Diagnóstico molecular da doença hereditária **BLAD** em bovinos da raça Girolando

Daisyléa de Souza Paiva, Larissa Helena da Rocha Meira, Isabela Fonseca, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Raquel Marinho Alvino, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva, Marta Fonseca Martins Guimarães

Resumo

Dentre as doenças hereditárias que foram mais estudadas em animais de produção, temos a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina, conhecida como BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*), que é causada por uma mutação pontual recessiva no gene *CD18*. Animais homocigotos para o alelo mutante desenvolvem a doença e morrem ainda novos com pneumonia, crescimento atrofiado, perda de dentes e comprometimento do sistema imune. Para identificar a presença de animais portadores pode ser utilizada a técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Empregando essa técnica foram genotipadas 187 vacas filhas dos touros pertencentes ao teste de progênie da Raça Girolando para BLAD. A visualização dos genótipos foi realizada após a digestão com as enzimas de restrição Hae III e Taq I. A frequência dos animais portadores foi de 5% para esse gene. Os resultados permitiram concluir que a população se encontra estatisticamente em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Palavras-chave: BLAD, gene *CD18*, melhoramento animal, PCR-RFLP

Molecular diagnosis of hereditary disease **BLAD** in Girolando cattle

Abstract

Among the hereditary diseases that were widely studied in production cattle, there is Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, known as BLAD that is caused by a recessive mutation in the *CD18* gene. Animals homozygous for the mutant allele develop disease and die with pneumonia, stunted growth, loss of teeth and impaired immune system. In order to identify carriers for this disease, it can be used PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) technique. Using this technique were genotyped 187 cows sons of bulls belonging to the progeny test for BLAD. Visualization of genotypes was performed after digestion with restriction enzymes Hae III and Taq I. The frequency of carriers was 5% for this gene. The results showed that the population is Hardy-Weinberg equilibrium for BLAD.

Keywords: animal breeding, BLAD, *CD18* gene, PCR-RFLP

Introdução

Das doenças hereditárias que foram mais estudadas em animais de produção, temos a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina, conhecida como BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*). Esta é causada por uma mutação pontual recessiva no gene *CD18*. Animais homocigotos para o alelo mutante desenvolvem a doença e morrem ainda novos com pneumonia, crescimento atrofiado, perda de dentes e comprometimento do sistema imune. No entanto, os animais heterocigotos desenvolvem-se normalmente e ainda estão relacionados com aumento na produção de leite e porcentagem de gordura e proteína. (SHUSTER et al., 1992). Os sintomas ocorrem devido à deficiência de uma família de proteínas da superfície dos leucócitos, responsáveis pelo movimento dos mesmos na corrente sanguínea (NASREEN et al, 2009).

O touro Holandês *Osborndale Ivanhoe* foi apontado como o principal disseminador do alelo *BLAD* para vários rebanhos. Este touro e seus descendentes (Penstate Ivanhow Star - filho e Carlin M Ivanhoe Bell - neto) foram amplamente utilizados em programas de inseminação artificial em todo o mundo, principalmente nos EUA, devido ao elevado mérito genético para produção de leite destes animais. Eles são apontados como responsáveis por disseminar o alelo *BLAD* para diversos rebanhos no mundo todo (Riojas-Valdés et al., 2009; Shuster et al., 1992).

A identificação dos animais portadores pode ser feita por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polimorfism*) (SCHWENGER, 1993). Após a amplificação da região específica no gene, os alelos são diferenciados por meio da digestão do produto com enzimas de restrição (REZAAE et al., 2009).

Determinar o genótipo de touros para doenças é importante, pois, à medida que o criador tem informações dos touros e das vacas que são portadores dos alelos indesejáveis, poderá tomar decisões de descarte e de estratégias de acasalamentos. Da mesma forma, identificar esses animais na população é uma estratégia para diminuir a frequência dos alelos desfavoráveis no rebanho e, conseqüentemente, reduzir a incidência das doenças hereditárias em bovinos utilizados no Teste de Progênie (TP).

Neste contexto, o objetivo do trabalho é estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *CD18* e verificar se a população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em animais da raça Girolando participantes do Teste de Progênie da raça.

