



Universidade Federal de Pelotas
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



Associação entre polimorfismos de genes do eixo somatotrópico e fertilidade de vacas da raça Holandês

Adriane Dalla Costa de Matos
Thaís Casarin da Silva

Pelotas, 2016

Association between polymorphisms in somatotropic axis genes and fertility of Holstein dairy cows

Lucas Teixeira Hax^a, Augusto Schneider^b, Carolina Besspalhok Jacometo^a, Patrícia Mattei^a, Thaís Casarin da Silva^a, Géssica Farina^a, Marcio Nunes Corrêa^{a,*}

^aResearch Center, Education and Extension in Livestock (NUPEEC) – College of Veterinary – Federal University of Pelotas

^bDepartment of Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas



Fator de Impacto: 2,082

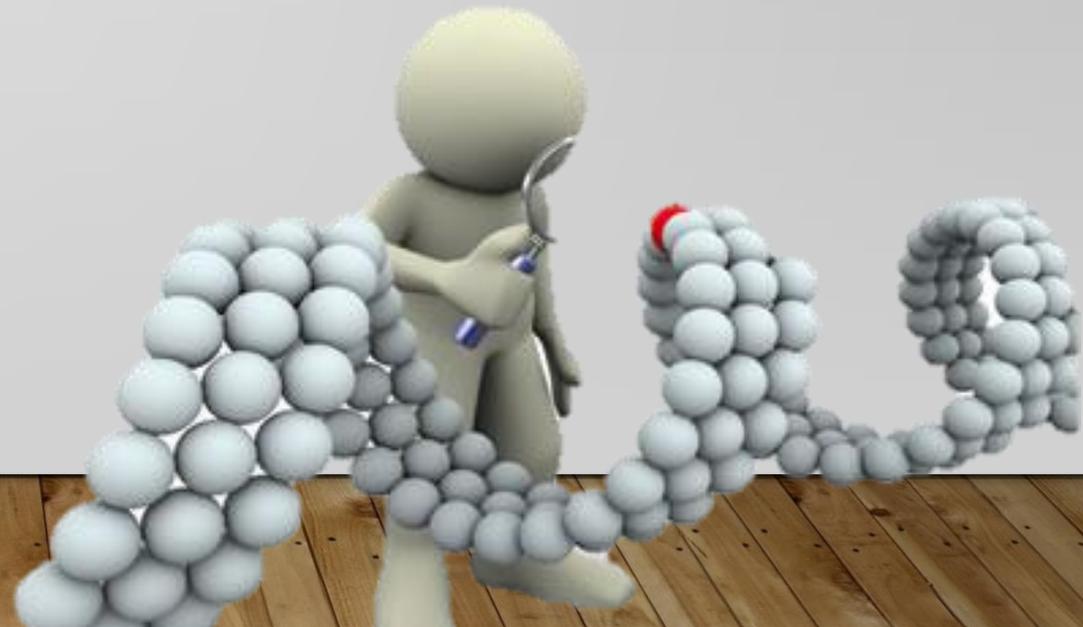
Qualis: A2

Seleção Genética

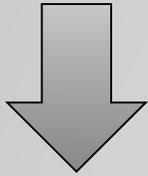
Introdução:

