



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA



Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

Mutações no gene *STAT5A* estão associadas com a sobrevivência embrionária e produção de leite

Apresentação: Arthur Silva e Thaís Casarin
Orientadores: Joao Alvarado e Lucas Hax

Pelotas, 31 de outubro de 2013



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



J. Dairy Sci. 91:784–793

doi:10.3168/jds.2007-0669

© American Dairy Science Association, 2008.

Mutations in the *STAT5A* Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk Composition in Cattle

H. Khatib,^{*1} R. L. Monson,[†] V. Schutzkus,^{*} D. M. Kohl,[†] G. J. M. Rosa,^{*} and J. J. Rutledge[†]

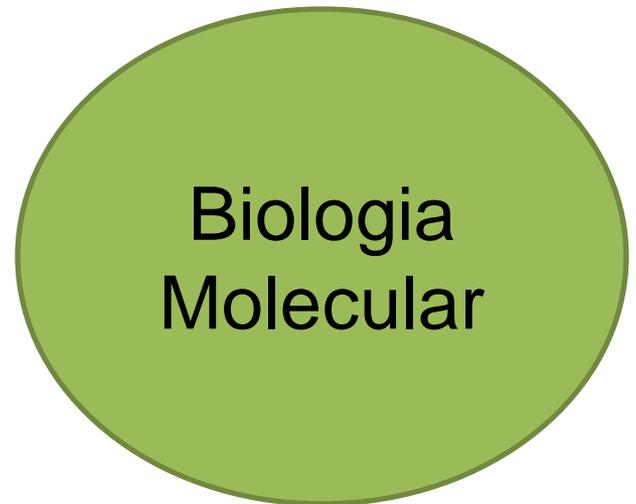
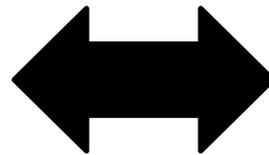
^{*}Department of Dairy Science, and

[†]Department of Animal Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison 53706

