



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS GENES PARA BLAD, DUMPS E CVM EM ANIMAIS DA RAÇA GIROLANDO

Juliana França Monteiro de Mendonça(1), Isabella Dutra Valverde(2), Isabela Fonseca(3), Marcos Vinícius G.B. da Silva(4), Marta Fonseca Martins(5)

(1) Estudante de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: julianafmm@yahoo.com.br; (2) Estudante de Graduação em Farmácia; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: isabella_argirita@hotmail.com; (3) Bolsista de Pós-Doutorado Júnior - CNPq; Laboratório de Genética Molecular; Embrapa Gado de Leite; E-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br; (4) Pesquisador; Laboratório de Bioinformática e Genômica Animal; Embrapa Gado de Leite; E-mail: marcos.vb.silva@embrapa.br; (5) Pesquisadora; Laboratório de Genética Molecular; Embrapa Gado de Leite; E-mail: marta.martins@embrapa.br.

RESUMO – As principais doenças hereditárias estudadas em bovinos são Deficiência da Adesão Leucocitária Bovina (BLAD), Deficiência da Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS) e Complexo de Má Formação Vertebral (CVM). Essas doenças se manifestam quando o indivíduo é homozigoto para os alelos que condicionam a característica em questão. A identificação de animais portadores é de extrema importância, pois permite o direcionamento de estratégias para diminuir a frequência de alelos desfavoráveis na população, reduzindo, também a incidência de doenças hereditárias em animais utilizados em Testes de Progênie. O objetivo desse trabalho foi demonstrar as frequências dos alelos responsáveis pelas doenças BLAD, DUMPS e CVM, além das frequências genotípicas entre os animais participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando. Os resultados indicam que, mesmo em baixas frequências, ainda estão presentes alelos responsáveis por importantes doenças letais na população de animais Girolando no Brasil.

Palavras-chave: Análises moleculares. Doenças hereditárias. Teste de Progênie.

Introdução

O avanço no conhecimento de técnicas moleculares tem permitido que programas de melhoramento animal sejam cada vez mais confiáveis e eficazes em selecionar animais com características desejáveis, principalmente em relação à produção e produtividade. Além da seleção de genes favoráveis à produção, doenças genéticas podem ser identificadas.

As principais doenças hereditárias estudadas são Deficiência da Adesão Leucocitária Bovina (BLAD), Deficiência da Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS) e Complexo de Má Formação Vertebral (CVM). Essas doenças se manifestam quando o indivíduo é homozigoto para os alelos da característica em questão. Dessa forma, os testes moleculares objetivam a identificação de animais heterozigotos (portadores), que têm a capacidade de transmitir esses alelos sem manifestar a doença (Guimarães et al., 2010).

A identificação de animais portadores é de extrema importância, pois permite o direcionamento de estratégias para diminuir a frequência de alelos desfavoráveis na população, reduzindo, também a incidência de doenças hereditárias em animais utilizados em Testes de Progênie.



De 19 a 21
de Novembro de 2015

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

O Teste de Progênie da Raça Girolando é realizado desde 1997, através de uma parceria entre a Associação de Criadores da Raça Girolando e a Embrapa Gado de Leite. As análises moleculares são realizadas a partir de amostras de sangue e sêmen, para identificação de animais portadores de alelos favoráveis (relacionados à produção) e desfavoráveis (doenças hereditárias). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi demonstrar as frequências dos alelos responsáveis pelas doenças BLAD, DUMPS e CVM, além das frequências genótípicas entre os animais participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando.

Material e Métodos

Amostras de sêmen e sangue de animais participantes do Programa Nacional de Melhoramento Genético da raça Girolando (255 touros e 694 vacas) foram recebidas no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite. O DNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se o *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi, ainda, quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® Technologies, Wilmington, DE, EUA) e sua qualidade também avaliada por esse equipamento.

A PCR foi realizada utilizando-se pares de *primers* já descritos na literatura para BLAD (Shuster et al., 1992), DUMPS (Schwenger et al., 1993) e CVM (Ghanem et al., 2008). Para CVM foram utilizados três *primers*: um *forward* para o alelo T, um *forward* para o alelo G e um *reverse* comum aos dois alelos.

As genotipagens para BLAD e DUMPS foram realizadas através da digestão dos produtos de PCR com enzimas específicas. Para a genotipagem de BLAD, foram utilizadas as enzimas *Taq I* (4U) e *Hae III* (4U) para digestão dos produtos de PCR em duas reações distintas. Já para a genotipagem de DUMPS foi utilizada a enzima *Ava I* (5U). Os produtos de genotipagem foram visualizados em gel de agarose 3% corados em solução de brometo de etídeo 0,001% utilizando-se o equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). O padrão de fragmentos observados no gel para a verificação do genótipo está descrito na Tabela 1.

A partir da análise dos géis, foram calculadas as frequências alélica e genotípica existentes na população estudada.

Tabela 1 - Padrões de fragmentos para a determinação dos genótipos.

