

## Avaliação da presença de touros das raças Gir e Girolando portadores de Citrulinemia no Brasil

Ariany Lacerda Nogueira<sup>(1)</sup>, Lidiane Loeffler Lima<sup>(2)</sup>, Letícia Milena de Jesus<sup>(3)</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza<sup>(4)</sup>, Robert Domingues<sup>(4)</sup>, João Cláudio do Carmo Panetto<sup>(5)</sup>, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva<sup>(5)</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>(5)</sup> e Marco Antônio Machado<sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Bolsista (Pibic/CNPq.) E-mail: ariany.lacerda@icb.ufjf.br. <sup>(2)</sup>Graduanda em Biomedicina, Centro Universitário do Sudeste Mineiro, Juiz de Fora, MG. <sup>(3)</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, Centro Universitário UniAcademia, Juiz de Fora, MG. <sup>(4)</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(5)</sup>Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

**Resumo** — A Citrulinemia bovina (BC) é uma doença autossômica recessiva hereditária que se fundamenta na substituição de uma citosina por uma timina no códon 86 do gene argininosuccinato sintetase bovino (ASS) localizado no cromossomo BTA11, e foi descrita primeiramente em animais da raça Holandesa na Austrália. Animais afetados por esta anomalia genética aparentam normais após o nascimento, porém a doença evolui rapidamente entre o terceiro e quinto dia, levando a perda de visão, convulsões, marcha instável e óbito. O cruzamento de raças zebuínas, como a raça Gir, com raças taurinas, como a Holandesa, é uma prática muito comum na pecuária, a exemplo da raça Girolando. Contudo, a possibilidade da disseminação silenciosa de doenças genéticas autossômicas recessivas é grande, devido a difícil identificação eficaz de portadores. Dessa forma, a genotipagem dos animais torna-se essencial para evitar perdas econômicas, servindo como um guia para cruzamentos. O presente estudo teve como objetivo a genotipagem de 490 touros da raça Girolando e 760 touros da raça Gir para o gene da BC por meio da técnica de PCR-RFLP, com posterior digestão com a enzima Ava II. Nenhum animal apresentou-se portador de BC, corroborando os relatos da literatura da não existência de rebanhos que contenham os alelos mutantes no Brasil. Assim sendo, a identificação de touros portadores de BC torna-se indispensável para manutenção do rebanho livre do gene mutante para a anomalia genética.

Termos para indexação: citrulinemia, gir, girolando, PCR-RFLP.

### Evaluation of the presence of Gir and Girolando bulls carrying Citrullinemia in Brazil

**Abstract** — Bovine Citrullinaemia (BC) is a hereditary autosomal recessive disease based on the substitution of cytosine with thymine at codon 86 of the bovine argininosuccinate synthetase (ASS) gene located on chromosome BTA11 which was first described in Australia Holstein cattle. Animals affected by this genetic anomaly appear normal at birth, however, the disease progresses rapidly between the third and fifth day, leading to loss of vision, seizures, unsteady gait, and death. Crossbreeding indicine breeds, such as Gir, with taurine breeds, such as Holstein, is a common practice in livestock farming, exemplified by the Girolando breed. However, the possibility of silent dissemination of autosomal recessive genetic diseases is high due to the difficulty of effectively identifying carriers. Therefore, genotyping of animals is essential to avoid economic losses and to guide breeding decisions. This study aimed to genotype 490 Girolando bulls and 760 Gir bulls for the BC gene using PCR-RFLP, followed by digestion with the Ava II enzyme. No animals were found to be carriers of BC, and there are no reports in the literature of bovine herds carrying the mutant allele in Brazil. Thus, identifying BC carrier bulls is essential for maintaining a herd free from the mutant gene responsible for this genetic anomaly.

Index terms: Citrullinaemia, Gir, Girolando, PCR-RFLP.

## Introdução

A Citrulinemia Bovina é uma doença autossômica recessiva hereditária que consiste no impedimento da síntese da enzima argininosuccinato sintetase (ASS), afetando a conversão da citrulina e aspartato em argininosuccinato e foi descrita primeiramente em animais da raça Holandesa na Austrália (Meydan et al., 2010; Rathore et al., 2020). O mecanismo genético da BC fundamenta-se na substituição de uma citosina por uma timina no códon 86 do gene ASS localizado no cromossomo BTA11. Essa alteração leva à conversão do códon CGA em TGA, que é um códon de parada de síntese proteica. Como consequência dessa alteração, o peptídeo truncado resultante apresentará apenas 85 aminoácidos ao invés dos 412 presentes na sequência original, comprometendo sua atividade enzimática. Níveis elevados de citrulina no sangue e desordens neurológicas são comumente observados, visto que o ciclo da ureia não ocorrerá normalmente, permitindo um acúmulo de amônia no organismo, culminando nos sinais clínicos característicos da doença (Meydan et al., 2010; Gebreselassie et al., 2019). Animais afetados por esta anomalia genética aparentam normais após o nascimento, mas começam a apresentar sinais de depressão e param de se alimentar a partir do segundo dia de vida. A doença progride rapidamente entre o terceiro e quinto dia, fazendo com que os animais percam a visão, apresentem convulsões, marcha instável e, eventualmente, venham a óbito (Meydan et al., 2010). Acredita-se que a BC foi disseminada por meio da comercialização do sêmen do touro Holandês americano Linmack Kriss King (Meydan et al., 2010).

