

Identificação de portadores das síndromes *Brachyspina* e Deficiência do Fator XI em touros da raça Girolando

Ariany Lacerda Nogueira^(1,2), Raíssa Cury Ferreira^(1,3), Lidiane Loeffler Lima^(1,4), Rafaella Lima Oliveira de Magalhães^(1,5), Clarissa Vidal de Carvalho^(1,5), Nicole Tafnes de Brito Silva Honório^(1,5), Hyago Passe Pereira⁽⁷⁾, Robert Domingues⁽⁷⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁸⁾, João Cláudio do Carmo Panetto⁽⁹⁾, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva⁽⁹⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁹⁾, Marco Antonio Machado^(9,10)

⁽¹⁾Bolsista Pibic CNPq, ⁽²⁾Graduanda em Medicina Veterinária - UFJF, Juiz de Fora, MG. E-mail: ariany.lacerda@icb.ufjf.br, ⁽³⁾Graduanda em Biomedicina - Universidade Presidente Antônio Carlos/UNIPAC, Juiz de Fora, MG. E-mail: raissacuryferreira08@gmail.com, ⁽⁴⁾Graduanda em Biomedicina - Centro Universitário do Sudeste Mineiro/UNICSUM, Juiz de Fora, MG. E-mail: lidianeloefflerlima@gmail.com, ⁽⁵⁾Graduanda em Ciências Biológicas - UFJF, Juiz de Fora, MG. E-mail: rafaella.magalhaes1234@gmail.com, clarissavidal4@gmail.com, nicole.honorio@estudante.ufjf.br, ⁽⁶⁾Doutorando em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia) - UFJF, Juiz de Fora, MG. E-mail: hyago9295@gmail.com, ⁽⁷⁾Analista, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: robert.domingues@embrapa.br ⁽⁸⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: danielle.reis@embrapa.br, ⁽⁹⁾Pesquisador (a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Email: marco.machado@embrapa.br, ⁽¹⁰⁾Orientador

Resumo- A raça Girolando é a que mais cresce no Brasil em produção de leite e venda de sêmen. Desta forma, torna-se necessária a identificação de touros portadores de anomalias, como a síndrome da *Brachyspina* e a deficiência do Fator XI, a fim de evitar disseminação de doenças e perdas econômicas. A *Brachyspina* é uma síndrome genética recessiva letal identificada, primeiramente, em animais da raça Holandesa que comumente causa aborto precoce e, em casos raros, bezerros natimortos. A deficiência do fator XI caracteriza-se por ser uma doença hereditária autossômica recessiva, que compromete a coagulação sanguínea. Este estudo objetivou genotipar 698 touros da raça Girolando para ambas as doenças, dos quais 34 foram portadores do gene da *Brachyspina*, com frequência alélica e genotípica de 2,4% e 4,8% respectivamente. Nenhum touro foi portador do alelo mutante para a deficiência do fator XI.

Termos para indexação: Girolando, genotipagem, mutações.

Identification of *Brachyspina* syndrome and Factor XI deficiency carriers in Girolando bulls

Abstract- The Girolando breed is the fastest one growing in Brazil in terms of milk production and bull semen commercialization. Therefore, it is necessary to identify bulls with anomalies such as *Brachyspina* syndrome and Factor XI deficiency, in order to avoid the spread of diseases and economic losses. *Brachyspina* is a lethal recessive genetic syndrome first identified in Holstein animals, which commonly causes early abortion and in rare cases stillborn calves. Factor XI deficiency is characterized as an autosomal recessive hereditary disease that compromises blood clotting. This study aimed to genotype 698 Girolando bulls for both diseases, of which 34 carried the *Brachyspina* gene, with an allelic and genotypic frequency of 2.4% and 4.8% respectively. No bulls carried the mutant allele for factor XI deficiency.

Index terms: Girolando, genotyping, mutations.

Introdução

A raça Girolando foi criada em 1978 por meio do programa PROCRUZA, implantado pelo Ministério da Agricultura, visando a obtenção de uma raça bovina que fosse adaptada ao clima tropical, ou seja, com a rusticidade que a raça zebuína Gir oferece e com a alta produção de leite oferecida pela raça Holandesa (Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, 2023). No que tange à produção de sêmen pelos touros e à produção de leite pelas vacas, a raça Girolando é a que mais cresce no Brasil, sendo que 80% do leite produzido no país é proveniente desta raça (Silva et al., 2022).

