

Identificação de portadores da síndrome de Brachyspina em touros das raças Gir e Holandesa¹

Ariany Lacerda Nogueira^{2,3}
Rafaella Lima Oliveira de Magalhães^{2,4}
Stela Mayworm Jens^{2,5}
Maria Eduarda Miranda Fracetti^{2,5}
*Hyago Passe Pereira*⁶
*Robert Domingues*⁷
*Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza*⁸
João Cláudio do Carmo Panetto^{9,10}
Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva^{9,10}
Marta Fonseca Martins^{8,9}
Marco Antonio Machado^{8,9,11}

Resumo: O Gir Leiteiro é considerado a raça zebuína de maior produtividade leiteira em clima tropical, uma vez que pode produzir em média 12 kg de leite por dia, o que justifica sua ampla utilização em programas de melhoramento genético no Brasil. Outra raça de grande importância para a produção de leite é a raça Holandesa, devido aos seus longos períodos de lactação e alta produtividade. Desta forma, a genotipagem dos touros de ambas as raças é de extrema importância para garantir a viabilidade dos animais utilizados na pecuária leiteira e assim diminuir a frequência de alelos deletérios nos rebanhos. A Brachyspina (BS) é uma síndrome genética recessiva letal identificada primeiramente em animais da raça Holandesa, que comumente causa aborto precoce e em casos raros bezerras natimortas. Não há nenhum caso relatado de BS em animais da raça Gir até o momento na literatura. Assim, este estudo objetivou genotipar 774 touros da raça Gir e 60 da raça Holandesa para o gene da BS por meio da técnica de PCR multiplex. Foram encontrados 4 touros portadores do alelo recessivo na raça Holandesa, sendo que a frequência alélica foi de 3,3% e a genotípica de 6,6% e nenhum Gir foi portador.

Palavras-chave: Genotipagem, Frequência alélica, Síndrome genética, Gado holandês

Genotyping of Gir and Holstein bulls from the DNA bank of Embrapa Gado de Leite for Brachyspina gene

Abstract: Gir is considered the zebu breed with the highest dairy productivity in a tropical climate, since it can produce an average of 12 kg of milk per day, which justifies its wide use in dairy genetic improvement programs, mainly in Brazil. Another breed of great importance for milk production is the Holstein breed, due to its long lactation periods and high productivity.

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Embrapa, Parte do projeto "Utilização de ferramentas genômicas e quantitativas para maximização dos ganhos genéticos nos programas de seleção em bovinos leiteiros - SEG 20.18.01.018.00.00", liderado por Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva.

² Bolsista PIBIC CNPq.

³ Graduanda em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: ariany.lacerda@icb.ufjf.br

⁴ Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: rafaella.magalhaes1234@gmail.com

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas - UniAcademia. e-mail: stelajens@hotmail.com

⁶ Doutorando em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: hyago9295@gmail.com

⁷ Analista, Embrapa Pecuária Sul. e-mail: robert.domingues@embrapa.br

⁸ Analista, Embrapa Gado de Leite. e-mail: danielle.reis@embrapa.br

⁹ Pesquisador (a), Embrapa Gado de Leite. e-mail: joao.panetto@embrapa.br, marcos.vb.silva@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br, marco.machado@embrapa.br

¹⁰ Bolsista de Produtividade do CNPq

¹¹ Orientador

Thus, the genotyping of bulls of both breeds is extremely important to ensure the viability of animals used in dairy farming and thus reduce the frequency of deleterious alleles in the herds. Brachyspina Syndrome (BS) is a lethal recessive genetic syndrome first identified in Holstein animals, which commonly causes early abortion and in rare cases stillborn calves. There are no reported cases of BS in Gir animals so far in the literature. Thus, this study aimed to genotype 774 Gir and 60 Holstein bulls for the BS gene using the multiplex PCR technique. Four Holstein bulls were found to be carriers the allelic frequency was 3.3% and the genotypic frequency was 6.6%, no Gir bulls were carrier.

Keywords: Genotyping, Allele frequency, Genetic defect, Holstein cattle

Introdução

O Gir Leiteiro é considerado a raça zebuína de maior produtividade leiteira em clima tropical, uma vez que pode produzir em média 12 kg de leite por dia (SPÍNOLA, 2016), o que justifica sua ampla utilização em programas de melhoramento genético leiteiro, principalmente no Brasil. O Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir Leiteiro, uma parceria da Embrapa e a Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro existe há 37 anos e vem analisando o perfil molecular da raça desde 2006 (PANETTO *et al.*, 2022).

Já a raça Holandesa, quando comparada com o Gir, possui uma grande capacidade de produzir leite, devido aos seus longos períodos de lactação e produção. Contudo, está mais adaptada aos climas mais frios, evidenciando um empasse para sua criação no Brasil. Para resolver este entrave, foi feito o cruzamento da raça Gir com a raça Holandesa que deu origem a raça sintética Girolando com o objetivo de obter animais com uma maior docilidade, maior resistência a endo e ectoparasitas e melhor adaptação ao clima tropical.