Material e Métodos

Foram genotipados 187 vacas Girolando filhas de touros pertencentes ao Teste de Progênie da raça coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. O DNA foi extraído das células do sêmen desses animais utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop®, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Para a amplificação da região de interesse dos gene *CD18* foram utilizados *primers* já descritos (Shuster et al., 1992). Para cada par de *primer*, as condições da PCR foram otimizadas. O genótipo foi estabelecido após a digestão dos produtos da PCR utilizando-se a enzima de restrição *Taq I* e *Hae III* para o gene *CD18*. Todas as reações foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para estabelecimento dos genótipos para *BLAD*, o produto digerido foi observado em gel de agarose 3%. Os animais portadores apresentam o padrão de 58, 32 e 26 pb para *Taq I* e 49, 30, 19 e 9 pb para *Hae III*. Já os animais normais apresentam o padrão de 32 e 26 para *Taq I* e 49 e 9 pb para *Hae III*. As análises de frequências gênicas e genotípicas e o teste de probabilidade de EHW foram estimados pelo programa *GENEPOP web version 3.4* (RAYMOND E ROUSSET, 1995). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 e nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 descreve as frequências gênicas, genotípicas e o EHW para os genes *CD18* na população estudada. As frequências alélicas diferiram muito entre si, sendo 2% para o alelo letal e 98% para o alelo normal. Além disso, observou-se uma baixa frequência de portadores (5%). Essa frequência está diferente daquelas relatadas na literatura por Akyüz et al. (2010) na Turquia (2,20%) e por Riojas-Valvéz (2009) no México (0%). No entanto, estão em concordância com os resultados de Ribeiro et al. (2000) no Brasil, onde a frequência de heterozigotos foi de 5,7%.

A alta frequência de portadores entre vacas Girolando pode ser explicada devido ao fato de essa mutação ser frequente em touros da raça Holandesa no mundo todo. Pelo fato de a raça Holandesa compor a raça Girolando, a utilização de sêmen de touros afetados pode ter sido a causa do aparecimento da mutação nesta raça.

De acordo com a análise estatística, as frequências encontradas estão semelhantes às esperadas. Sendo assim, estatisticamente, a população se encontra em EHW. Pelo fato de ter sido genotipado um pequeno número de animais, e por haver uma tentativa de diminuição da frequência do alelo letal em touros Holandês, o alelo normal está fixando-se na população. Isso faz com que no teste de EHW a população estudada esteja em equilíbrio, apesar de estar havendo seleção.

Tabela 1. Frequências genotípicas, gênicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW*
	Esperado	Observado	Genotípica	Gênica	
TL ¹	178,09	178,00	0,98 (T)	0,95	0
BL ²	8,80	9,00	0,02 (B)	0,05	

* = $P < (0,05)$. ¹Homozigoto não portador do alelo para BLAD, ²Heterozigoto para o Alelo BLAD.

Conclusões

Foi constatado que a população estudada encontra-se em EHW. No entanto, esses resultados são preliminares, sendo, necessário um estudo com maior número de animais, para estimar a frequência dos alelos letais na população e traçar estratégias para a sua diminuição na raça.

Referências

- AKÜZ, B.; ERTUĞRUL, O, OĞAOĞLU, Ö. K. Detection of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Allele in Holstein Cows Reared in Kayseri Vicinity. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v.16, n. 2, p. 519-521, 2010.
- NASREEN, F.; MALIK, N.A.; RIAZ, M.N. et al. Detection and screening of bovine leukocyte adhesion deficiency in Pakistan using molecular methods. **Hereditas**, v.146, p.74-78, 2009.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249. 1995.
- 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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 831-834, 2000.
- RIOJAS-VALDÉZ, V.M.; CARBALLO-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-TROVAR, L.E.; GARZA-ZERMEÑO, M.V.; RAMÍREZ-ROMERO, R.; ZÁRATE-RAMOS, J.; ÁVALOS-RAMÍREZ, R.; DÁVALOS-ARANDA, G. Absence of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein Cattle from Mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.9, p.1870-1872, 2009.
- SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN JR., M.R. et al. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.89, p.9225-9229, 1992.