Fator de Impacto: 2,24

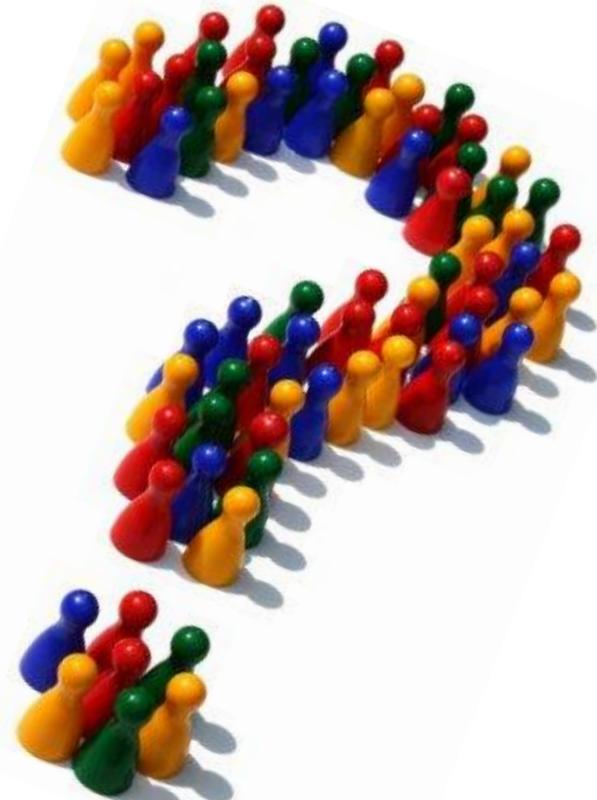


INTRODUÇÃO

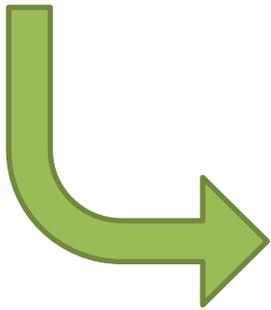




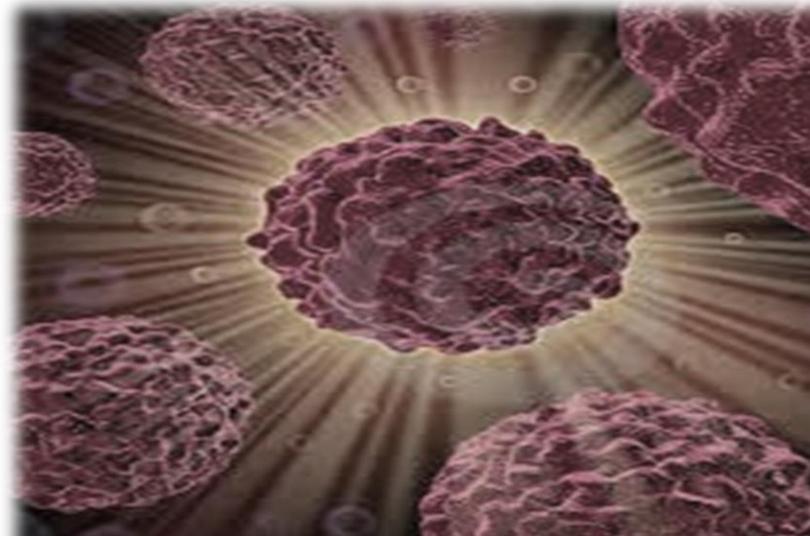
Sinalização Celular



Sinalização Celular



Complexo sistema de comunicação, que governa e coordena as funções celulares





INTRODUÇÃO



Sinalização Celular:

- ↳ Sinal Químico → Um ligante químico que se liga a um receptor e o ativa.
- ↳ Sinal Elétrico → Um receptor ativo transduz o estímulo em um sinal químico dentro da célula, essa transdução converte o sinal de um tipo de sinal (elétrico) em outro sinal (químico).

