

## XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG - 05 de março de 2020

### Identificação de vacas da raça Holandesa portadoras de alelo recessivo das doenças genéticas CVM, BLAD e DUMPS e genotipagem para $\beta$ -caseína<sup>1</sup>

Andreza Soares Alves<sup>2,3</sup>, Rosiana Angélica Campos<sup>2,3</sup>, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf<sup>2,4</sup>, Hyago Passe Pereira<sup>5</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>6</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza<sup>7</sup>, Alessandro de Sá Guimarães<sup>8</sup>, Marco Antonio Machado<sup>8,9</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>8,9,10</sup>

<sup>1</sup> O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Embrapa.

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Graduanda em Farmácia - Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde/JF

<sup>4</sup> Graduando em Ciências Biológicas - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora.

<sup>5</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/UFJF. Bolsista UFJF.

<sup>6</sup> Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial - CNPq/ Embrapa.

<sup>7</sup> Analista Embrapa Gado de Leite.

<sup>8</sup> Pesquisador (a) Embrapa Gado de Leite.

<sup>9</sup> Bolsista de Produtividade CNPq.

<sup>10</sup> Orientadora- e-mail: [marta.martins@embrapa.br](mailto:marta.martins@embrapa.br)

**Resumo:** O Sistema *Compost Barn* “Vacac e Pessoas Felizes” será implantado no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite e como uma das etapas de seleção dos animais que comporão o Sistema foi incluída a genotipagem para doenças hereditárias e para o gene da  $\beta$ -caseína. Desta forma, o objetivo deste estudo foi à identificação de vacas da raça Holandesa portadoras de alelos recessivos para as doenças hereditárias - Deficiência da Adesão Leucocitária Bovina (BLAD), Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase (DUMPS) e Complexo de Má Formação Vertebral (CVM) - e genotipagem para o gene da  $\beta$ -caseína. Foram coletadas amostras de sangue das vacas do Sistema de Gado Puro da Embrapa Gado de Leite. A genotipagem dos animais foi realizada utilizando os métodos de PCR-RFLP e PCR Tempo Real. Foi identificado a presença de apenas de 7 animais portadores do alelo de CVM e nenhum portador dos alelos para as demais doenças genéticas assim como, foi identificado 55 vacas A2A2 para o gene da  $\beta$ -caseína. A identificação de animais portadores de alelos relacionados com doenças hereditárias em bovinos é muito importante, pois permiti diminuir a frequência desses alelos na população, principalmente em animais da raça Holandesa, onde a mutação foi identificada e disseminada a nível mundial. Assim como, o conhecimento da variabilidade genética de bovinos para o gene  $\beta$ -caseína é de grande importância, pois, esse gene tem sido relacionado com alergia, risco coronário e outras doenças na espécie humana.

**Palavras-chave:** Raça Holandesa, PCR-RFLP, Leite, PCR em Tempo Real, Doenças genéticas

### Identification of Holstein cows with recessive allele of CVM, BLAD and DUMPS genetic diseases and genotyping for $\beta$ -casein<sup>1</sup>

**Abstract:** The Compost Barn System “Vacac e Pessoas Felizes” will be implemented at the José Henrique Bruschi Experimental Field at Embrapa Gado de Leite and as one of the stages for selecting the animals that will compose the System, genotyping for hereditary diseases and the beta- casein. Thus, the objective of this study was to identify Holstein cows with recessive alleles for hereditary diseases - Deficiency of Bovine Leukocyte Adhesion (BLAD), Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) and Complex Vertebral Malformation (CVM) - and genotyping for the  $\beta$ -casein gene. Blood samples were collected from cows in Embrapa Gado de Leite Pure Cattle System. The genotyping of the animals was performed using the PCR-RFLP and Real Time PCR methods. The presence of only 7 animals with the CVM allele was identified and no carriers of the alleles for the

## XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG - 05 de março de 2020

other genetic diseases were identified, as well as 55 A2A2 cows for the  $\beta$ -casein gene. The identification of animals with alleles related to hereditary diseases in cattle is very important, as it has allowed decreasing the frequency of these alleles in the population, mainly in Holstein animals, where the mutation has been identified and disseminated worldwide. Likewise, the knowledge of the genetic variability of cattle for the  $\beta$ -casein gene is of great importance, as this gene has been linked to allergy, coronary risk and other diseases in the human species.