Por conseguinte, a identificação de genes que estejam relacionados com doenças como a Brachyspina (BS) nos touros é de extrema importância para evitar a disseminação da doença e perdas econômicas. Esta doença é uma síndrome genética recessiva letal identificada em animais da raça Holandesa, que comumente causa aborto precoce e em casos raros bezerras natimortos (FANG *et al.*, 2013). As maiorias dos casos já reportados desta anomalia genética estão relacionadas ao touro americano Sweet Haven Tradition, contudo um estudo canadense sugere um ancestral ainda mais remoto (AGERHOLM *et al.*, 2010; CHARLIER *et al.*, 2012).

O primeiro caso de BS foi reportado em 2006 na Dinamarca (AGERHOLM *et al.*, 2006), com subsequentes relatos na Itália (TESTONI *et al.*, 2008), Canadá (AGERHOLM *et al.*, 2010), Alemanha (BUCK *et al.*, 2010), Holanda (CHARLIER *et al.*, 2012), China (FANG *et al.*, 2013) e Uruguai (FEDERICI RODRIGUEZ *et al.*, 2021), sendo que como já mencionado, o caso relatado por AGERHOLM *et al.* (2010) sugere um ancestral mais remoto, o touro canadense Round Oak Rag Apple Elevation, pai do touro americano Sweet Haven Tradition (LI *et al.*, 2016). A identificação de animais portadores é fundamental, uma vez que o diagnóstico preciso é difícil devido à sua semelhança clínica com outras doenças, como o Complexo da Malformação Vertebral - CVM (AGERHOLM *et al.*, 2010), reforçando a necessidade de testes clínicos e genotipagem para correta identificação.

O mecanismo genético da Brachyspina é a deleção de 3.329 pares de bases no gene Fanconi Anemia Complementation Group 1 (FANCI) no cromossomo BTA21 que compreende aos éxons 25 a 27 (total de 37 éxons), culminando em um códon de parada prematuro localizado éxon 28 (FANG *et al.*; LI *et al.*, 2016).

A genotipagem por PCR para BS apresentada por LI *et al.* (2016) é uma técnica simples,

econômica e eficaz. Consiste em uma reação da polimerase em cadeia (PCR) do tipo multiplex, onde são utilizados quatro primers, sendo um par para controle da reação (gene ATP8) e outro para a identificação do alelo mutante (gene FANCI). A genotipagem e a identificação de animais portadores de BS é de extrema importância, uma vez que determinados animais podem ser selecionados para programas de melhoramento genético, desde que não acasalem entre si. Isto posto, o presente trabalho teve como objetivo identificar touros portadores da BS da raça Gir Leiteiro e touros da raça Holandesa presentes no Banco de DNA de Bovinos Leiteiros da Embrapa Gado de Leite.

Material e Métodos

Foram utilizados 774 touros da raça Gir e 60 touros da raça Holandesa, integrantes do Banco de DNA de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite. A genotipagem foi feita utilizando a técnica de PCR multiplex. Em 20 µL de PCR, foram adicionados 80 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Promega, Fitchburg, EUA), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,6 uM de cada primer, sendo Brachyspina F e R para identificação do alelo recessivo e MT F e R para controle da reação (gene ATP8) e, por fim, 1 U de GoTaq Polimerase (Promega). As sequências 5' - 3' dos primers utilizados foram: Brachyspina F (GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG), Brachyspina R (ATAAATAAATAAGCAGGATGCTGAAA), MT F (TAAGTTAGAGATTGAGAGCC) e MT R (GATAAGGGTTACGAGAGGGA) (LI *et al.*, 2016).

As amostras foram termocicladas a uma temperatura de 94°C por 10 min, seguida de 10 ciclos de 30 seg de desnaturação a 95°C, 30 seg de ligação a 65°C, sendo que a cada ciclo 1°C foi diminuído e 30 seg de extensão a 72°C, seguidos de mais 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg. Por fim a reação permaneceu a 72°C por 7 min para extensão final e então a 4°C até a aplicação no gel.

Os produtos da reação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por 30 min em solução de brometo de etídio 0,3%. Foram aplicados 10 µL da PCR de cada amostra e 10 µL do DNA ladder de 100 pares de base (Promega, Madison, EUA). A corrida foi feita a 100 volts por 2 h e 30 min.

Para animais normais, são esperados dois fragmentos sendo um de 3.738 pb e outro de 269 pb. Para portadores são esperados três fragmentos, sendo um de 3.738 pb, um de 409 pb e outro de 269 pb. Para animais homocigotos recessivos são esperados dois fragmentos, sendo um de 409 pb e outro de 269 pb. É importante ressaltar que o fragmento de 3.738 pb é de difícil amplificação e nem sempre é observado no gel, justificando a necessidade de um primer controle (MT) para a confirmação do funcionamento da reação de PCR.