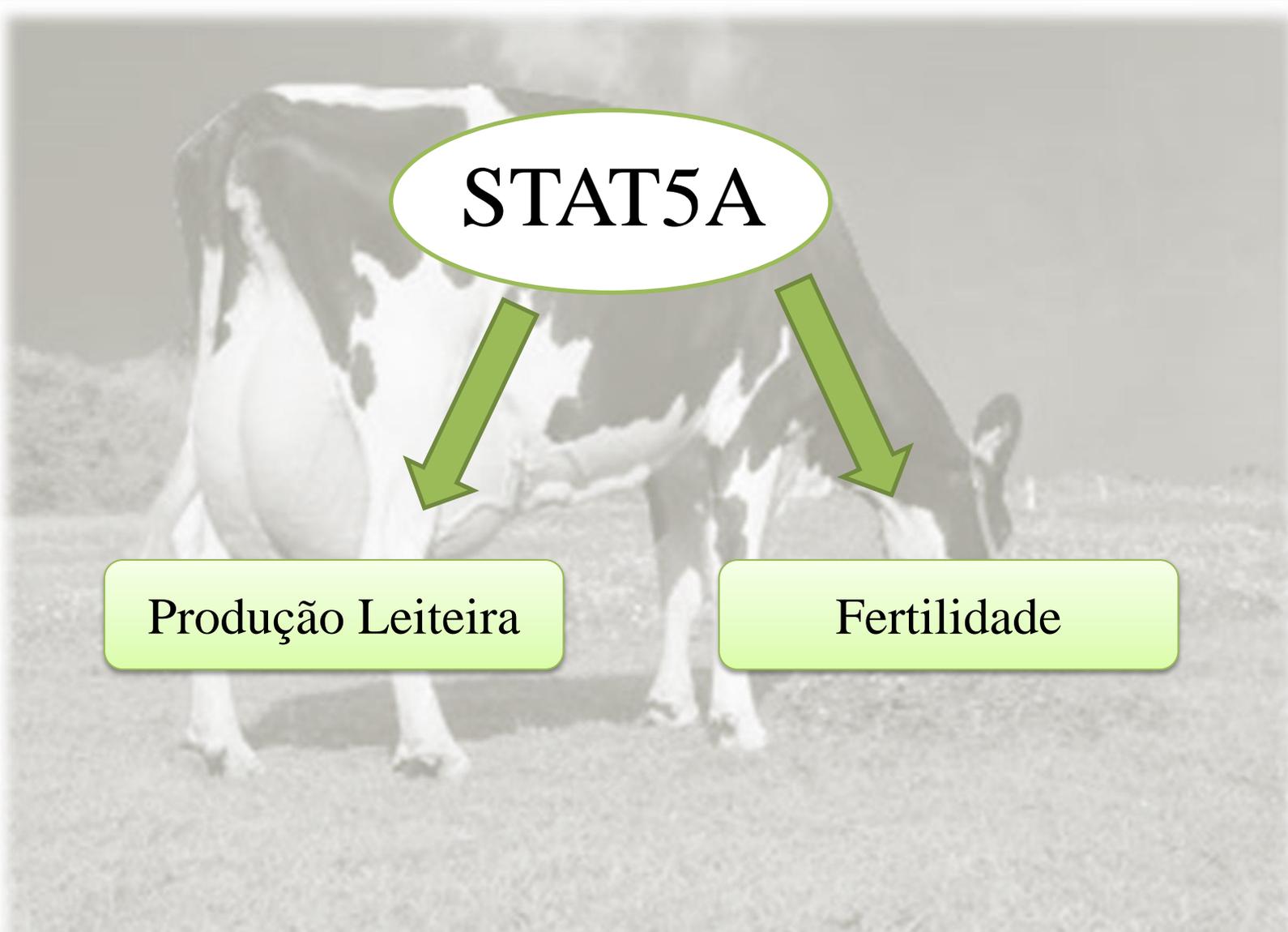
Gene STAT



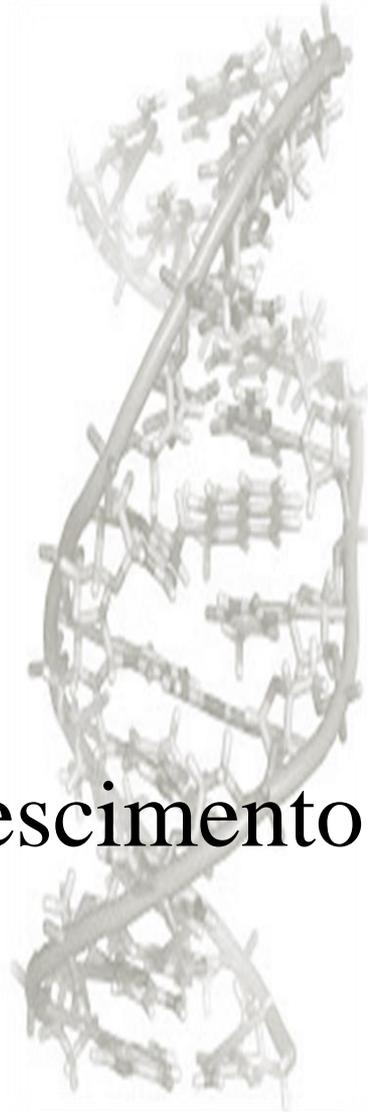