Produção de leite

Fertilidade

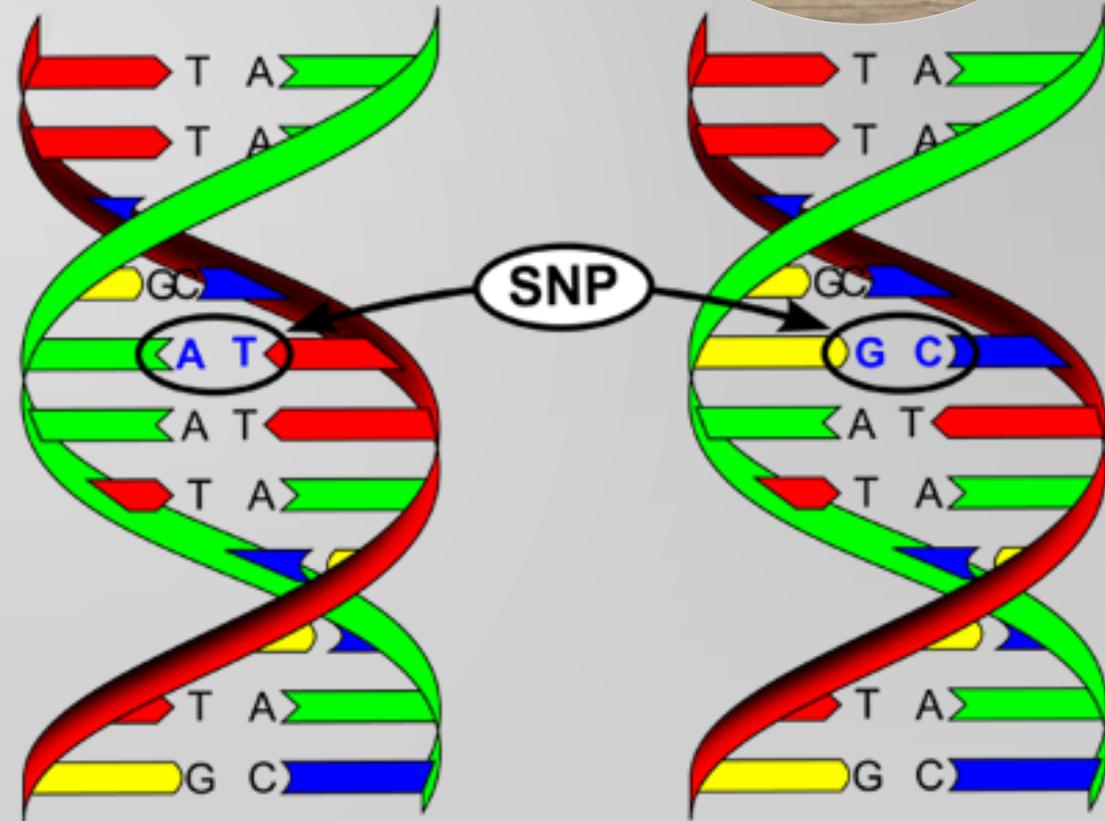
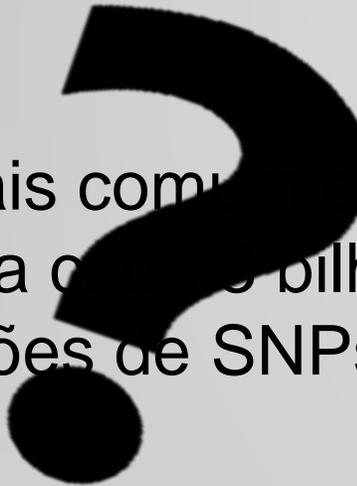


O que é SNP ?



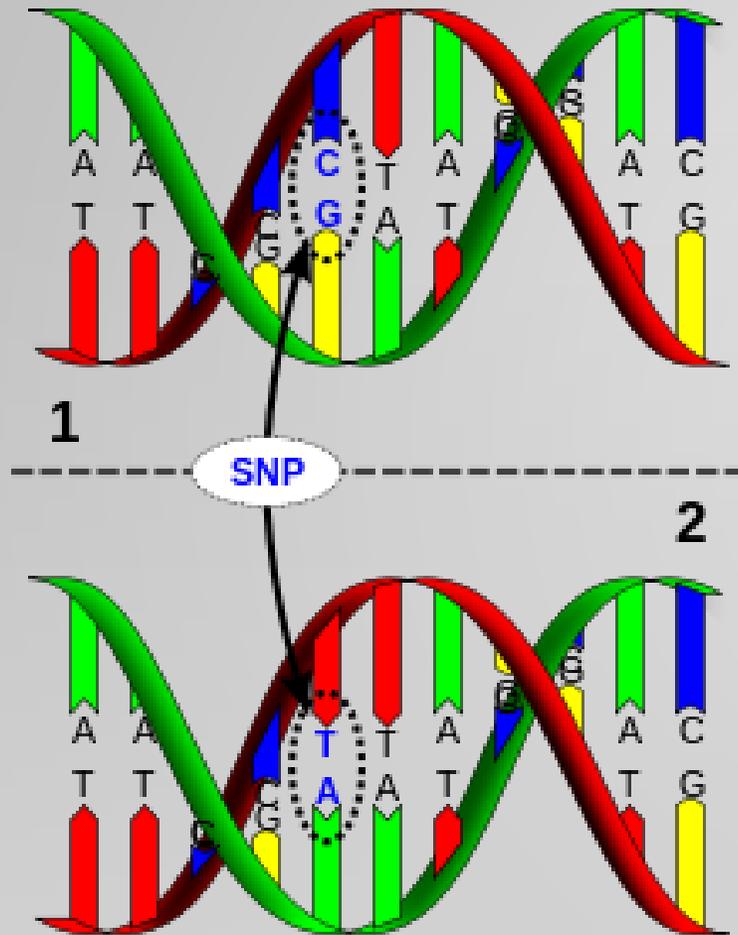
Polimorfismo de nucleotídeo único

- Tipo mais comum de variação genética
- Ocorre a cada 10 bilhões nucleotídeos
- 10 milhões de SNPs



