

## FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO IGF-I/*Sna*BI EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS MANEJADAS EM SISTEMA INTENSIVO OU SEMI-EXTENSIVO

THÁIS CASARIN DA SILVA<sup>1,2</sup>; LUCAS TEIXEIRA HAX<sup>1</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>1</sup>; JOABEL TONELLOTTI DOS SANTOS<sup>1</sup>; CAROLINA BESPALHOK JACOMETO<sup>1</sup>; MARCIO NUNES CORRÊA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)  
Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – UFPel  
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil

<sup>2</sup>thais\_casarin@hotmail.com; <sup>3</sup>marcio.nunescorrea@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As novas tecnologias voltadas à pecuária leiteira propiciaram o crescimento significativo deste setor nos últimos anos, em parte devido à implantação de estratégias de manejo, tais como os sistemas intensivo e semi-extensivo (IBGE, 2015; SIMÕES et al., 2009). Além disso, a seleção genética permitiu o aumento da frequência de alelos favoráveis à produção de leite nos rebanhos brasileiros (DIONELLO et al., 2006; ESTEVES et al., 2004).

No sistema intensivo, os animais ficam confinados durante toda a sua vida produtiva em local coberto, sendo a nutrição baseada em dieta total (TMR, do inglês *total mixed ration*) rica em concentrado. Já no sistema semi-extensivo, os animais permanecem a maior parte do dia em piquetes, tendo livre acesso a pastagem e recebem uma suplementação de concentrado, geralmente após a ordenha (SIMÕES et al., 2009).

No sistema agropecuário, a biologia molecular se tornou uma ferramenta essencial para o estudo e aperfeiçoamento do melhoramento genético de bovinos leiteiros e de corte (RAMALHO et al., 2008). Neste contexto, alguns genes têm sido estudados com o intuito de relacionar sua frequência com a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos, auxiliando o melhoramento genético.

Dentre esses genes, o fator de crescimento semelhante à Insulina (IGF-I) é um hormônio do eixo-somatotrófico, que atua na regulação do metabolismo e fisiologia dos mamíferos (BONAKDAR et al., 2010). Em bovinos, o gene que codifica para IGF-I apresenta uma mutação (C→T) na posição 512pb, região 5' *Sna*BI, no cromossomo 5. (BONAKDAR et al., 2010; GE et al., 2001; MIRZAEI et al., 2012). Segundo SHIRASUNA et al. (2011), esta mutação está relacionada com a produção e reprodução de bovinos, tendo maiores estudos em relação ao ganho de peso ao desmame, atividade folicular e taxa de crescimento.

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência genotípica e alélica do polimorfismo IGF-I/*Sna*BI em vacas da raça Holandês manejadas em sistema intensivo e semi-extensivo.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 858 vacas leiteiras da raça Holandês. Destas, 381 vacas provenientes de uma fazenda comercial do sul do Brasil, manejadas em sistema semi-extensivo, com dieta baseada principalmente em pastagem cultivada e suplementação de concentrado, sendo ordenhadas duas vezes ao dia. Os outros 477 animais eram provenientes de uma fazenda comercial do sudeste do Brasil, manejados em sistema intensivo, alimentados com dieta TMR, sendo ordenhadas três vezes ao dia. As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações do NRC (do inglês, *National Research Council*) (2001).

Foi realizada coleta de sangue total, através da veia coccígea e o ácido desoxiribonucleico (DNA) foi extraído a partir de uma alíquota de 500 µL de sangue total. Cada amostra foi homogeneizada com 1000 µL de tampão de lise para células vermelhas centrifugada por 2 minutos à 7000 rpm e após o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida quatro vezes. Posteriormente, o pellet obtido foi dissolvido com 400 µL de tampão de lise para células nucleadas. Em seguida, foi adicionado 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) 5M e 600 µL de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado à 7000 rpm por 2 minutos. Após, foram retirados 400 µL de sobrenadante, transferido a um novo tubo com 800 µL de etanol absoluto a 4°C, homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto.

Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e a amostra foi secada a temperatura ambiente. Após a secagem a amostra foi eluída em 50 µL de solução de hidroximetilaminometano (Tris) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), levada ao banho-maria a 37°C por 30 minutos e após estocada a -20°C. A checagem do DNA extraído foi realizada a partir de 2,5 µL das amostras da extração, impregnadas com Gel Red e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizadas em exposição à luz ultravioleta.

Para determinar os alelos de IGF-1/*Sna*BI, foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os primers: TTAATAATTGGGTTGGAAGACTGC (forward) e ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT (reverse), que possibilitaram a amplificação de um fragmento de 249 pares de bases. A reação de digestão foi realizada a partir de 7µL do produto da PCR e 3 unidades da enzima de restrição *Sna*BI (New England Biolabs, UK).

As misturas de digestão foram colocadas em termociclador a 37°C por 3 horas. Após digestão, as amostras amplificadas foram impregnadas com Gel Red, separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e fotografados por um sistema de fotodocumentação com luz ultravioleta. O genótipo de cada animal foi determinado por meio da análise do tamanho dos fragmentos representado em pares de base. Os genótipos identificados foram: *Sna*BI (+/+): 226pb; *Sna*BI (+/-): 249pb, 226pb; *Sna*BI (-/-): 249pb (GE et al. 2011). Para análise da frequência genotípica entre os sistemas, foi utilizado o teste de qui-quadrado no programa GraphPadPrism 5.03 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Foram considerados significantes resultados com  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diferença na frequência genotípica pode se dar de acordo com o ambiente ou com os critérios de seleção do rebanho (MIRZAEI et al., 2012). Neste estudo, conforme o sistema de manejo submetidos, os animais apresentaram diferentes frequências genotípicas.