A Brachyspina é uma anormalidade genética letal descoberta em animais da raça Holandesa. Seu mecanismo genético consiste na deleção de 3.329 pares de bases no gene *Fanconi Anemia Complementation Group 1* (FANCI) no cromossomo bovino 21, responsável pela codificação de uma proteína com papel fundamental nos processos de reparação do DNA (Rodriguez et al., 2021). Esta deleção compreende os éxons 25 a 27 (total de 37 éxons), culminando em um códon de parada prematuro localizado no éxon 28 (Fang et al., 2013; Li et al., 2016). É uma doença autossômica homocigota recessiva e seu primeiro caso descrito foi em 2006, na Dinamarca (Agerholm et al., 2010). Esta síndrome é caracterizada pela ocorrência de abortos precoces e de bezerros natimortos após uma gestação normal ou ligeiramente prolongada (Fang et al., 2013). A maioria dos casos já reportados desta anomalia genética estão relacionados ao touro americano Sweet Haven Tradition, contudo um estudo canadense sugere um ancestral ainda mais remoto, o touro Round Oak Rag Apple Elevation (Agerholm et al., 2010; Charlier et al., 2012), reafirmando a problemática mundial desta doença.

A deficiência do Fator XI caracteriza-se por uma doença hereditária autossômica recessiva que acomete animais da raça Holandesa (Meydan et al., 2009). O Fator XI participa dos estágios iniciais da via intrínseca da cascata de coagulação, desta forma, os animais afetados apresentarão sinais clínicos relacionados com hemorragias e sangramentos intensos (Gentry; Black, 1980). Os animais heterocigotos para esta doença podem apresentar sinais clínicos diversos e diferentes graus de redução na atividade do Fator XI, podendo viver anos sem apresentar indícios da anomalia, enquanto os homocigotos recessivos apresentam uma clínica demarcada e são mais fáceis de identificar (Meydan et al., 2009). A mutação consiste na inserção de um fragmento de 76 pares de base no éxon 12 do cromossomo bovino 27 no gene FXI, o que resulta em um códon de parada precoce, impedindo a maturação da proteína (Marron et al., 2004).

Em 2022, a Embrapa Gado de Leite genotipou 774 touros da raça Gir, dos quais nenhum foi portador, e 60 da raça Holandesa, dos quais quatro foram portadores para o gene da Brachyspina, com frequência alélica e genotípica respectivamente de 3,33% e 6,66% (Nogueira et al., 2022). Estes mesmos animais foram genotipados também para a deficiência do Fator XI, dos quais nenhum foi positivo (Jens et al., 2022). O principal impacto dessas mutações está relacionado com a fertilidade e a saúde animal, gerando perdas econômicas significativas.

Verificamos a necessidade de genotipar touros Girolando e identificar os touros portadores, visto que um dos métodos mais eficientes para controlar essas doenças genéticas é o acasalamento seletivo e a triagem de touros jovens (Fang et al., 2013).

Dessa forma, o presente estudo objetivou genotipar 698 touros da raça Girolando para ambas as doenças, Brachyspina e deficiência do fator XI Assim, os resultados obtidos e expostos a seguir vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 2: “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos; ODS 12: “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

Foram utilizados, ao todo, 698 touros da raça Girolando, incluindo aqueles integrantes do Programa de Melhoramento Genético do Girolando, que integram o Banco de DNA de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite.

Para a genotipagem de Brachyspina foi realizada a técnica de PCR *multiplex* sendo que as sequências 5' - 3' dos *primers* utilizados foram: Brachyspina F (GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG), Brachyspina R (ATAAATAAATAAAGCAGGATGC TGAAA), MT F (TAAGTTAGAGATTGAGAGCC) e MT R (GATAAGGGTTACGAGAGGGA) (Li et al., 2016). Em 20 µL de reação, foram adicionados 80 ng de DNA, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,6 µM 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, tampão de PCR 1X e 1 U de GoTaq Polimerase (Promega, Fitchburg, EUA). As amostras foram termocicladas a uma temperatura de 94 °C por 10 minutos, seguida de 10 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de ligação a 65 °C, sendo que a cada ciclo 1 °C foi diminuído e 30 segundos de extensão a 72 °C, seguidos de mais 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, ligação a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Já para a genotipagem da deficiência do Fator XI foi realizada a técnica de PCR usando os primers FXID F 5'-CCCCTGGCTAGGAATCGTT-3' e FXID R 5'-CAAGGCAATGTCATATCCAC-3' (Meydan et al., 2010). Foram adicionados 100 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, tampão de PCR 1X e 0,5 U de GoTaq Polimerase (Promega, Fitchburg, EUA). As amostras foram termocicladas a uma temperatura de 94 °C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 60 segundos de ligação a 55 °C e 30 segundos de extensão a 72 °C. A extensão final foi feita a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da reação de PCR de ambas as anomalias foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por 30 minutos 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 horas e 30 minutos.

