

Identificação de portadores de alelos recessivos para três doenças hereditárias: CVM, BLAD e DUMPS em touros da Raça Girolando¹

Sane Neves Barbosa^{2,3}, Hyago Passe Pereira⁴, Rosana Isabel da Costa Nascimento^{3,5}, Kevin Schefer dos Santos^{2,3}, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁶, Marco Antonio Machado^{7,8}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva^{7,8}, João Cláudio do Carmo Panetto⁷, Marta Fonseca Martins^{7,8,9}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro parcial do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Parte do projeto “Estratégias de melhoramento genético para as raças Gir Leiteiro, Guzerá, Sindi e Girolando em sistemas sustentáveis de produção de leite”, liderado por João Cláudio do Carmo Panetto.

²Bolsista PIBIC CNPq/ Embrapa. E-mail: sanenev.sn@gmail.com, kkflajf@gmail.com

³Graduando em Ciências Biológicas - CES-JF. E-mail: rosana.costa_nascimento@yahoo.com.br

⁴Mestrando em Ciências Biológicas - UFJF, Juiz de Fora/MG. E-mail: hyago9295@gmail.com

⁵Estagiária, Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG

⁶Analista, Embrapa Gado de Leite. E-mail: danielle.reis@embrapa.br

⁷Pesquisador, Embrapa Gado de Leite. E-mail: marco.machado@embrapa.br, marcos.vb.silva@embrapa.br, joao.panetto@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br

⁸ Bolsista de Produtividade CNPq

⁹Orientador

Resumo: Em parceria com a Embrapa Gado de Leite, a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (Girolando) criou o Teste de Progênie em 1997 com o objetivo de orientar a seleção de animais geneticamente superiores. Além da avaliação genética para produção de leite e idade ao primeiro parto, são divulgados anualmente no Sumário de Touros, os genótipos de touros para genes associados a características de produção e também para doenças hereditárias. Assim esse trabalho teve como objetivo a genotipagem de 90 touros integrantes do Teste de Progênie da Raça Girolando para as três principais doenças hereditárias presentes em bovinos: Deficiência da Adesão Leucocitária Bovina (BLAD), Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase (DUMPS) e Complexo de Má Formação Vertebral (CVM). O presente estudo foi realizado utilizando métodos de PCR, aplicados em amostras de DNA extraídas com protocolo de extração de DNA Fenol - Clorofórmio - Álcool isoamílico. Foi identificado a presença de apenas dois animais portadores do alelo de CVM e nenhum portador dos alelos causadores das demais doenças.

Palavras-chave: Doenças genéticas. PCR. Teste de progênie.

Identification of carriers of recessive alleles for three hereditary diseases: CVM, BLAD and DUMPS in bulls of breed Girolando

Abstract: In partnership with Embrapa Gado de Leite, the Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (Girolando) created the Progeny Test in 1997 with the objective of guiding the selection of genetically superior animals. In addition to the genetic evaluation for milk production and age at first calving, the genotypes of bulls have published in the Sire Summary for genes associated with production characteristics and for hereditary diseases. The objective of this work was the genotyping of 90 bulls belonging to the Girolando Progeny Test for the three main hereditary diseases present in bovine: Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD), Uridine Monophosphate Synthase Deficiency (DUMPS) and Bad Complex Vertebral Formation (CVM). The present study was performed using PCR methods, applied in DNA samples extracted with protocol extraction of DNA Phenol - Chloroform - Isoamyl alcohol. It was identified the presence of only two animals carrying the CVM allele and no carriers of the alleles causing the other diseases.

Introdução

A Girolando (Associação Brasileira dos Criadores de Girolando) em parceria com a Embrapa Gado de Leite implantou o Teste de Progênie com o objetivo de identificar animais

superiores produtivamente, e orientar a multiplicação genética desses animais (BRASIL, S.D.; CEMBRANELLI, S.D.). Anualmente são divulgados os resultados de avaliação genética de vacas e touros para características de produção, utilizando metodologia tradicional. As informações genotípicas, obtidas por técnicas moleculares, começaram divulgadas a partir de 2008.

Com o desenvolvimento e popularização das metodologias moleculares, a genotipagem dos animais tornou-se comum entre os criadores de bovinos. Hoje há vários testes disponíveis no mercado, como para genes de importância econômica, como proteínas do leite e para a identificação de animais portadores para alelos associados a doenças genéticas. Assim os criadores, de posse dessa informação podem planejar os cruzamentos em seus rebanhos e, assim, escolher os animais a serem acasalados para dar origem a uma nova geração de animais superiores (GIROLANDO, 2017).

Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença de animais portadores de alelos das três principais doenças hereditárias autossômicas recessivas em bovinos: Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase (DUMPS), o Complexo de Má Formação Vertebral (CVM) e a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina (BLAD) em uma amostra de touros da Raça Girolando participantes do teste de progênie.

DUMPS é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação no códon 405 do gene UMP, que codifica a uridina monofosfato sintetase. Esta mutação gera uma total deficiência dessa molécula, que é responsável pela modificação do ácido orótico para uridina (THOMSEN et al., 2006). CVM é caracterizada por ter, na maioria dos casos, os doentes abortados, pois são afetados ainda em desenvolvimento fetal. É uma mutação pontual no nucleotídeo 559 do gene SLC35A3 em bovinos, este gene é responsável pela produção da proteína transportadora de UDP-N-acetilglicosamina, que é de grande importância no controle de mecanismos da formação das vértebras (SCHWENGER et al., 1993). Descrita em 1983 como uma doença autossômica recessiva em animais da raça Holandesa, BLAD é causada por mutação que se encontra no gene CD18, que codifica a subunidade proteica $\beta 2$ que integra o complexo maior glicoproteico leucocitário, essa mutação gera uma expressão reduzida do complexo glicoproteico leucocitário, resultando na não realização da migração e fagocitose nos locais de infecções bacterianas caso elas ocorram, já que os leucócitos em indivíduos com duplos alelos recessivos para BLAD não aderem às paredes dos vasos sanguíneos (HAGEMOSER et al., 1986; SHUSTER, 1992).