➤ Polimorfismo de nucleotídeos único (SNPs)

Introdução:



Eixo somatotrópico

~~Desempenho reprodutivo~~

Eixo somatotrópico

Introdução:

➤ **Por quais hormônios este eixo é constituído?**

É um eixo hormonal, constituído por:

- ✓ Hormônio do crescimento (GH);
- ✓ Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)

✓ Acoplado ou Desacoplado

anabólico

catabólico



Eixo somatotrópico

Introdução:

catabólico

- ❖ Eleva GH
- ❖ Diminui IGF-I
- ❖ Diminui glicose e insulina

anabólico

- ❖ Diminui GH
- ❖ Eleva IGF-I
- ❖ Eleva glicose e insulina

Eixo somatotrópico

Introdução:

➤ COMPOSIÇÃO:

- ❖ Genes que codificam proteínas de sinalização intracelular de GH, IGF-I;
- ❖ Receptores de GH e IGF-I
 - ❖ Transdutor de sinal 5A (STAT5A)

➤ FUNÇÃO:

- ❖ Regulação do metabolismo e da fisiologia dos mamíferos

POLIMORFISMOS

- ✓ Síntese e composição do leite;
- ✓ Características de carcaça;
- ✓ Produção de carne;
- ✓ Desempenho reprodutivo.

GH

Introdução:

- ❖ Estimula a Lipólise no tecido adiposo;
- ❖ Incentiva a produção de leite;
- ❖ Reduz a absorção da glicose nos tecidos periféricos;
- ❖ Promove a gliconeogênese;
- ❖ Provoca o aumento da síntese e secreção do IGF-I.



IGF-I

Introdução:

❖ Ovário:

- Proliferação de células da granulosa e da teca do folículo;
- Inibe a atresia folicular.
- Estimula a resposta de células foliculares às gonadotropinas hipotalâmicas

IGF-I

ANESTRO

- ✓ Retorno rápido a ciclicidade
- ✓ Elevação na taxa de prenhez

Gene STAT

- ❖ Transdutor de sinal no citoplasma;
- ❖ Ativador de transcrição de proteínas no núcleo celular;
- ❖ Nos mamíferos é constituído por 7 estruturas com funções diferentes;

Introdução:

STAT5A

Interferon-t (INF-t)

Lactogênio placentário (PL)

✓ Fertilidade.

✓ Produção de leite;

Gene STAT5A



Transdução de sinal dentro de células

➤ Formação do gene STAT5 homodímeros

Células epiteliais mamárias

Útero

Exposição

- ❖ Lactogênio placentário (PL)
- ❖ Interferon- t (IFN-T)
- ❖ Estrogênio;
- ❖ Progesterona;

Introdução:

❖ O que é Lactogênio Placentário?

❖ Qual sua função?

Introdução:



Lactogênio Placentário

Introdução:

- ❖ Hormônio proteico;
- ❖ Aumenta a resistência materna;
- ❖ Estimula o pâncreas na secreção de insulina;
- ❖ Ajuda no crescimento fetal.

Introdução:

❖ O que é Interferon-t?

❖ Qual sua função?



Interferon- t

Introdução:

- ❖ Sinaliza a presença de prenhez;
- ❖ Evita o retorno a ciclicidade;
- ❖ Preserva o funcionamento do corpo lúteo durante a gestação;
- ❖ Age de maneira parácrina inibindo os receptores de estrógenos e ocitocinas;
- ❖ Sinaliza via STAT a expressão de vários genes no útero.

Gene STAT5A



Transdução de sinal dentro de células

➤ Formação do gene STAT5A homodímeros

Relembrando

Introdução:

Útero

Exposição

- ❖ Lactogênio placentário (PL)
- ❖ Interferon- t (IFN-T)



➤ Induz a transcrição da Proteína do leite

- Osteopontina (OPN);
- Proteína do leite bovino Uterina (Utmp);

Osteopontina (OPN)

Introdução:

Em bovinos:

- ❖ Desenvolvimento da glândula mamária;
- ❖ A proteína deste gene possui diversas funções, com expressão em diversos tecidos;



Relacionado com a caracterização do leite

Proteína do leite bovino uterina (Uttmp)

Introdução:

- ❖ Secretadas pelo endométrio;
- ❖ Secreção regulada pela progesterona;
- ❖ Funções pouco elucidadas, que podem envolver:
 - Inibição de proteases;
 - Nutrição do conceito;
 - Controle do crescimento;
 - Supressão do sistema imune;
 - Supressão do sistema imune materno;

RESUMINDO...