Com relação à Brachyspina, o padrão de fragmentos esperados para animais normais são dois fragmentos sendo um de 3.738 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. Para a deficiência do Fator XI o padrão de fragmentos esperados para animais normais é um fragmento de 244 pb. Para portadores são esperados dois fragmentos, sendo um de 320 pb e outro de 244 pb. Para animais homozigotos recessivos espera-se apenas um fragmento de 320 pb.

Resultados e discussão

Dos 698 touros da raça Girolando genotipados, nenhum animal foi portador da deficiência do Fator XI, contudo 34 foram portadores do gene da Brachyspina (Figuras 1 e 2). As frequências alélicas e genotípicas encontradas foram, respectivamente, de 2,4% e 4,8%. A presença de portadores na raça Girolando pode ser explicada pelo fato de que a mutação geradora da síndrome da Brachyspina ocorreu no touro canadense da raça Holandesa Round Oak Rag Apple Elevation, cujo sêmen foi largamente utilizado nos programas de melhoramento genético ao redor do mundo (Fang et al., 2013), inclusive naqueles de touros da raça Girolando. Não foi encontrado na literatura outro estudo que estime as frequências alélica e genotípica dessas doenças, síndrome da Brachyspina e deficiência do Fator XI, na raça Girolando.

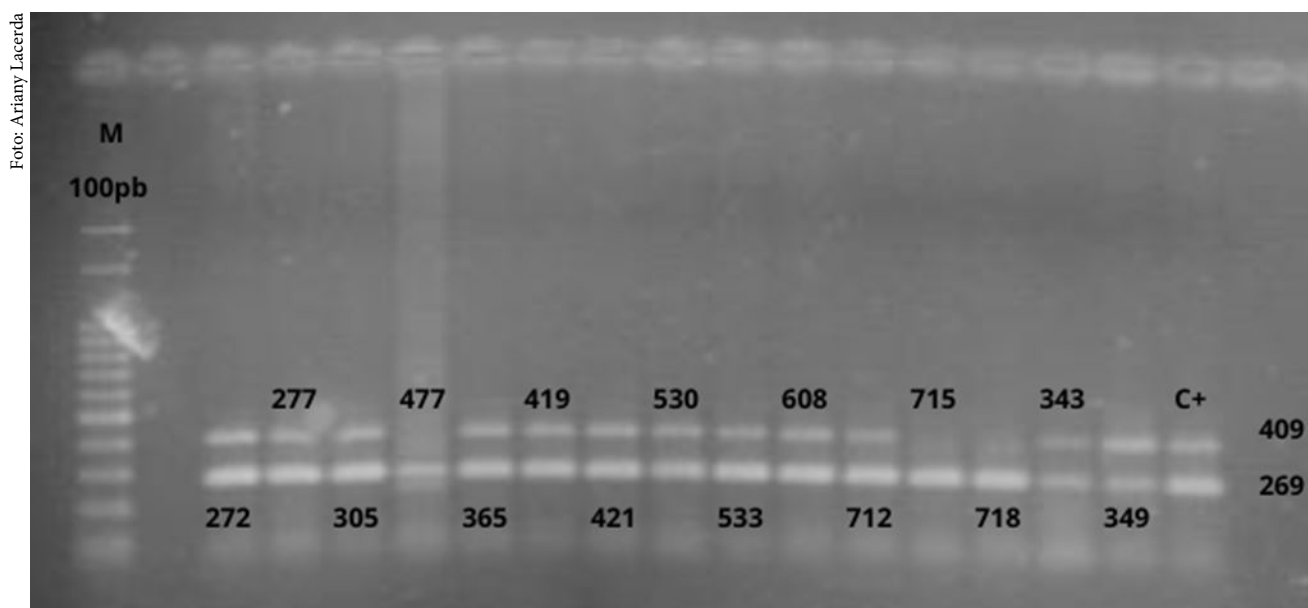


Figura 1. Foto de gel de agarose 1,5% mostrando os animais portadores para o gene da Brachyspina. Os touros GLTGH 272, 277, 305, 419, 421, 530, 533, 608, 712, 343 e 349 são portadores do gene da Brachyspina, apresentando os fragmentos de 269 e 409 pares de base, sendo que o último encontra-se presente apenas nos portadores. M: padrão DNA ladder de 100 pb.

