

**FREQÜÊNCIA DO ALELO DA SÍNDROME DO CORDEIRO ARANHA EM OVINOS SUFFOLK E HAMPSHIRE DOWN NA REGIÃO SUL DO BRASIL
FRECUENCIA DEL ALELO DE CONDRODISPLASIA HEREDITARIA EN OVINOS SUFFOLK Y HAMPSHIRE DOWN EN LA REGIÓN SUR DEL BRASIL
ALLELE FREQUENCY OF SPIDER LAMB SYNDROME IN SUFFOLK AND HAMPSHIRE DOWN HERDS GRAZED IN SOUTHERMOST BRAZIL**

RODRIGUES, E.E.¹, RIBEIRO, L.A.O.², RODRIGUES, N.C.¹, PASSOS, D.T.¹, WEIMER, T.A.¹

¹Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Biotecnologia Veterinária, ULBRA, Canoas - PPG em Genética e Toxicologia Aplicada e PPG Diagnóstico Genético Molecular, ULBRA, Canoas.

²Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre.

Endereço: Av. Farroupilha, nº 8001 · Bairro São José · Canoas/RS · CEP 92425-900 · Hospital Veterinário · Prédio 25 · Fone: (51) 3477.9212 · taweimer@gmail.com

Resumo

A Síndrome do Cordeiro Aranha (Spider Lamb Syndrome, SLS) é uma doença autossômica recessiva de ovinos, caracterizada por graves anormalidades músculo-esqueléticas. A enfermidade é causada por uma mutação no códon 700 do gene receptor 3 do fator de crescimento do fibroblasto (FGFR3), provocando o crescimento ósseo descontrolado. Doenças congênitas como a SLS têm impacto significativo sobre a eficiência de produção. O objetivo deste trabalho foi verificar a frequência da mutação nas raças Suffolk e Hampshire Down em três rebanhos da região Sul do Brasil. Foram avaliadas 256 amostras, sendo 146 ovinos da raça Suffolk de dois rebanhos e 110 ovinos Hampshire Down. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico, amplificado por PCR e clivado com a enzima de restrição *Xho*I. As frequências gênicas observadas variaram entre os diferentes rebanhos: em Suffolk, o alelo E (mutante) teve frequência de 6% em um rebanho e 3% no outro, enquanto em Hampshire Down foi de 6%. Estes resultados demonstram a ocorrência de 8-12% de heterozigotos, salientando a necessidade de medidas preventivas para evitar o nascimento de indivíduos afetados. A eliminação dos animais portadores do alelo E do sistema de reprodução beneficiará a indústria ovina. Estes dados são importantes para os criadores, já que a genotipagem dos reprodutores permite a realização de cruzamentos dirigidos evitando o aumento da frequência do alelo causador da síndrome, reduzindo as perdas econômicas. É importante salientar que, no Brasil, o teste baseado no DNA para detecção de animais heterozigotos não vem sendo realizado de rotina.

Palavras-chave: condrodisplasia hereditária, FGFR3, ovinos, síndrome do cordeiro aranha

Abstract

The Spider Lamb Syndrome (SLS) is an autosomal recessive condition of sheep, characterized by severe muscles and bone lesions. The disease is caused by a mutation on codon 700 of the gene fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) leading to an abnormal bone growth. Congenital diseases as SLS may have an important impact on animal production. The objective of this work was to detect the frequency of this mutation on Suffolk and H. Down breeds in three flocks grazed in the Southernmost region of Brazil. A total of 256 samples, 146 from two Suffolk flocks and 110 from one H. Down flock were

availed. The genomic DNA was extracted from the peripheral blood; PCR amplified and fragmentized with restriction enzyme *Xho*I. The genic frequency observed varies within the different herds: Suffolk, the mutant allele E shows a frequency of 6% in one flock and 3% in another, H. Down 0%. The results showed also the occurrence from 8-12% of heterozygote for the allele responsible for the condition. The data claim attention for the need of preventive measures to minimize the birth of affected lambs. The culling of animals specially rams, caring the E allele will bring more efficiency to the sheep industry. The data present here is important also for the sheep breeders since the genotyping of the breed stock will allow more security on breeding programs and stopping the spread of the undesirable allele and thus reducing the economic losses. It is important to stress that in Brazil the DNA test for SLS is not a common procedure.