O cruzamento de raças zebuínas, como a raça Gir, com raças taurinas, como a Holandesa, é uma prática muito comum na pecuária, principalmente por conta da alta produtividade leiteira de vacas Holandesas. Um exemplo é a raça Girolando, criada em 1996 pelo Ministério da Agricultura no Brasil, tornando-se importante para a pecuária em países de clima tropical. Esta tornou-se a raça que mais cresce no Brasil em relação à produção e comercialização de sêmen e à produção de leite (Silva et al., 2023). Nesse sentido, a possibilidade da disseminação silenciosa de doenças genéticas autossômicas recessivas é grande, uma vez que animais heterozigotos podem permanecer sem sinais clínicos durante anos, dificultando a identificação eficaz de portadores (Gebreselassie et al., 2019). Na criação de animais, desordens genéticas são um dos principais problemas para criadores, uma vez que um defeito em um único gene, em touros reprodutores, pode levar a inúmeros descendentes afetados, influenciando significativamente na pecuária. Dessa forma, a genotipagem dos animais torna-se essencial para identificar touros e vacas portadores, servindo como um guia para cruzamentos, no sentido de evitar a disseminação dos alelos mutantes nos rebanhos e minimizar perdas econômicas. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar indivíduos portadores de Citrulinemia Bovina em grupos de animais das raças Gir e Girolando.

O conteúdo desse documento vai 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”.

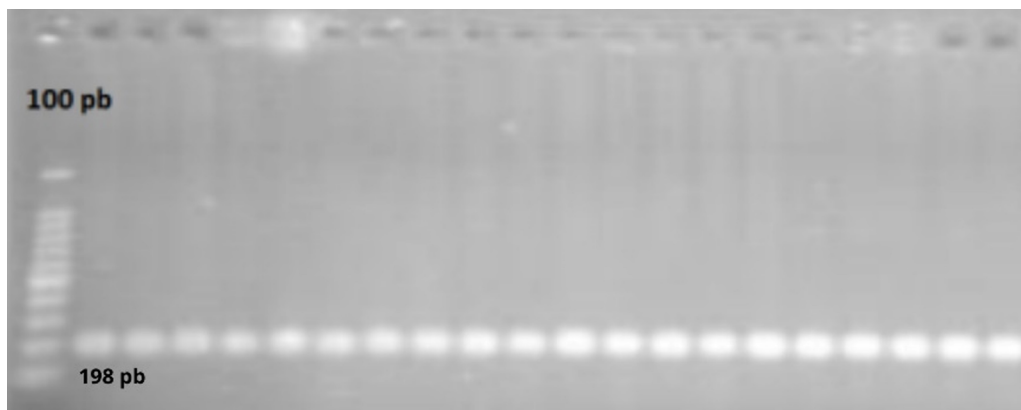
## Material e métodos

Amostras de sêmen foram coletadas de 490 touros Girolando e 760 touros Gir e enviadas ao laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite para análises. O DNA foi extraído por meio do protocolo fenol-clorofórmio adaptado (Sambrook; Russell, 2001) e a qualidade das amostras foi checada por meio da quantificação no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras foram armazenadas a -20 °C e -80 °C até o uso.

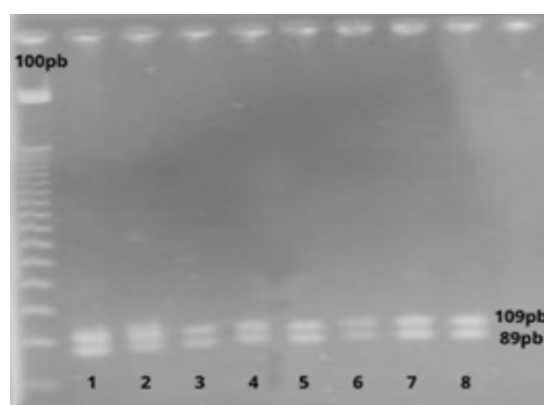
Para amplificação do fragmento do gene da BC, foi realizado um ensaio de PCR-RFLP, utilizando os primers para o gene ASS, sendo eles F: 5' GGCCAGGGACCGTGTTTCATTGAGGACATC 3' e R: 5' TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG 3' (Meydan et al., 2010). Posteriormente, a reação foi submetida à digestão pela enzima de restrição Ava II. Todas as reações foram submetidas ao termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), reveladas em gel de eletroforese em agarose 2%, coradas durante 30 minutos em brometo de etídio a 0,3% e visualizadas utilizando o software do Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

## Resultados e discussão

Dos 490 touros Girolando e 760 touros Gir analisados, nenhum animal foi identificado como portador do gene para Citrulinemia. O produto da reação de PCR para BC é um fragmento de 198 pb para todos os animais (Figura 1). A digestão do amplicon com a enzima de restrição Ava II gera fragmentos de 89 e 109 pb para animais normais (Figura 2); de 89, 109 e 198 para animais portadores e de 198 para animais doentes (Meydan et al., 2010).