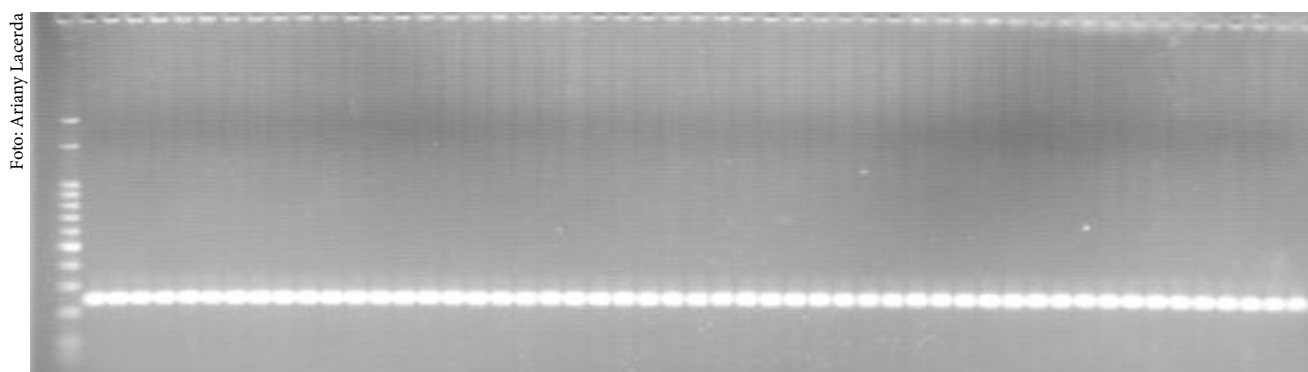


Figura 2. Foto de gel de agarose 1,5% mostrando o resultado da genotipagem para a deficiência do Fator XI. Nenhum animal genotipado foi portador da deficiência do Fator XI. O DNA ladder de 100 pb foi utilizado na extremidade esquerda.

Conclusões

As técnicas de PCR utilizadas foram eficientes para a genotipagem dos touros Girolando para a síndrome da Brachyspina e para a deficiência do Fator XI. A genotipagem dos touros é de extrema importância, para que a orientação dos cruzamentos possa ser feita de forma a eliminar aqueles portadores do gene da Brachyspina, visando diminuição e possível erradicação do alelo mutante nos rebanhos da raça Girolando no Brasil e no mundo.

Agradecimento

Ao ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil. Trabalho realizado com o apoio financeiro da Embrapa, integrante 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”.

Referências

AGERHOLM, J. S.; DELAY, J.; 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.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE GIROLANDO. Uberaba, 2023. Disponível em: <https://www.girolando.com.br/girolando/sobre-a-raca>. Acesso em: 27 fev. 2023.

CHARLIER, 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, M.; FREDHOLM, M. A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43085, 2012. DOI: <https://doi.org/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: <https://doi.org/10.1177/1040638713488387>.

GENTRY, P. A.; BLACK, W. D. Prevalence and inheritance of factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 616-620, 1980. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(80\)82980-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(80)82980-8).

JENS, S. M.; NOGUEIRA, A. L.; MAGALHÃES, R. L. O. de; FRACETTI, M. E. M.; PEREIRA, H. P.; DOMINGUES, R.; REIS, D. R. de L.; PANETTO, J. C. do C.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; MARTINS, M. F. Identificação de portadores da deficiência do Fator XI em touros das Raças Gir e Holandesa. In: WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE PIBIC/CNPQ, 26., 2022, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. p. 71-74.

LI, Y.; ZHAI, L.; FANG, L.; ZHANG, S.; LIU, L.; ZHU, Y.; XUE, J.; XIAOQUNG, L.; QUIAO, 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: <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000200>.

MARRON, B. M.; ROBINSON, J. L.; GENTRY, P. A.; BEEVER, J. E. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. **Animal Genetics**, v. 35, n. 6, p. 454-456, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01202.x>.

MEYDAN, H.; YILDIZ, M. A.; ÖZDİL, F.; GEDIK, Y.; ÖZBEYAZ, C. Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 1, article 5, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-5>.

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 Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, article 56, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-56>.

NOGUEIRA, A. L.; MAGALHÃES, R. L. O. de; JENS, S. M.; FRACETTI, M. E. M.; PEREIRA, H. P.; DOMINGUES, R.; REIS, D. R. de L.; PANETTO, J. C. do C.; SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; MACHADO, M. A. Identificação de portadores da síndrome de Brachyspina em touros das raças Gir e Holandesa. In: WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE PIBIC/CNPQ, 26., 2022, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. p. 66-70.

RODRIGUEZ, M. T. F.; ARTIGAS, R.; GUERRA, S.; SICA, A. B.; 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, e20200872, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200872>.

SILVA, M. V. G. B.; FERREIRA JUNIOR, E.; PANETTO, J. C. do C.; PAIVA, L. de C.; MACHADO, M. A.; REIS, D. R. de L.; DALTRO, D. dos S.; NEGRI, R.; KLUSKA, S.; MARTINS, M. F.; BORGES, C. A. V. (ed.). **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando - sumário de touros - resultado do teste de progênie (avaliação genética/genômica) - junho 2022**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. 125 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 266).