Material e Métodos

Nesse trabalho foi realizada a genotipagem de touros da raça Girolando em amostras de 90 animais, das quais 80 foram testadas para BLAD, 82 para CVM e 79 para DUMPS. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez, que se encontra na sede da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG. As amostras de sangue e sêmen tiveram o DNA extraído a partir do protocolo de Extração de DNA Fenol - Clorofórmio - Álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 2001).

Para o PCR de CVM foram utilizados os *primers* descritos em Ghanem et al., 2008, para a amplificação dos alelos relacionados à doença BLAD foi usado os *primers* descritos em Shuster et al., 1992 e para DUMPS os *primers* descritos em Schwenger et al., 1993.

Foi usada para a digestão enzimática de BLAD a enzima de restrição HAE III (5 U) (SHUSTER et al., 1992) e na digestão enzimática de DUMPS foi usada a enzima de restrição AVA I (3U) (SCHWENGER et al., 1993). Os genótipos determinados e o tamanho dos fragmentos visualizados nos géis são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tamanhos de fragmentos para a determinação de genótipos para doenças autossômicas recessivas CVM, DUMPS e BLAD.

Doença	Genótipos	Tamanho dos fragmentos (pb)		
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	TL (não portador)	49		
	BL (portador)	49	30	19
	BLAD (doente)		30	19

Resultados e Discussão

Foi constada ausência de animais portadores de DUMPS, de 82 animais selecionados para genotipagem de CVM apenas dois deles possuem o alelo para a doença e nenhum dos 80 animais selecionados para genotipagem possuem o alelo causador de BLAD (Tabela 2). Em estudo feito por Mendonça et al. (2015) foram encontrados 17 animais (vacas e touros Girolando) que possuem o alelo mutante para CVM e destes 4 eram touros, porém em 259 touros testados para DUMPS e BLAD nenhum apresentou alguma das mutações. Em outro trabalho realizado com animais indianos da raça holandesa também não houve nenhum portador da mutação UMPS (PATEL, 2006). Rezaee (2009) não identificou em nenhum dos touros testados em seu trabalho com animais iranianos da raça holandesa os alelos mutantes para as doenças.

Paiva (2013) encontrou apenas um touro e cinco vacas heterozigotos para a doença CVM em um estudo feito com 777 animais da raça Girolando, e vale ressaltar que três dessas vacas eram filhas do touro portador encontrado no estudo.

Tabela 2. Genótipos e números de animais encontrados para cada um deles.

Doença	Genes	Genótipo	Nº Animais
CVM	SLC35A3 ¹	TV	80
		CV	2
BLAD	CD18 ²	TL	80
		BL	0
DUMPS	UMPS ³	TD	79
		DP	0

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

Conclusões

O objetivo de identificar animais da raça Girolando que fossem portadores de alelos causadores de três principais doenças autossômicas recessivas encontradas em bovinos foi alcançado, revelando o resultado de apenas dois, dos 90 animais, serem portadores da doença CVM e nenhum ser portador das doenças BLAD e DUMPS.

Agradecimentos

À equipe do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa pela ajuda, apoio e oportunidade. CNPq e Embrapa pelo financiamento do projeto.

Referências

- BRASIL. Embrapa gado de leite. **Programa Nacional de Melhoramento do Girolando. S.D.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1410/programa-nacional-de-melhoramento-do-girolando>>. Acesso em: 20 maio 2017.
- 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.
- GIROLANDO (Brasil). **Girolando - a raça mais versátil do mundo tropical.** 2017.IBGE. PPM: **Rebanho bovino alcança a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças, mas produção de leite cai 0,4%. 2016.**
- HAGEMOSER, W., ROTH, J. LOFSTED, J. FAGERLAND, J. **Granulocytopathy in a Holstein heifer.** Journal of the American Medical Association, v. 183, p.1093-1094, 1983.
- MENDONÇA, J. F. M., et al. **Análise das frequências alélicas e genotípicas dos genes para BLAD, DUMPS e CVM em animais da raça girolando.** 1º Congresso Internacional da raça Girolando. 2015.
- PAIVA, D. S. et al. Incidência da doença CVM em bovinos da raça Girolando. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56., 2010, Guarujá, SP. **Resumo...** . [Juiz de Fora, MG]: Sbg, 2010. p. 21 - 21.
- PATEL, R. K. et al. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. **Journal of applied genetics**, v. 47, n. 3, p. 239-242, 2006.
- POLIDO, P. B. et al. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 161-169, 2012.
- REZAEI, A. R. 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, n. 22, 2009.
- SAMBROOK, J. RUSSELL; RUSSELL, DAVIDW. DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. **Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 3, p. 348-349, 2001.
- 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.; Kehrl, 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.
- THOMSEN, Bo et al. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. **Genome research**, v. 16, n. 1, p. 97-105, 2006.
- ZOCCAL, R. **Alguns números do leite.** 2016. Revista On-line Balde Branco.