**Figura 1.** Padrão do fragmento para a PCR de Citrulinemia. Marcador de 100 pb foi utilizado na extremidade esquerda.



**Figura 2.** Padrões dos fragmentos para a digestão de Citrulinemia. Os animais de 1 a 8 são normais e apresentam as bandas de 89 e 109 pb. Marcador de 100 pb foi utilizado na extremidade esquerda.

A ausência da desordem genética em touros da raça Gir pode ser explicada pelo fato de que, inicialmente essa doença parece ter sido propagada por meio da comercialização em larga escala do sêmen do touro americano da raça Holandesa Linmack Kriss King (Meydan et al., 2010).

Com resultados similares aos apresentados neste estudo, não foram encontrados animais portadores em diferentes rebanhos de animais da raça Holandesa na Turquia (Meydan et al., 2010), da raça Sahiwal e Holandeses mestiços na Índia (Rathore et al., 2020), da raça Holandesa e Holandeses mestiços, também na Índia (Gebreselassie et al., 2019) e da raça Holandesa no Brasil, sendo que não existem relatos sobre a portabilidade dos haplótipos para a BC no país (Pilonetto et al., 2019).

Em contrapartida, estudos mais antigos mostram a presença de animais portadores em rebanhos dos Estados Unidos (Robinson et al., 1993), da Alemanha (Grupe et al., 1996) e da Índia (Padeeri et al., 1999). A discrepância nos resultados com relação à presença de portadores em estudos mais antigos e ausência nos mais recentes, é reflexo do uso anterior de reprodutores afetados em regiões diferentes, ressaltando a importância da genotipagem e do melhoramento genético.

## Conclusões

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, a identificação de touros portadores de Citrulinemia é indispensável para manutenção do rebanho livre dos haplótipos para a anomalia genética.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil e à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa PIBIC, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Marco Antônio Machado pela orientação.

## Referências

GEBRESELASSIE, G.; DE, S.; MUKHERJEE, A.; GOHAIN, M. Allele specific PCR based genotyping reveals lack of bovine leukocyte adhesion deficiency, bovine citrullinemia and complex vertebral malformation carriers in Indian cattle population. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 5, p. 1581-1589, 2019. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.805.183>.

GRUPE, S.; DIETL, G.; SCHWERIN, M. M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins. **Livestock Production Science**, v. 45, n. 1, p. 35-38, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(95\)00078-X](https://doi.org/10.1016/0301-6226(95)00078-X).

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, article 56, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-56>.

PADEERI, M.; VIJAYKUMAR, K.; GRUPE, S.; NARAYAN, M. P.; SCHWERIN, M.; KUMAR, M. H. Incidence of hereditary Citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency Syndrome in Indian dairy cattle (BOS TAURUS, BOS INDICUS) and buffalo (BUBALUS BUBALIS) Population (short communication), **Archives Animal Breeding**, v. 42, p. 347-352, 1999. DOI: <https://doi.org/10.5194/aab-42-347-1999>.

PILONETTO, F.; LADEIRA, G. C.; SALVIAN, M.; GERVÁSIO, I. C.; ZAMPAR, A.; CUCCO, D. de C. Associações genéticas entre características de interesse econômico e identificação de haplótipos para doenças genéticas em vacas da raça Holandesa criadas no Brasil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 31, n. 12, article 188, 2019. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd31/12/pilon31188.html>. Acesso em: 14 jun. 2024.

RATHORE, A.; PARVEEN, K.; SINGH, M.; JAIN, A.; MUKHERJEE, K.; BARWA, D. K.; JAIN, T.; SINGH, N. Genotyping bovine leukocyte adhesion deficiency and bovine Citrullinemia in Sahiwal and Holstein cross bred animals of Durg district of Chhattisgarh state. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 4, p. 481-486, 2020. Disponível em: <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue4/Parth/8-3-404-494.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2024.

ROBINSON, J. L.; BURNS, J. L.; MAGURA, C. E.; SHANKS, R. D. Low incidence of citrullinemia carriers among dairy cattle of the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 853-858, 1993. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77411-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77411-1).

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; FERREIRA JÚNIOR, 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.; BORGES, C. A. V.; DOMINGUES, R. (ed.). **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando**: sumário de touros: resultado do teste de progênie (avaliação genética/genômica): junho 2023. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. 143 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 277). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1154303>. Acesso em: 14 jun. 2024.