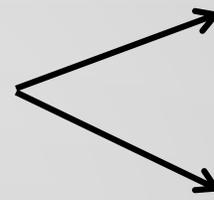
- Interferon – t
- Lactogênio Placentário



STAT5A

OPN

UTMP



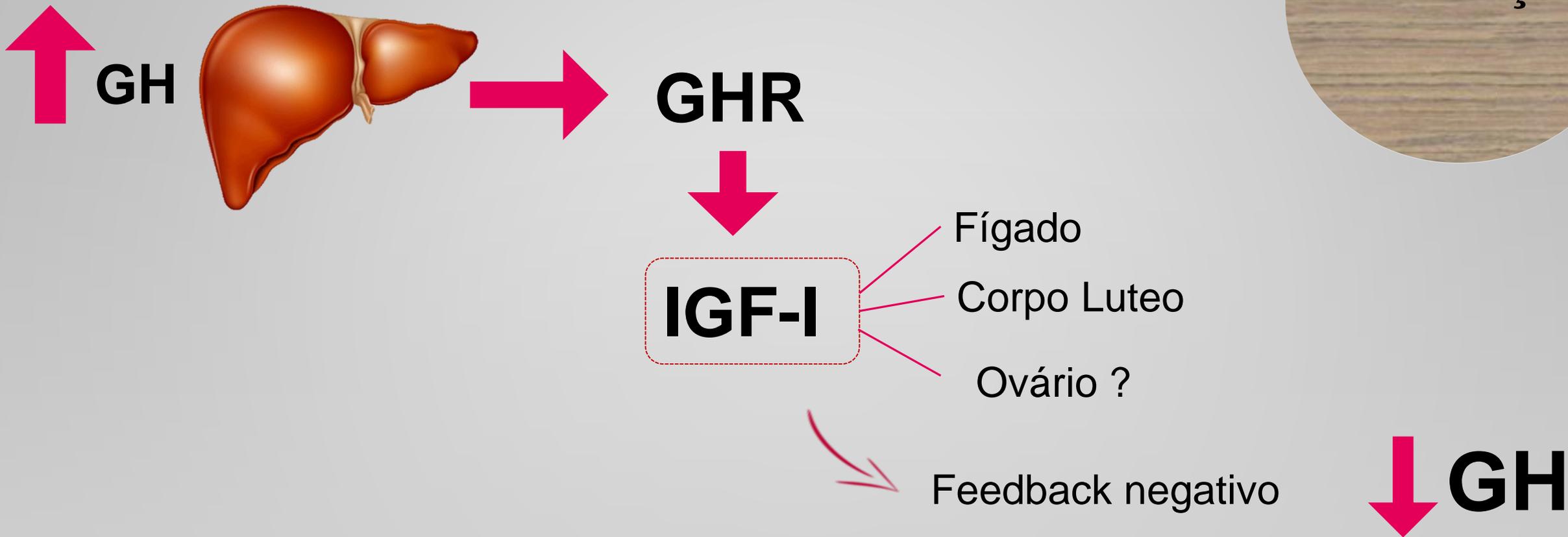
EIXO SOMATOTRÓPICO



GH



EIXO GH X IGF-I

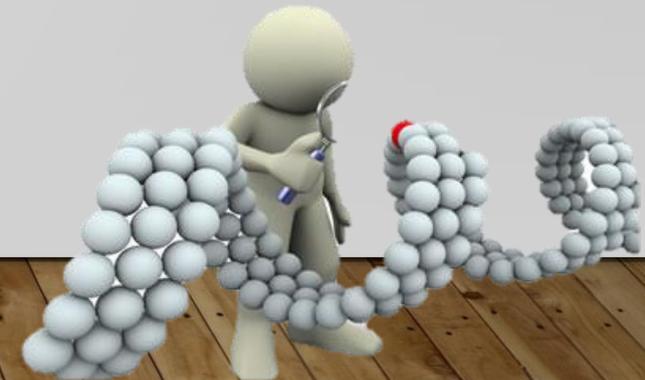


Introdução:

Em Bovinos:

→ POLIMORFISMOS

- ✓ Polimorfismo de IGF-I/*Sna*BI é uma transição T → C localizado na 512pb no primeiro exon;
- ✓ Polimorfismo de GHR/*Alu*I, uma mutação de ponto A → T localizada na posição -1182, na região promotora do gene de GHR;
- ✓ Polimorfismo STAT5A/*Bst*EII esta localizado no exon 8 do gene STAT5A.