Keywords: FGFR3, hereditary chondrodysplasia, sheep, spider lamb syndrome

Introdução

A Síndrome do Cordeiro Aranha (Spider Lamb Syndrome, SLS) ou condrodysplasia hereditária ovina é uma doença congênita autossômica recessiva, caracterizada por graves anormalidades no sistema músculo-esquelético, principalmente em ovinos de ‘cara negra’. A doença foi primeiramente descrita em meados da década de 1980 nos EUA em animais jovens da raça Suffolk e Hampshire Down (KENNEDY, 1984). As principais características físicas dos animais afetados pela SLS são desproporcionalidades dos ossos longos, anormalidades quanto ao tamanho dos membros, patas “tipo-aranha”, atrofia muscular, deformidades nas costelas e esterno, falta de gordura corpórea e curvatura da coluna vertebral (VANEK et al., 1986; ROOK et al., 1988). Nos animais afetados, o diagnóstico pode ser facilmente realizado através das análises radiográficas, histológicas e necropsia (ROOK et al., 1988). A apresentação clínica da doença é altamente variável, com alguns cordeiros gravemente afetados ao nascer e outros manifestando os sintomas entre 4 a 6 semanas de idade (ROOK et al., 1988). Cockett et al. (1999), descobriram a localização do locus causador da SLS no cromossomo 6 ovino e a identificação do provável gene envolvido na doença, receptor 3 do fator de crescimento do fibroblasto (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3), gene responsável pelo controle do crescimento ósseo. Beever et al. (2006), analisaram a seqüência do gene, identificaram dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e desenvolveram um teste de PCR-RFLP (restrict fragment length polymorphism) para investigar o envolvimento da mutação com a manifestação clínica da doença. Uma transversão do nucleotídeo T → A no códon 700 do gene FGFR3, causa a substituição do aminoácido Valina (V) para Glutamato (E) levando à perda da função do receptor, provocando o crescimento ósseo descontrolado nos animais homocigotos (EE). Os genótipos são identificados como VV (normal), VE (portador) e EE (afetado); este último desenvolve a doença no período embrionário ou após o nascimento, prejudicando o desenvolvimento em condições naturais. No Brasil, a primeira descrição da doença foi feita por Rodrigues et al. (1999), em um cordeiro Suffolk, após importação de animais de origem americana. Não há relatos das freqüências do alelo causador da SLS nos rebanhos ovinos do país. O objetivo deste trabalho foi verificar em indivíduos sadios a freqüência do alelo E do códon 700 do gene FGFR3 nas raças Suffolk e Hampshire Down de três rebanhos ovinos da região sul do Brasil.

Material e Métodos

Foram avaliadas 256 amostras de ovinos provenientes de três rebanhos da região Sul do Brasil, de ambos os sexos e de diferentes idades, sendo 146 animais da raça Suffolk (rebanhos “A” e “B”) e 110 animais da raça Hampshire Down. Para identificar o

polimorfismo no gene *FGFR3*, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total de acordo com o método de Miller et al. (1988), e um fragmento de 147 pb do *FGFR3* foi amplificado utilizando a técnica da PCR. Os produtos das ampliações foram clivados com a enzima de restrição *XhoI*. O alelo T (tipo selvagem) foi representado pelos fragmentos de 14 e 133 pb enquanto que o alelo A, associado com a SLS, a enzima produziu fragmentos de 14, 19 e 114 pb. As análises dos produtos de clivagem foram feitas por eletroforese em gel vertical de poliacrilamida, não-desnaturante a 10,5% e corado com nitrato de prata (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os primers utilizados foram os mesmos descritos por Beever et al. (2006).

Resultados e Discussão

Utilizando a técnica de PCR-RFLP, obtivemos as frequências genótípicas e alélicas para o códon 700 do gene *FGFR3*, estando apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Frequências genótípicas do códon 700 do gene *FGFR3*

Códon	Suffolk _{rebanho A}		Suffolk _{rebanho B}		Suffolk _{Total}		Hampshire Down	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
VV	36	(88)	99	(94)	135	(92)	97	(88)
VE	5	(12)	6	(6)	11	(8)	13	(12)
Total	41		105		146		110	

Tabela 2: Frequências alélicas do códon 700 do gene *FGFR3*

Alelo	Suffolk _{rebanho A}	Suffolk _{rebanho B}	Suffolk _{Total}	Hampshire Down
V	0,94	0,97	0,96	0,94
E	0,06	0,03	0,04	0,06

No rebanho “A” da raça Suffolk, 41 animais foram genotipados revelando 5 indivíduos portadores do alelo responsável pela SLS e no rebanho “B” dos 105 animais genotipados, 6 eram portadores da mutação. Nos animais Hampshire Down, 13 apresentaram o alelo causador da SLS de um total de 110 que foram avaliados. Na análise geral da raça Suffolk, 92% dos animais apresentaram genótipo VV e 8% VE, correspondendo às frequências alélicas de 0,96 para o alelo V e 0,04 para E. Em Hampshire Down, 88% dos animais apresentaram genótipo VV e 12% VE, sendo as frequências alélicas de 0,94 (V) e 0,06 (E). Os resultados apontam que mesmo em uma baixa frequência, há presença do alelo causador da doença nas populações avaliadas, o que é compatível com rebanhos que não sofreram seleção para diminuir a frequência do alelo E. Drögemüller et al. (2005), após a ocorrência de alguns casos de SLS na Alemanha em ovinos Suffolk, analisaram a frequência da mutação em 125 animais e detectaram 11 portadores, correspondendo à frequência alélica de 0,04 (E). Os autores acreditam que a mutação foi introduzida no rebanho alemão após a introdução de ovinos Suffolk importados dos EUA na década de 1980, situação semelhante também ocorreu na Austrália e Nova Zelândia.