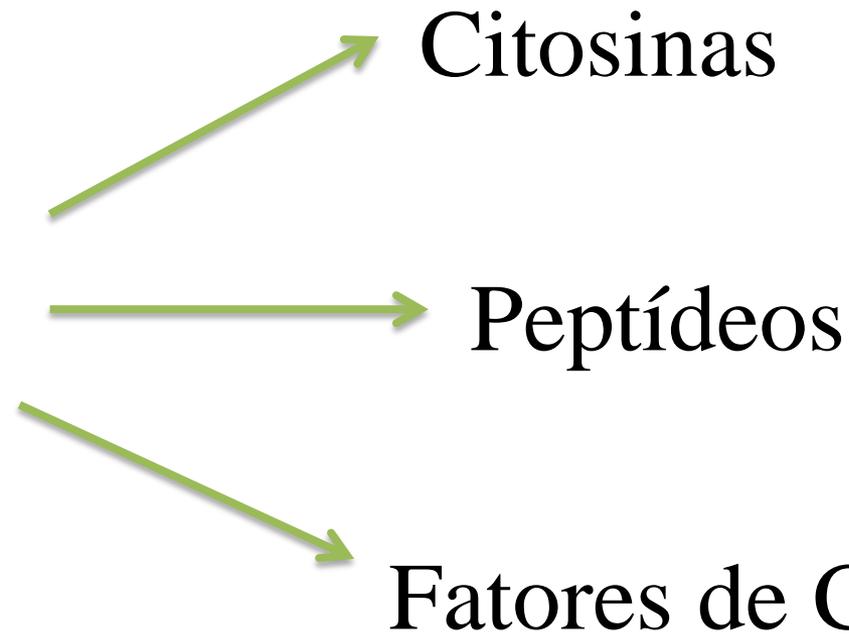
- * Transdutor de sinal no citoplasma;
- * Ativador de transcrição no núcleo