Doença	Genótipos	Tamanho dos fragmentos (pares de bases)			
CVM	TV (não portador)	-	395		
	CV (portador)	395	395		
	CVM (doente)	395	-		
DUMPS	TD (não portador)	-	53	36	
	DP (portador)	89	53	36	
	DUMPS (doente)	89	-	-	
BLAD			Enzima <i>Taq I</i>		
	TL (não portador)	-	32	26	
	BL (portador)	58	32	26	
	BLAD (doente)	58	-	-	
				Enzima <i>Hae III</i>	
	TL (não portador)	49			
BL (portador)	49	30	19		
BLAD (doente)		30	19		



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

Resultados e Discussão

Dentre os 917 animais genotipados para BLAD, 0,76% ($n = 7$) apresentaram o alelo para BLAD, com uma frequência alélica de 0,0076 (Tabela 2). Paiva et al. (2012) encontraram frequência genotípica semelhante à desse estudo (0,77%). Ainda, esses autores encontraram portadores do alelo para BLAD tanto em machos quanto em fêmeas. No presente estudo, o alelo para BLAD foi encontrado somente entre as fêmeas. Em outra pesquisa realizada em rebanhos brasileiros, Ribeiro et al. (2000) não encontraram esse alelo em touros da raça Gir.

Foram encontrados 17 animais portadores do alelo para CVM, de um total de 977 animais (Tabela 2). Esse alelo foi encontrado em 1,54% dos touros ($n=4$) e em 1,77% das vacas, com frequências alélicas de 0,0154% e 0,0177%, respectivamente. Paiva et al. (2012) encontraram frequências de portadores desse alelo mais baixas (1,54%). Entretanto, outros autores relataram frequências superiores, variando de 3,4% até 15% (Ghanem, 2008; Meydan, 2010).

Não foram realizadas genotipagens para DUMPS em vacas nesse estudo e, dentre os touros, não foram encontrados portadores do alelo para DUMPS.

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas em animais da raça Girolando.

	Doença	Genes	Genótipo	Nº Animais	Frequências	
					Alélica	Genotípica
Touros e Vacas	BLAD	CD18 ¹	TL	910	0,9924	99,24
			BL	7	0,0076	0,76
	DUMPS	UMPS ²	TD	259	1,0000	100,00
			DP	0	0,0000	0,00
	CVM	SLC35A3 ³	TV	977	0,9829	98,29
CV			17	0,0171	1,71	
Touros	BLAD	CD18 ¹	TL	262	1,0000	100,00
			BL	0	0,0000	0,00
	DUMPS	UMPS ²	TD	259	1,0000	100,00
			DP	0	0,0000	0,00
	CVM	SLC35A3 ³	TV	255	0,9846	98,46
CV			4	0,0154	1,54	
Vacas	BLAD	CD18 ¹	TL	648	0,9893	98,93
			BL	7	0,0107	1,07
	CVM	SLC35A3 ³	TV	722	0,9823	98,23
			CV	13	0,0177	1,77

¹Genótipos para o gene CD18: TL = animal homocigoto, não portador do alelo para BLAD; BL = animal heterocigoto, portador do alelo para BLAD. ²Genótipos para o gene UMPS: TD = animal homocigoto; não portador do alelo para DUMPS; DP = animal heterocigoto, portador do alelo para DUMPS. ³Genótipos para o gene SLC35A3: TV = animal homocigoto, não portado do alelo para CVM; CV = animal heterocigoto, portador do alelo para CVM.

Conclusão



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

Foi possível verificar que, mesmo em baixas frequências, ainda são verificados alelos responsáveis por importantes doenças letais na população de animais Girolando no Brasil, como as doenças BLAD e CVM. Apesar de não ter sido detectado nenhum animal portador do alelo letal para DUMPS, não se pode afirmar que esta doença não existe mais população, já que o experimento foi conduzido apenas em uma amostra. Além disso, eventos de migração e mutação, que ocorrem frequentemente, podem fazer com que este alelo seja novamente detectado.

Instituição de Fomento

Fapemig, CNPq e Embrapa.



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

Referências Bibliográficas

Ghanem, M.E.; Akita, M.; Suzuki, T.; Kasuga, A. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Anim. Reprod. Sci.** V.103, p. 348-354, 2008.

Guimarães, M. F. M.; Machado, M. A.; Silva, M. V. G. B. Biotécnicas. In: **Manual de Bovinocultura do Leite**. AUAD, A. M. et al. 1 ed. Brasília: LK editora; Belo Horizonte: SENAR/MG; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010.

Meydan, H.; Yildiz, M. A.; Agerholm, J. S. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. **Acta Vet. Scand.**, v. 52, p.56, 2010.

Paiva, D. S.; Fonseca, I.; Pinto, I. S. B.; Ianella, P.; Campos, T. A.; Caetano, A. R.; Paiva, S. R.; Silva, M. V. G. B.; Martins, M.F. Incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency, complex vertebral malformation, and deficiency of uridine-5-monophosphate synthase carriers in Brazilian Girolando cattle. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, p. 3186-3192, 2013.

Ribeiro, L. A.; Baron, E. E.; Martinez, M. L.; Coutinho, L.L. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23, p. 831-834, 2000.

Schwenger, B.; Schober 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. Jr.; Ackermann, M.R.; Gilbert, R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.89, p. 9225-9229, 1992.