**Keywords:** Holstein Cattle, PCR-RFLP, Milk, Real Time-PCR, Genetic diseases

### Introdução

A pecuária brasileira tem um importante papel na ordem econômica e social do agronegócio brasileiro, contribuindo com 23,5 % do PIB agrícola. A produção brasileira exhibe crescimento anual acima da média mundial o que garante ao Brasil a quarta posição no ranking dentre os países produtores de leite (IBGE 2017). Apesar de esse setor criar oportunidades de crescimento, também gera desafios, devido sua extensão e condições ambientais variáveis as quais os sistemas de produção estão submetidos. Em meados da década de 1980, o sistema de confinamento *Compost Barn* foi criado pelos norte americanos com o intuito de melhorar o desempenho dos animais produtores de leite. Porém, somente em 2001 esse tipo de sistema começou a ganhar adeptos em maior escala. Esse tipo de instalação usada para vacas leiteiras tem forte influência nos resultados de produtividade e sanidade do rebanho, bem como sobre a qualidade do leite obtido. Vários fatores devem ser considerados ao planejar as instalações, visando principalmente à obtenção de conforto térmico, espaço físico adequado, tipo de piso e também o conhecimento do perfil genético dos animais que irão participar deste tipo de confinamento a fim de se obter os melhores resultados (IEPEC, 2014).

O Sistema *Compost Barn* “Vacac e Pessoas Felizes” está sendo implantado no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite e como uma das etapas de seleção dos animais que comporão o Sistema foi incluída a genotipagem para doenças hereditárias Deficiência da Uridina Monofosfato Sintase (DUMPS), Complexo de Má Formação Vertebral (CVM) e Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina (BLAD) e para o gene da  $\beta$ -caseína.

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, os embriões homozigotos para o alelo mutante morrem por volta de quarenta dias (Thomsen et al., 2006). Já a CVM é caracterizada por uma doença hereditária recessiva que ocorre durante o desenvolvimento fetal, os homozigotos para o alelo mutante são abortados. É uma mutação pontual no nucleotídeo 559 do gene *SLC35A3*, 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, a BLAD é causada por mutação que 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). Animais homozigotos para o alelo mutante desenvolvem a doença e morrem ainda novos com pneumonia, crescimento atrofiado, perda de dentes e comprometimento do sistema imune. Importante ressaltar que todas essas mutações foram identificadas em touros da raça Holandesas e que devido ao uso intenso de seu sêmen a nível, o alelo foi disseminado, uma vez que esses animais tinham um alto valor genético. A  $\beta$ -caseína é uma proteína que corresponde a cerca de 25 a 35% do total de proteína do leite, e os alelos mais comuns são A1 e A2. A digestão da proteína  $\beta$ -caseína A1 no trato

**XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite**

Juiz de Fora, MG - 05 de março de 2020

gastrointestinal humano tem como um de seus produtos finais o peptídeo BCM-7 que foi relacionado a processos alérgicos, intolerância alimentar e doenças coronarianas (Lima et al., 2015).

Desta forma, o objetivo desse estudo foi identificar a presença de animais portadores de alelos das três principais doenças hereditárias autossômicas recessivas em bovinos, DUMPS, CVM e BLAD, genotipar para gene da  $\beta$ -caseína em vacas da raça Holandesa que poderão compor o sistema de confinamento do tipo *Compost Barn*.

**Material e Métodos**

Foram utilizadas 155 vacas da raça Holandesa do Sistema de Gado Puro, localizado no CEJHB da Embrapa Gado de Leite. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue, utilizando um protocolo adaptado da técnica de Sambrook e Russel (2001).

Para a amplificação do gene da  $\beta$ -caseína utilizou-se os *primers forward* para o alelo A1 e para o alelo A2 e um *primer reverse* comum para amplificar um fragmento de 244 pb do gene  $\beta$ -caseína (Ganguly, et al. 2013a ), utilizando a técnica de PCR em Tempo Real. A identificação da presença ou não dos alelos A1 e A2 nos genótipos das vacas de 155, foi dado por meio da análise da *Disassociation curve* (CD) e *Amplification Plot* (AP) do produto da PCR em Tempo Real.

As genotipagens das doenças CVM, BLAD e DUMPS foram realizadas por meio da técnica de PCR-RFLP. Para CVM, foram utilizados os *primers* descritos em Ghanem et al., 2008, já 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. Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%. Os tamanhos dos fragmentos observados no gel variaram de acordo com os alelos presentes para cada doença (Tabela 1).

**Tabela 1.** Nomenclatura dos alelos e padrões dos fragmentos digeridos (pb).

| <b>Gene</b>  | <b>Genótipos</b> | <b>Tamanho dos alelos (pb)</b> |     |    |
|--------------|------------------|--------------------------------|-----|----|
| <b>CVM</b>   | <b>TV</b>        | -                              | 395 |    |
|              | <b>CV</b>        | 395                            | 395 |    |
|              | <b>CVM</b>       | 395                            | -   |    |
| <b>BLAD</b>  | <b>TL</b>        | -                              | 32  | 26 |
|              | <b>BL</b>        | 58                             | 32  | 26 |
| <b>DUMPS</b> | <b>TD</b>        | -                              | 53  | 36 |
|              | <b>DP</b>        | 89                             | 53  | 36 |

**XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite**

Juiz de Fora, MG - 05 de março de 2020

**Resultados e Discussão**

Foram genotipadas um total de 155 vacas da raça Holandesa e calculada a frequência alélica e genotípica conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Frequência alélica e genotípica dos genes da  $\beta$ -caseína, CVM, BLAD e DUMPS.

| <b>Gene</b>                       | <b>Frequência Alélica</b> |                          | <b>Frequência Genotípica</b> |                               |                    |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------|
|                                   | <b>A1</b>                 | <b>A2</b>                | <b>A1A1</b>                  | <b>A1A2</b>                   | <b>A2A2</b>        |
| <b><math>\beta</math>-caseína</b> | 39,03%                    | 60,96%                   | 13,54%                       | 50,96%                        | 35,48%             |
| <b>CVM</b>                        | <b>G (normal)</b><br>98%  | <b>T (mutante)</b><br>2% | <b>TV (normal)</b><br>95,48% | <b>CV (portador)</b><br>4,52% | <b>CVM</b><br>0%   |
| <b>BLAD</b>                       | <b>A (normal)</b><br>100% | <b>G (mutante)</b><br>0% | <b>TL (normal)</b><br>100%   | <b>BL (portador)</b><br>0%    | <b>BLAB</b><br>0%  |
| <b>DUMPS</b>                      | <b>C (normal)</b><br>100% | <b>T (mutante)</b><br>0% | <b>TD (normal)</b><br>100%   | <b>DP (portador)</b><br>0%    | <b>DUMPS</b><br>0% |

Foi identificada a presença do alelo para doença CVM em 7 animais do total de 155 (4,5%). Ausência de animais portadores de DUMPS e BLAD. Em um estudo feito por Mendonça et al. (2015) com animais da raça Girolando, foram encontrados 17 (vacas n= 13 e touros n=4) animais portadores do alelo para CVM, de um total de 977 animais e 7 vacas portadoras para BLAD em uma população de 917 animais (vacas e touros). Em outro trabalho realizado com animais indianos da raça Holandesa também não houve nenhum portador da mutação UMPS (Patel, 2006). Rezaee (2009) em um trabalho com touros iranianos da raça Holandesa, não identificou em nenhum animal com os alelos mutantes para as três doenças. As frequências alélica e genotípica das vacas da raça Holandesas para o gene da  $\beta$ -caseína foram calculadas, no qual o alelo A1 representou frequência de 39,03% e o alelo A2, 60,96%. As frequências genotípicas estimadas para as vacas da raça Holandesas foram: 13,54% (A1A1), 50,96% (A1A2) e 35,48% (A2A2). Pereira (2016), genotipou 609 touros da raça Gir leiteiro no qual a frequência alélica do alelo A1 foi de 7,7% e 92,3% para o alelo favorável A2 e a frequência genotípica para o Gir leiteiro para A1A1, A1A2, A2A2 foram de 0,7%, 14,1% e 85,2% respectivamente.

**Conclusões**

O objetivo de genotipar vacas da raça Holandesa a fim de detectar animais portadores de alelos causadores de três principais doenças autossômicas recessivas encontradas em bovinos e para o gene da  $\beta$ -caseína foi alcançado, revelando o resultado de apenas 7 dos 155 animais portadores do alelo CVM e nenhum portador para os alelos para BLAD e DUMPS e 55 vacas A2A2.

**Agradecimentos**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

**Referências**

GANGULY, I., et al. Beta-casein (CSN2) polymorphism in Ongole (Indian Zebu) and (HF x Sahiwal cressbred) cattle. **Indian Journal of Biotechnology**. p. 195-198, 2013.

**XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite**

Juiz de Fora, MG - 05 de março de 2020

- 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.
- 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.
- HANUSOVÁ, E., et al. Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. **Slovak Journal Animal Science**, v. 43, p. 63–66, 2010.
- IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2017.
- IEPEC. **Compost Barn e a produtividade leiteira**. Disponível em: <https://iepec.com/compost-barn-e-produtividade-leiteira/> Acesso: 15 de fevereiro de 2020.
- LIMA, A.C.J.; LARA, M.A.C. Polimorfismo do gene  $\beta$ -caseína em bovinos. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**. p. 280-285, 2015.
- MAZZUCO, D., et al. Hipocalcemia em vacas leiteiras da agricultura familiar. **Ciências Animais Brasileiras**, v. 20, p. 1-10, 2019.
- MC LACHIAN, C. N. S. Beta casein A1, ischemic heart disease mortality and other illness. **MedHypotheses**, v. 56, p. 262-272, 2001.
- MENDONÇA, J. F. M., et al. **Análise das frequências alélicas e genótípicas dos genes para BLAD, DUMPS e CVM em animais da raça girolando**. 1º Congresso Internacional da raça Girolando. 2015.
- 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.
- PEREIRA, H.P. **Genotipagem de touros da raça Gir leiteiro para o gene da  $\beta$ -caseína**. Trabalho de conclusão de curso. Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF, 2016.
- 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.; 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.; 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.