Em Mamíferos → STAT corresponde a uma família de 7 genes de estruturas e funções diferente

Porém...

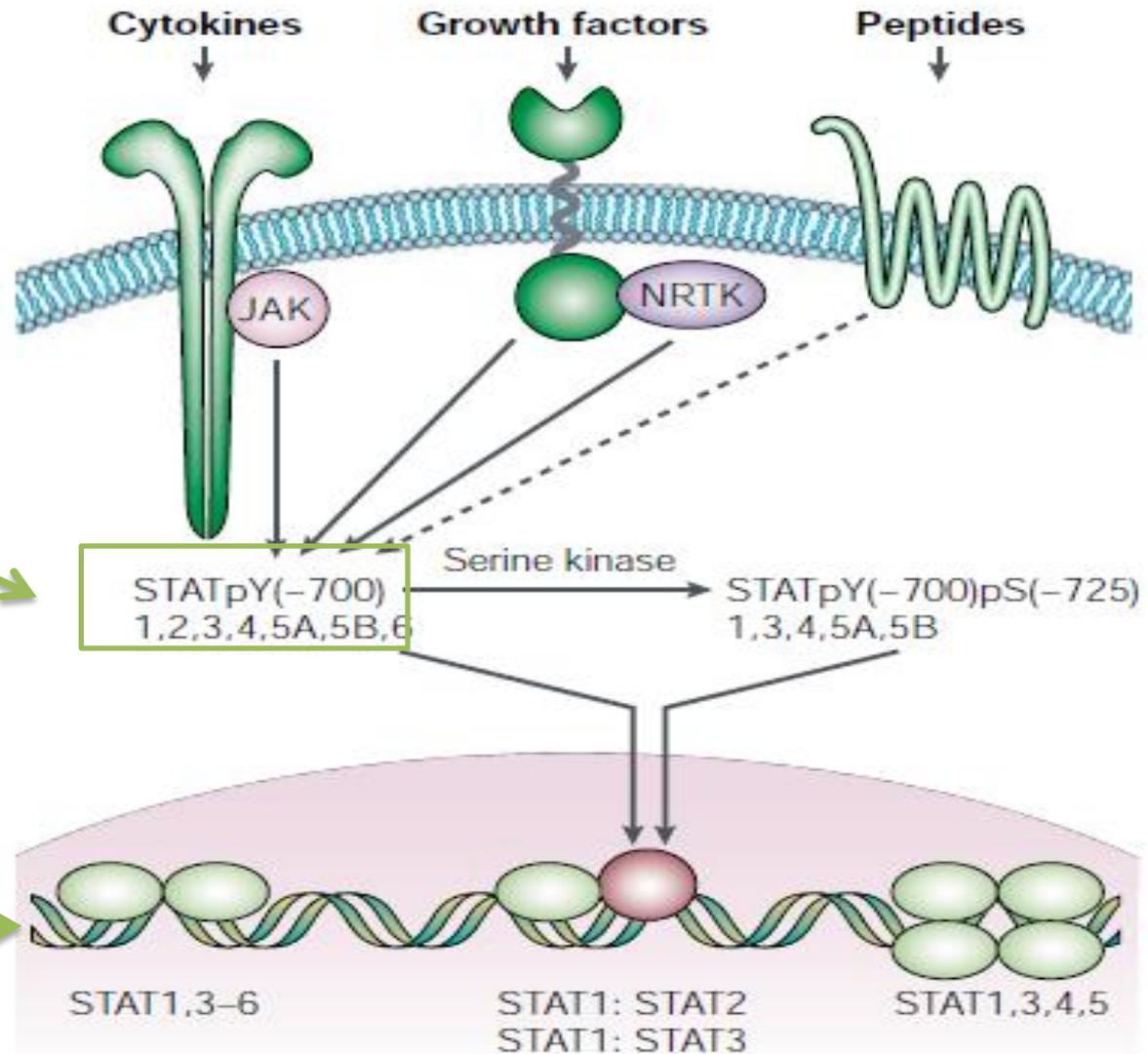


Ativadores do
gene STAT5A





INTRODUÇÃO



Transdutor
de sinal no
citoplasma

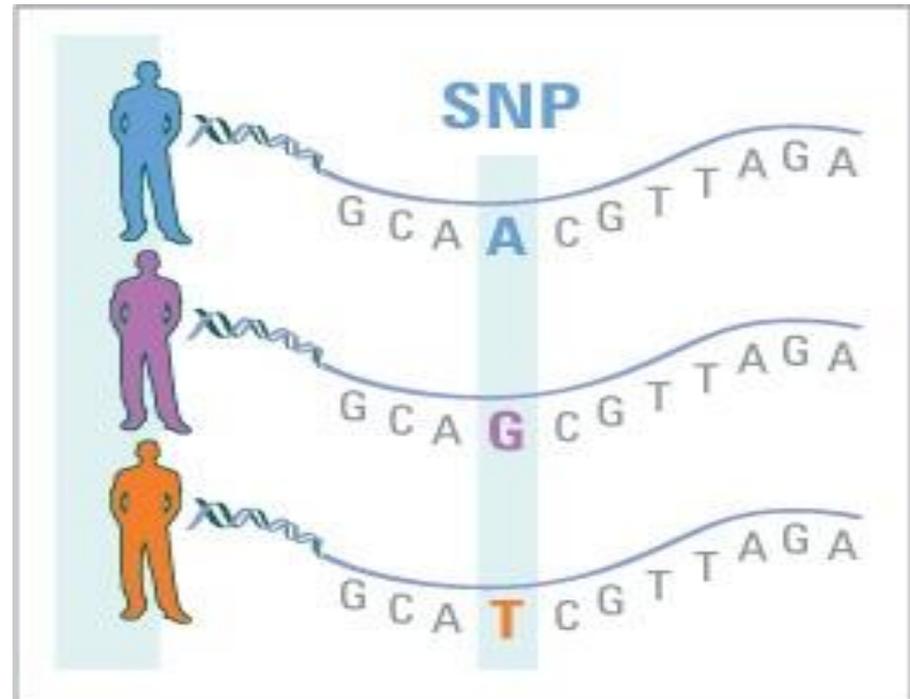
Ativador de
transcrição
no Núcleo



SNPs

- Tipo mais comum de variação gênica;
- Ocorre normalmente a cada 300 nucleotídeos;
- 3 bilhões de nucleotídeos = 10 milhões de SNPs