➤ **Hipótese:**

SNPs GHR, IGF-I e genes STAT5A

➤ **Objetivo:**

✓ Determinar efeito do GHR AluI, IGF-I SnaBI e STAT5A BstEII

INTERVALO ENTRE PRIMEIRO CIO PÓS-PARTO (PCPP)

INTERVALO ENTRE PARTO CONCEPÇÃO (IPC)

NÚMERO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR PRENHEZ (nº IA/PRENHEZ)

FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO EM SISTEMA SEMI- EXTENSIVO E INTENSIVO

Desempenho reprodutivo

Introdução:

❖ Foram utilizadas 887 vacas da raça Holandês;

➤ 381 – Fazenda do Sul do Brasil

- Sistema: **Semi-extensivo**;
- Pastagem cultivada e suplementação de concentrado;
- Duas ordenhas/dia.
- Emprenharam dentro de 250 dias de lactação (DIM).



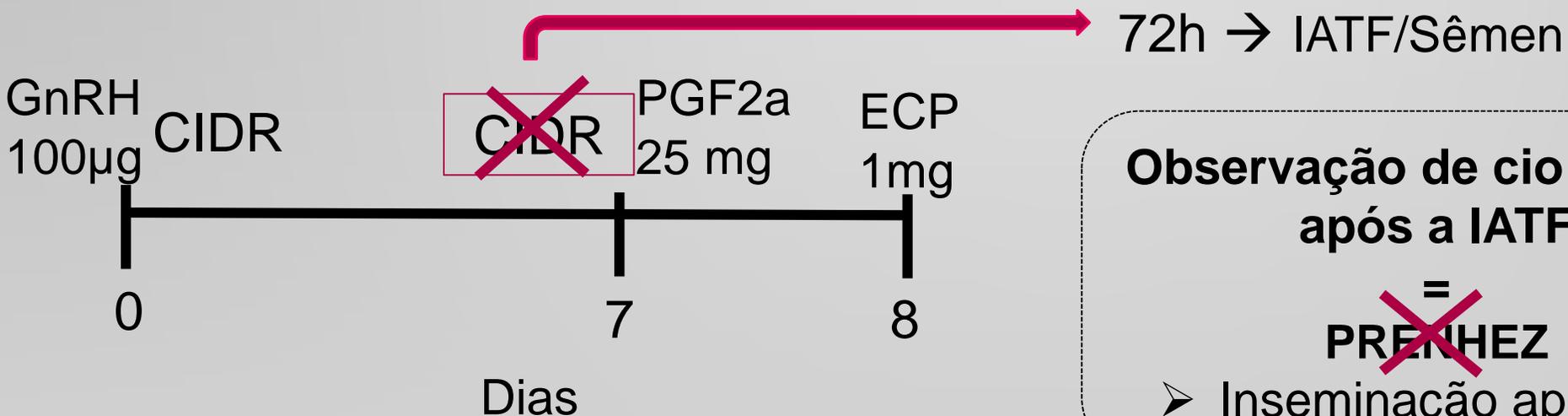
➤ 506 – Fazenda do Sudeste do Brasil

- Sistema: **Intensivo**;
- TMR;
- Três ordenhas/dia.
- Intervalo partos/concepção igual ou inferior a 200 DIM;



➤ N= 381 – Sistema Semi-Extensivo

- ❖ Pré-sincronizadas: 47 ± 5 DIM \rightarrow 25 mg PGF2a;
- ❖ Exame ginecológico e IATF \rightarrow 60 ± 3 DIM;



Materiais e Método:



➤ N=506 – Sistema Intensivo

- ❖ PCPP, IPC e nº IA/Prenhez → a partir da base de dados;
- ❖ Após 60 DIM → monitorava-se o estro através de pedômetros comerciais;
- ❖ Inseminadas → 12h após a detecção do cio
- ❖ Diagnóstico de Prenhez → ultrassom 28 e 60 dias após IA;

Vacas não inseminadas ou não prenhas
=
Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