Acredita-se que a mutação do gene *FGFR3* foi detectada nos anos 60, pois os criadores de ovinos da raça Suffolk dos EUA, a fim de aumentar a estrutura esquelética dos animais objetivando o aumento da massa corporal, começaram a realizar cruzamentos dirigidos entre os maiores reprodutores. Ironicamente, entre as décadas de 1980 e 1990 houve uma

alta frequência de SLS nas populações de ovinos Suffolk, provavelmente devido à seleção de animais portadores do alelo mutante (KENNEDY, 1984). No entanto, o desenvolvimento de um teste genético para a SLS baseado no SNP do gene FGFR3 e sua utilização comercial, resultou em uma redução substancial dos indivíduos heterozigotos nos EUA, Austrália e Nova Zelândia (BEEVER et al., 2006).

Para Cockett et al. (1999), a redução do número filhotes viáveis nos rebanhos causa um grande prejuízo econômico sobre o sistema de criação de ovinos. Como a enfermidade causa graves deformidades na estrutura óssea e não há tratamento, os animais raramente sobrevivem após o período neonatal em condições normais. Portanto, a presença de doenças congênitas como a SLS tem um impacto significativo sobre a eficiência de produção provocando grandes perdas econômicas. Devido ao aspecto aparentemente normal dos animais portadores da mutação e a dificuldade de fornecer um diagnóstico precoce destes animais, a identificação individual através de técnicas moleculares e a eliminação dos animais heterozigotos da reprodução deverão beneficiar a indústria ovina. No Brasil, a primeira descrição da doença foi feita por Rodrigues et al. (1999), em um cordeiro Suffolk, após introdução de ovinos da mesma raça de origem americana no plantel brasileiro, através das análises descritas por Rook et al. (1988), mas sem confirmação laboratorial (genotipagem), pois a técnica molecular ainda não havia sido estabelecida.

Conclusões

No Brasil, o teste baseado no DNA para detecção de animais portadores não vem sendo feito rotineiramente. Não há relatos de muitos casos no país, provavelmente porque o diagnóstico não está sendo corretamente realizado.

Estes resultados serão importantes para os criadores, já que a análise dos genótipos dos ovinos reprodutores permite a realização de cruzamentos dirigidos evitando o aumento da frequência do alelo causador da síndrome, diminuindo futuras perdas econômicas.

Além disso, também proporciona ao criador, a possibilidade de introduzir somente animais homozigotos (VV) no rebanho, evitando o aparecimento de surtos da doença e a disseminação da mesma.

Referências

- BEEVER, J.E., SMIT, M.A., MEYERS, S.N., HADFIELD, T.S., BOTTEMA, C., ALBRETSEN, J., COCKETT, N.E. A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. **Animal Genetics**, v. 37, p. 66-71, 2006.
- COCKETT, N.E., SHAY, T.L., BEEVER, J.E., NIELSEN, D., ALBRETSEN, J., GEORGES, M., PETERSON, K., STEPHENS, A., VERNON, W., TIMOFEEVSKAIA, O., SOUTH, S., MORK, J., MACIULIS, A., BUNCH, T.D. Localization of the locus causing Spider Lamb Syndrome to the distal end of ovine Chromosome 6. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 35-38, 1999.
- DRÖGEMÜLLER, C., WÖHLKE, A., DISTL, O. Spider Lamb Syndrome (SLS) mutation frequency in German Suffolk sheep. **Animal Genetics**, v. 36, p. 539-540, 2005.
- KENNEDY, G.F. Straight talk. **Suffolk Banner**, v. 7, n. 10, p. 108, 1984.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acid Research**, v. 16, p. 1215, 1988.
- RODRIGUES, N.C., ESMERALDINO, A., TEIXEIRA, M., FALLAVENA, L.C., RODRIGUES, P.R.C., ALVES, L.C., RIBEIRO, L.A.O. 1999. Condrodisplasia hereditária ovina em cordeiros Suffolk no Rio Grande do Sul – relato de caso. In: Nunes, I.J. Editor. **Resumos do 9º Encontro Nacional de Patologia Veterinária** 1999, July 26-30, Belo Horizonte, Brasil. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1999.
- ROOK, J.S., TRAPP, A.L., KREHBIEL, J., YAMINI, B., BENSON, M. Diagnosis of hereditary chondrodysplasia (spider lamb syndrome) in sheep. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 6, p. 713-718, 1988.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- VANEK, J.A., ALSTAD, A.D., BERG, I.E., MISEK, A.R., MOORE, B.T., LIMESAND, W. Spider syndrome in lambs: a clinical and postmortem analysis. **Veterinary Medicine**, v. 81, p. 663-668, 1986.