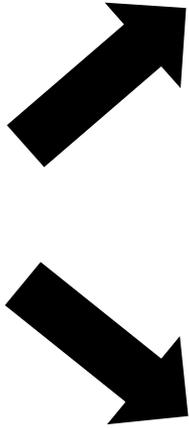
Single-nucleotide
Polymorphism



INTRODUÇÃO



DNA

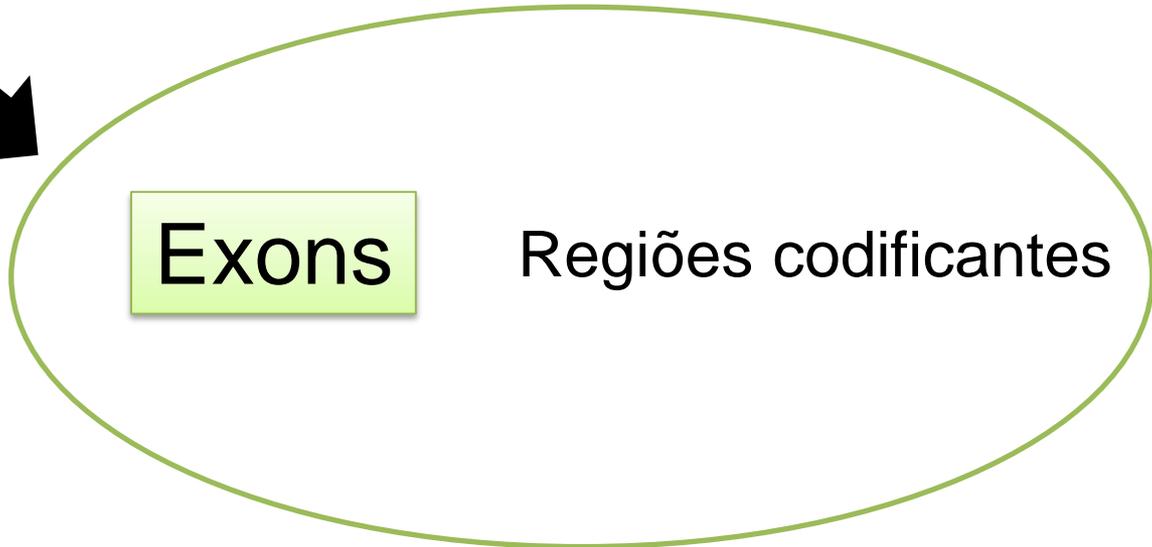


Introns

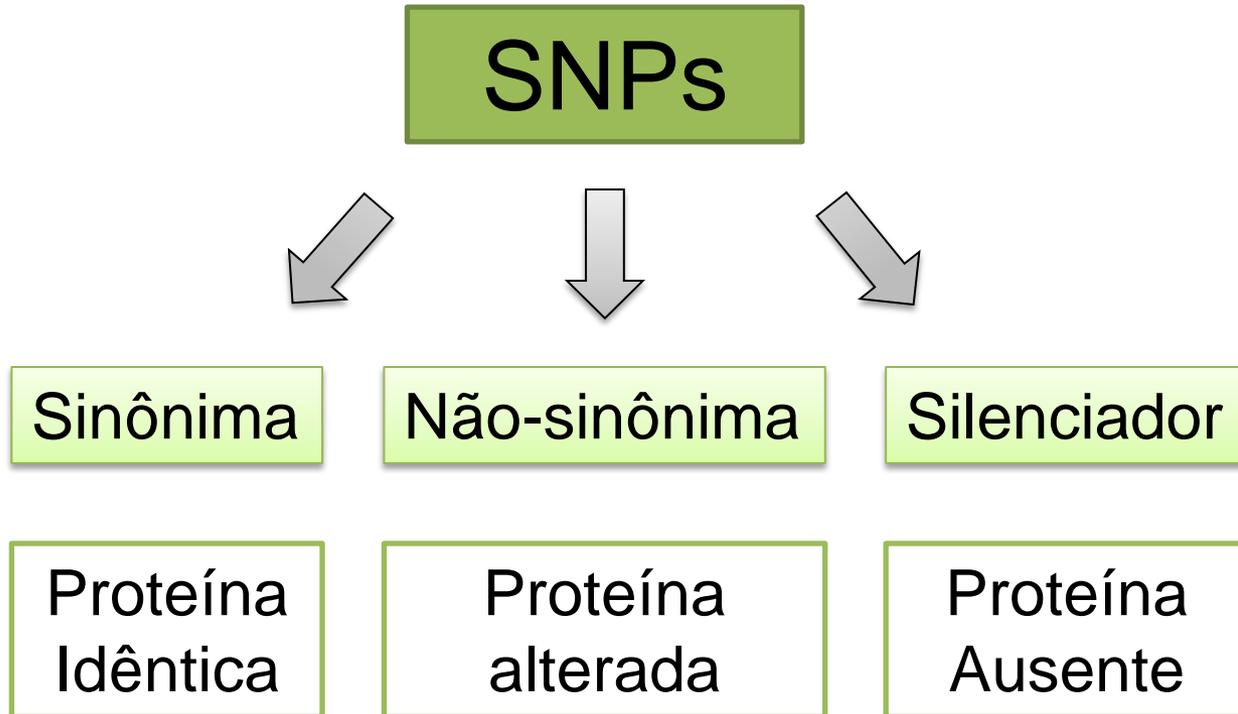