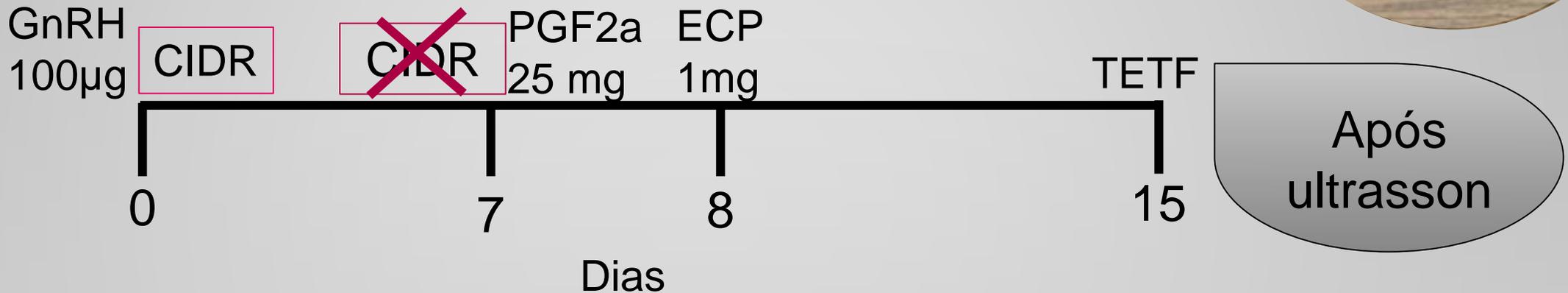
**Materiais e
Método:**



Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

Materiais e Método:

❖ Protocolo:



❖ Diagnóstico de gestação: ultrassonografia aos 28 e 60 dias após TETF.

Análises Moleculares

- ❖ Coleta de sangue - veia coccígea;
- ❖ Extração de DNA;
- ❖ Checagem: Eletroforese em Gel de Agarose;
- ❖ Reação em cadeia da polimerase (PCR);
- ❖ Reação de Digestão;
- ❖ Eletroforese em Gel de Agarose;
- ❖ Visualização em luz UV;

**Materiais e
Método:**



Análises Estatísticas

- ❖ As análises estatísticas foram realizadas utilizando procedimento GLM SAS 9.0.
- ❖ O teste do qui-quadrado foi realizado no software GraphPad Prism 5.3 para analisar a frequência do genótipo e alelo entre os sistemas.
- ❖ Foram considerados significantes resultados com $P < 0,05$

❖ **GHR *Alul* (-/-)** genótipo apresentaram uma **maior** frequência no sistema semi-extensivo

Tabela 1 - Frequência genotípica e alélica GHR *Alul* nos animais dos diferentes sistemas de manejo avaliados.

	Genótipo/Alelo	Sistema Semi-Extensivo	Sistema Intensivo	Valor de <i>P</i>
GHR <i>Alul</i>	(-/-)	28.6%	20.1%	<0.001
	(+/-)	56.7%	33.5%	
	(+/+)	14.7%	46.4%	
	(-)	0.6	0.4	0.007
	(+)	0.4	0.6	
	H-W	0.003	<0.0001	



Princípio de Hardy-Weinberg

O princípio de Hardy-Weinberg demonstra o comportamento gênico ao longo das gerações.

Fatores que alteram o equilíbrio gênico:

- **Mutação;**
- **Migração;**
- **Seleção;**
- **Deriva gênica.**

Hardy-Weinberg diz que a frequência de cada alelo tende a manter-se **constante** em cada geração;



Tabela 4- Frequência alélica do polimorfismo **GHR *Alul*** em vacas da raça Holandês. (**SCHNEIDER et al. 2013**)

GHR <i>Alul</i>	Genótipo/Alelo	Frequência	
		Primíparas	Múltiparas
	(-/-)	10%	13%
	(+/-)	37%	58%
	(+/+)	53%	30%

Tabela 1- HAX et al. 2016

	Frequência	
	Semi-extensivo	Intensivo
H-W	0.003	<0.001
(-/-)	28.6%	20.1%
(+/-)	56.7%	33.5%
(+/+)	14.7%	46.4%



❖ É possível que a frequência dos alelos de GHR *Alul* observados em sistema intensivo favorece a adaptação dos animais para este manejo;

Porém.. a distribuição dos genótipos se mantem constante em Hardy-Weinberg. Não é possível afirmar seleção gênica no rebanho ou na escolha de touros

❖ IGF-I *Sna*BI (-/-) genótipo apresentaram uma maior frequência no sistema semi-extensivo

Tabela 2 - 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 P
IGF-I <i>Sna</i> BI	(-/-)	34.9%	18.2%	<0,001
	(+/-)	48.3%	41.3%	
	(+/+)	16.8%	40.5%	
	(-)	0.6	0.4	0.004
	(+)	0.4	0.6	
	H-W	0.98	0.004	



