se a má formação das vértebras (THOMSEN et. al., 2006).

O estudo do CVM apresenta grande importância para o melhoramento animal estando diretamente ligado à criação de gado leiteiro visto que a presença deste gene numa população pode alterar drasticamente sua produtividade, refletindo em prejuízos econômicos para o produtor. Este estudo foi realizado com o objetivo de estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *SLC35A3* nos animais participantes do Teste de Progenie da Raça Girolando e identificar animais portadores.

Material e Métodos

Foram genotipados 785 animais, sendo 120 machos e 665 fêmeas, pertencentes ao Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando.

Para a extração do DNA a partir de sêmen e sangue, utilizou-se o *DNasey® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de DNA foi feita por espectrofotometria usando o NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Para a genotipagem foi utilizada a técnica de AS-PCR (*Allele Specific-Polymerase Chain Reaction*), no qual se utilizou dois *forward primers*: um para o alelo G e outro para o alelo T e um *reverse primer* comum para os dois alelos (G/T) (GHANEM et al., 2008). A PCR foi realizada em Termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystem, Forster City, CA, EUA) e o diagnóstico foi observado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para a identificação dos alelos G e T a partir da presença de uma banda de 395 pb. Em animais não portadores é possível observar uma banda de 395 pb para o par de *primers* correspondentes somente ao alelo G. Em animais portadores observa-se a banda de 395 pb para os *primers* correspondentes tanto para o alelo G, quanto para o alelo T. As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram determinadas por meio do programa Popgen 1.32 (YEH et al., 1997). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

As frequências genotípicas encontradas para os genótipos TV (GG) e CV (GT) foram 0,9847 e 0,0153 respectivamente e as frequências alélicas foram de 0,9924 para o alelo G e de 0,0076 para o alelo T. As frequências observadas encontram-se próximas às esperadas, indicando que a população estudada está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Do total de animais heterozigotos para a característica (CV), apenas um touro foi diagnosticado como portador. O resultado obtido no presente estudo, confirma os resultados encontrados por Berglund et al. (2004) e por Ghanem et al. (2008) em estudos realizados com animais da raça Holandesa, sugerindo que há uma tendência na redução do alelo responsável pela doença na população analisada, uma vez que o alelo T é homozigose é letal.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas e probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Gene	Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW*
		Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
CVM	TV	773	773.0421	0.9847	0.9924 (G)	0.04266
	CV	12	11.9159	0.0153	0.0076 (T)	

*P < 0,05.

Conclusões

Os dados obtidos mostram que a população estudada se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, condição confirmada estatisticamente (P < 0,05).

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite, ao CNPq e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

AGERHOLM, J. S.; BENDIXEN, C.; ANDERSEN, O.; ARNBJERG, J. Complex vertebral malformation in Holstein calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 283-289. 2001

BERGLUND, B.; PERSSON, A.; STÅLHAMMAR, H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, p. 161-165. 2004

GHANEM, M. E.; AKITA, M.; SUZUKI, T.; KASUGA A.; NISHIBORI M. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Animal Reproduction Science**, v. 103 p. 348–354. 2008

NIELSEN, U. S.; AAMAND, G. P.; ANDERSEN, O., et al. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. **Livestock Production Science**, v. 79, p. 233–238. 2003.

THOMSEN, B.; HORN, P., PANITZ F., BENDIXEN, E., PETERSEN, A.H., HOLM, L.E., NIELSEN, V.H., AGERHOLM, J.S., ARNBJERG, J., BENDIXEN, C. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-Nacetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. **Genome Research**, v. 16, p. 97-105. 2006

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J. et al. POPGEN (VERSION 1.32): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: **University of Alberta**, 1997.