Dentre os animais manejados no sistema semi-extensivo, 133 (34,91%) apresentaram o genótipo IGF-1/*Sna*BI (-/-), enquanto que apenas 87 (18,24%) dos animais criados no sistema intensivo apresentaram o mesmo genótipo ( $P < 0,001$ ) (Tabela 1). Além disso, dentre os animais manejados no sistema intensivo, 193 (40,46%) apresentaram o genótipo IGF-1 *Sna*BI (+/+), enquanto que apenas 64 (16,8%) dos animais criados no sistema semi-extensivo apresentaram o mesmo genótipo ( $P < 0,001$ ). Os genótipos heterozigotos (-/+), também apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos para os diferentes sistemas ( $P = 0,04$ ), com maior frequência nos animais do sistema semi-extensivo (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência genotípica e alélica de IGF-I/*Sna*BI nos animais dos diferentes sistemas de manejo avaliados.

	Genótipo/Alelo	Sistema Semi-extensivo	Sistema Intensivo	Valor de <i>P</i>
IGF-I <i>Sna</i> BI	(-/-)	133 (34,91%)	87 (18,24%)	<0,001
	(+/-)	184 (48,29%)	197 (41,3%)	0,04
	(+/+)	64 (16,8%)	193 (40,46%)	<0,001
	(-)	0,59	0,39	
	(+)	0,41	0,61	

O sistema de manejo intensivo é marcado por possibilitar uma alta produção de leite por animal, acompanhada de uma acentuada exigência metabólica, enquanto que o sistema semi-extensivo se caracteriza por apresentar animais de média produção e de metabolismo menos exigido (SIMÕES et al., 2009).

É possível que as diferentes exigências impostas pelos distintos ambientes favoreçam a perpetuação de determinados alelos, o que poderia explicar as diferenças nas frequências genotípicas observadas como mostram os trabalhos de MULLEN et al. (2011) e MIRZAEI et al. (2012). Por outro lado, talvez essas diferenças possam ser explicadas em função dos critérios de seleção das fazendas, culminando na utilização de touros disseminadores dos alelos mais frequentes (DURÃES et al., 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

Em suma, o genótipo IGF-I *Sna*BI de vacas leiteiras da raça Holandês pode estar correlacionado com o sistema de manejo em qual os animais são manejados. Demonstrando que vacas de sistema intensivo possuem maior frequência de genótipos homocigotos mutados (+/+) e menores frequências de genótipos homocigotos não mutados (-/-) e heterocigotos (+/-) do que os animais de sistema semi-extensivo. No entanto, são necessários estudos com uma maior população de animais para uma melhor explanação do assunto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONAKDAR, E.; HAHMANI, H.R.; EDRISS, M.A.; SAYED TABATABAEI, B.E. IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.9, n.3, p.1726-1734, 2010.

DIONELLO, N.J.L.; SILVA, C.A.S.; COSTA, C.N.; COBUCI, J.A. Estimação de parâmetros genéticos utilizando-se a produção de leite no dia do controle em primeiras lactações de vacas da raça Jersey. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.35, n.4, p.1646-1652, 2006.

DURÃES, M.C.; FREITAS, A.F.; VALENTE, J.; TEIXEIRA, N.M.; BARRA, R.B. Tendência Genética para a Produção de Leite e de Gordura em Rebanhos da Raça Holandesa no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.30, n.1, p.66-70, 2001.

ESTEVEES, A.M.C.; BERGMANN, J.A.G.; DURÃES, M.C.; COSTA, C.N.; SILVA, H.M. Correlações genéticas e fenotípicas entre características de tipo e produção de leite em bovinos da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.4, p.529-535, 2004.

GE, W.; DAVIS, M.E.; HINES, H.C.; IRVIN, K.M.; SIMMEN, R.C.M. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.79, p.1757-1762, 2001.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Indicadores IBGE. 2015. Acessado em 15 jul. 2015. Online. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201404\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf)

MIRZAEI, A.; SHARIFIYAZDI, H.; AHMADI, M.R.; ARAROOTI, T.; ROWSHAN GHASRODASHTI, A.; KADIVAR, A. The effect of polymorphism in gene of insulin-like growth factor-I on the serum periparturient concentration in Holstein dairy cows. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Whashington, v.2, n.10, p.765-769, 2012.

MULLEN, M.P.; LYNCH, C.O.; WATERS, S.M.; HOWARD, D.J.; BOYLE, P.O.; KENNY, D.A.; BUCKLEY, F.; HORAN, B.; DISKIN, M.G. Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.10, n.3, p.1819-1830, 2011.

National Research Council - NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. **National Academy Press**, Washinton, D.C., 7 ed., p.381, 2001.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**. Minas Gerais: UFLA, 2008.

SIMÕES, A.R.P.; SILVA, R.M.; OLIVEIRA, M.V.M.; CRISTALDO, R.O.; BRITO, M.C.B. Avaliação econômica de três diferentes sistemas de produção de leite na região do Alto Pantanal Sul-mato-grossense. **Agrarian**, Dourados, v.2, n.5, p.153-167, 2009.

SHIRASUNA, K.; KAWASHIMA, C.; MURAYAMA, C.; AOKI, Y.; MASUDA, Y.; KIDA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Relationships Between the First Ovulation Postpartum and Polymorphism in Genes Relating to Function of Immunity, Metabolism and Reproduction in High-producing Dairy Cows. **Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v.57, n.1, p.135–142, 2011.