Resultados e Discussão

A frequência do **IGF-I** no sistema semi-extensivo foi semelhante ao encontrado por Nicolini et al. (2013)

Tabela 2 - Frequência genotípica e alélica de IGF-I *Sna*BI nos diferentes sistemas de manejo avaliados(HAX et al. 2016)

	Genótipo/ Alelo	Sistema Semi- Extensivo	Sistema Intensivo	Valor de P
IGF-I	(-/-)	34.9%	18.2%	<0,001
<i>Sna</i> BI	(+/-)	48.3%	41.3%	
	(+/+)	16.8%	40.5%	

Nicolini et al. (2013)

Frequência Semi-extensivo

(-/-)	0.33%
(+/-)	0.59%
(+/+)	0.07%

Resultados e Discussão

❖ **STAT5A BstEII (-/-)** genótipo apresentaram uma **maior** frequência no sistema semi-extensivo

Tabela 3 - Frequência genotípica e alélica de STAT5A BstEII nos animais dos diferentes sistemas de manejo avaliados.

	Genótipo/Alelo	Sistema Semi-Extensivo	Sistema Intensivo	Valor de P
STAT5A BstEII	(-/-)	30.9%	11.9%	<0,001
	(+/-)	34.9%	41%	
(+/+)	34.2%	47.1%		
	(-)	0.5	0.3	0.02
	(+)	0.5	0.7	
	H-W	<0.0001	0.18	



❖ As vacas do sistema **semi-extensivo** estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg;

❖ As vacas do sistema **Intensivo não** estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg;



Manejo pode ter influenciado a adaptação
ou
A seleção dos touros

❖ É necessário estudos maiores, para definir genótipos melhor adaptados a condições ambientais e sistemas.



Sistema Semi-Extensivo

- ❖ Média de IPC: $109 \pm 8,2$ dias;
- ❖ Média de nº IA/prenhez: 2.13 ± 0.2 ;

Sistema Intensivo

- ❖ Média de IPC IA: $127,3 \pm 9,3$ dias;
- ❖ Média de IPC TE: $232,7 \pm 15$ dias;
- ❖ Média de nº IA/prenhez: $2,5 \pm 0,2$;
- ❖ Média de PCPP: $66,2 \pm 1,6$ dias;

Resultados
e Discussão



❖ **Sistema Semi-Extensivo**

- Não houve diferença entre os genótipos em relação IPC e n^o IA/Prenhez ($P > 0,05$);

❖ **Sistema Intensivo**

- Não houve diferença entre os genótipos GHR/A/lul e IGF/Snabl Sobre IPC, n^o IA/Prenhez e PCPP ($P > 0,05$);



Hipótese:

Sistema Intensivo: ↓ Expressão de GHR



**Resultados
e Discussão**

Sistema Intensivo = ↑ Produção e ↑ Exigência Metabólica = ↑ BEN ↓ Insulina

Porém... não foi confirmada = não houve associação dos genótipos GHR e IGF-I com IPC;

Os trabalhos de Schneider e Nicolini et al. (2013):

Menor número de animais = maior controle experimental



Erros na identificação de Prenhez;

Re-inseminação em intervalo mais curto;

Neste experimento = Maior População de Animais



Falhas na detecção de cio e erros nos protocolos de
IATF e TETF



Atraso na Concepção

=

Ofusca os efeitos
positivos do genótipo

Porém...

Resultados
e Discussão

❖ Sistema Intensivo

Tabela 5 - Intervalo PCPP em relação ao genótipo STAT5A BstEII

STAT5A BstEII	PCPP
(-/-)	71.0± 2.9 ≠
(+/-)	64.0± 1.5
(+/+)	64.0± 1.4

$P=0.03$



Relembrando

Tabela 3 - Frequência genotípica e alélica de STAT5A BstEII nos animais dos diferentes sistemas de manejo avaliados.

	Genótipo/ Alelo	Sistema Semi- Extensivo	Sistema Intensivo	PCPP	Valor de P
STAT5A BstEII	(-/-)	30.9%	11.9%	71.0± 2.9	P<0.03
	(+/-)	34.9%	41%	64.0± 1.5	
	(+/+)	34.2%	47.1%	64.0± 1.4	
	H-W	<0.0001	0.18		



Possibilidade!

BstEII (+)

- ❖ A frequência dos genótipos (-/-) de todos os genes foram maiores para no sistema semi-extensivo;
- ❖ *BstEII* (+/-) e (+/+): menor intervalo PCPP em comparação com (-/-).