Resultados e Discussão

Dos 774 touros da raça Gir genotipados, nenhum foi portador do alelo para BS. Contudo, dos 60 touros da raça Holandesa genotipados, foram encontrados 4 touros portadores (Figura 1). As frequências alélicas e genotípicas encontradas na amostra dos animais genotipados da raça Holandês foram, respectivamente, de 3,33% e 6,66%. A amostragem desse estudo para touros desta raça foi pequena, mas nossos resultados estão de acordo com resultados de dois estudos anteriores, em que a frequência alélica encontrada para touros da raça Holandesa foi de 2% em 206 animais (FANG *et al.*, 2013) e de 2% em 78 animais (LI *et al.*, 2016).

Os achados do gene para BS nos 4 touros da raça Holandês podem ser explicados pelo fato de que a mutação geradora da síndrome da Brachyspina ocorreu no touro canadense

da raça Holandês Round Oak Rag Apple Elevation, cujo sêmen foi largamente utilizado nos programas de melhoramento genético ao redor do mundo (LI *et al.*, 2016). A genotipagem dos touros de ambas as raças é de extrema importância, uma vez que essas são utilizadas para cruzamentos visando a obtenção da raça Girolando, amplamente utilizada na pecuária leiteira brasileira.

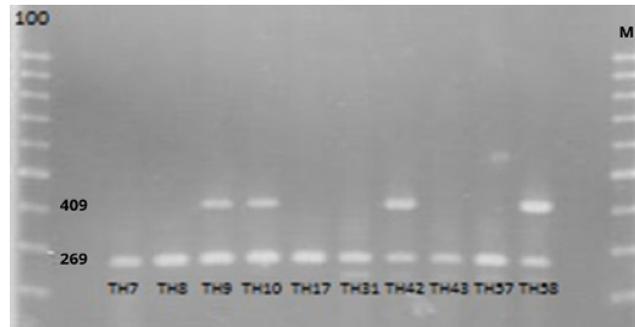


Figura 1. PCR multiplex para os genes FANCI e ATP8 em touros da raça Holandesa do Banco de DNA de Bovinos Leiteiros da Embrapa Gado de Leite. Os touros TH9, TH10, TH42 e TH58 são portadores para Brachyspina, apresentando os fragmentos de 269 e 409 pares de base, sendo que o último encontra-se presente apenas nos portadores. O DNA ladder de 100 pb (Promega, Madison, EUA) foi utilizado nas extremidades.

Conclusões

Foram identificados 4 touros da raça Holandesa portadores da síndrome de Brachyspina e nenhum da raça Gir. Nossos resultados estão em acordo com outros trabalhos com animais da raça Holandesa.

É de suma importância genotipar touros para doenças genéticas a fim de evitar a disseminação de uma doença dentro de uma ou mais raças. Nos casos em que o alelo mutante já está disseminado, é importante fazer a genotipagem para orientar os cruzamentos.

Referências

AGERHOLM, J. S., HICKS, B., FREDHOLM, M. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 12, p. 1349-1350, 2010.

AGERHOLM, J. S., MCEVOY, F., ARNBJERG, J. Brachyspina syndrome in a Holstein calf. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 418-422, 2006. doi: 10.1177/104063870601800421.

CHARLIER, C. C., AGERHOLM, J. S., COPPIETERS, W., KARLSKOV-MORTENSEN, P., LI, W., DE JONG, G., FASQUELLE, C., KARIM, L., CIRERA, S., CAMBISANO, N., AHARIZ, N., MULLAART, E., GEORGES, M., FREDHOLM, M. **A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina**. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0043085.

FANG, L., LI, Y., ZHANG, Y., SUN, D., LIU, L., ZHANG, Y., ZHANG S. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 4, p. 508-510, 2013. doi: 10.1177/1040638713488387.

LANCE RURAL. **Gir Leiteiro é o zebuino com maior produtividade leiteira**. Disponível em: <<https://www.lancerural.com.br/gir-leiteiro-e-o-zebuino-com-maior-produtividade-leiteira/>>. Acessado em: 27 Jul. 2022.

LI, Y., ZHAI, L., FANG, L., ZHANG, S., LIU, L., ZHU, Y., XUE, J., XIAOQING, L., QIAO, L., SUN, D. A novel multiplex polymerase chain reaction method for the identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. **Journal of Veterinary. Science & Medical Diagnosis**, v. 5, n. 3, 2016. doi: 10.4172/2325-9590.1000200

PANETTO, J. C. C., SILVA, M. V. G. B., VERNEQUE, R. Da S, MACHADO, M. A., FERNANDES, A. R., MACHADO, C. H. C., MARTINS, M. F., FAZA, D. R. L. R., BORGES, C. A. V., OLIVEIRA, J. C., VENTURA, H. T., PEREIRA, M. A., GARCIA, A. O., LEANDRO, F. D. Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro - **Sumário Brasileiro de Touros - 5ª Avaliação Genômica de Touros - Resultado do Teste de Progênie**. 2022.

RODRIGUEZ, M. T. F; ARTIGAS R.; GUERRA S.; SICA B. A; VÁZQUEZ N.; NICOLINI P.; QUINTELA F. D.; LLAMBÍ S. Detection of the Brachyspina mutation in Uruguayan Holstein cows using real time PCR and melting curve analysis. **Ciência Rural**, v. 51, 2021. doi: 10.1590/0103-8478cr20200872.