***BstEII* (+) → Marcador Molecular**

- ❖ Mais estudos são necessários... para validar estes marcadores antes de considerar a sua utilização em programas comerciais de criação de animais



Trabalhos do Nupeec

The Veterinary Journal 205 (2015) 101–103



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj



Short Communication

Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (*PON1*) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows



Pedro A.S. Silveira^a, Elizabeth Schwegler^b, Paula Montagner^a, Ana R.T. Krause^c,
Diego A.V. Acosta^d, Jéssica Halfen^d, Tiago Garlet^a, Carlos C. Barros^e, Marcio N. Corrêa^a,
Augusto Schneider^{e,*}

Trabalhos do Nupeec

Objetivo:

Caracterizar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora do gene PON1 e determinar a sua relação com a atividade sérica PON1.

Resultados:

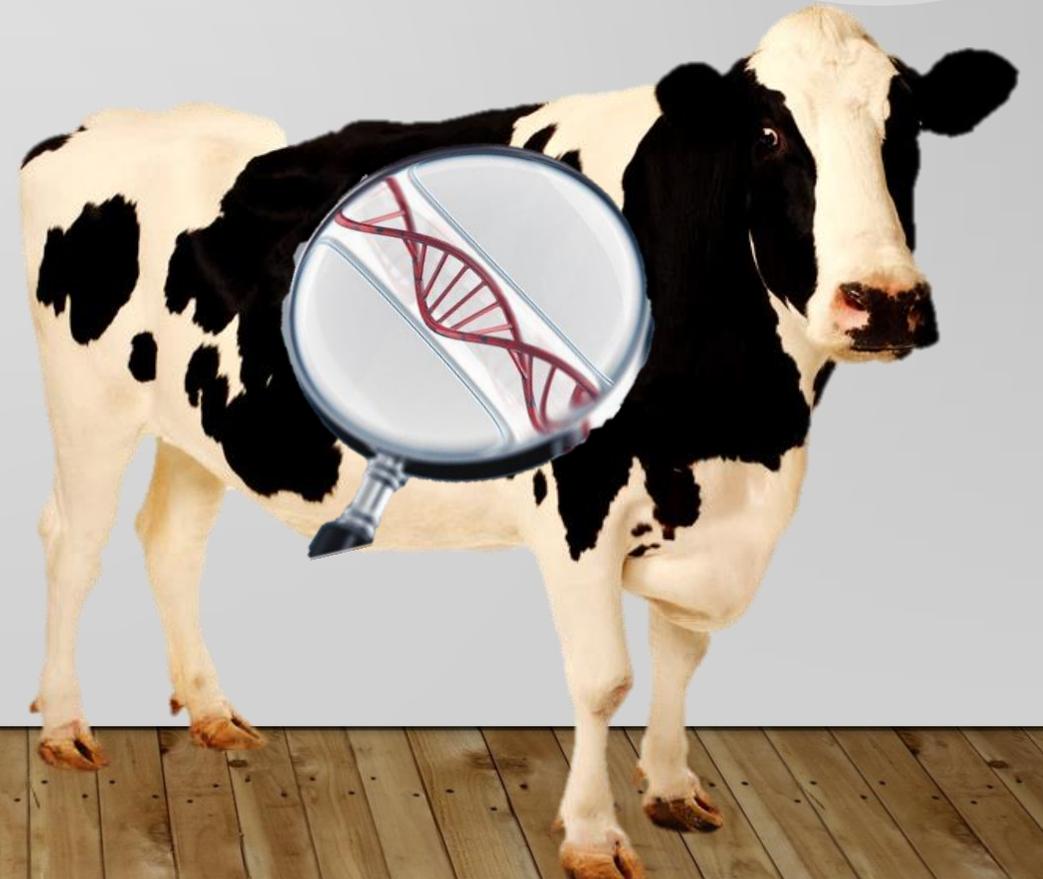
7 SNPs foram identificados na região promotora do gene PON1;
Localizados nas posições: -22, -105, -176, -221, -392, -611 e -674;

Acredita-se que estão envolvidos na resposta de fase aguda



Considerações Finais

- ✓ Melhoramento Genético;
- Temos um longo caminho pela frente;
- Mas, estamos no caminho certo!



A landscape photograph featuring a vast green field under a dramatic, cloudy sky. In the foreground, two black and white cows are grazing. The text 'Muito Obrigada!' is centered in the middle of the image.

Muito Obrigada!

E-mail: adidallacosta@gmail.com; thais_casarin@hotmail.com