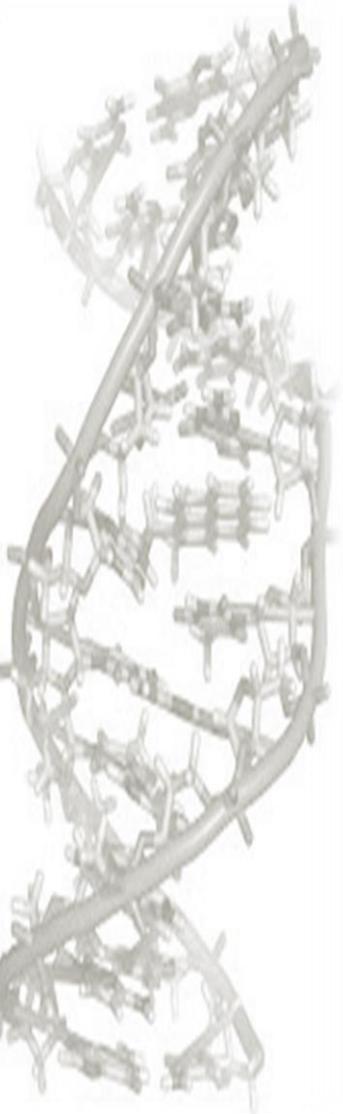
Regiões não-codificantes

Exons

Regiões codificantes



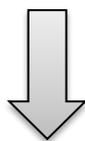
INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO



SNPs



Marcadores moleculares de doenças e
características fenotípicas



INTRODUÇÃO



STAT5A

Faz parte da rota de sinalização no útero

=

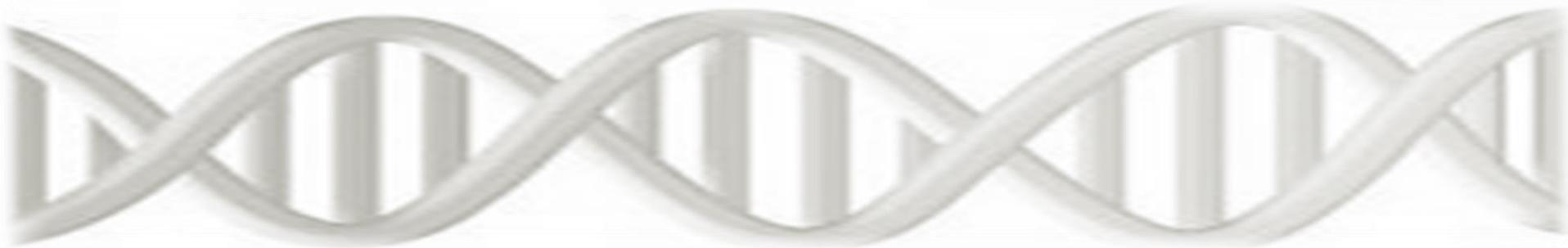
Interferon- γ e Lactogênio placentário



INTRODUÇÃO



- O que é Lactogênio placentário?
- Qual a sua função ?



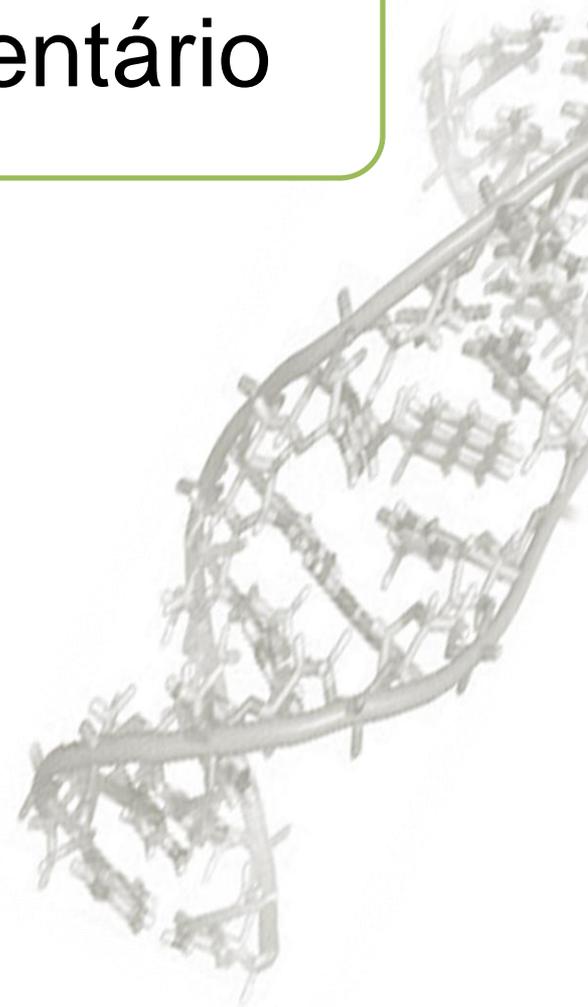


INTRODUÇÃO



Lactogênio Placentário

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





INTRODUÇÃO



- O que é Interferon-t?
- Qual a sua função?





INTRODUÇÃO



Interferon-t

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



INTRODUÇÃO

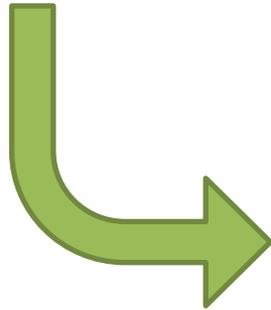


No Útero

Lactogênio Placentário

II

Estímula a produção do gene STAT5A



Induz a transcrição da proteína do leite, através da regulação da expressão dos genes (Utmp) e (OPN)



INTRODUÇÃO



UTMP, uterine milk proteins

- Secretadas pelo endométrio;
- Secreção regulada pela progesterona;
- Funções pouco elucidadas, que podem envolver:
 - ✓ Inibição de proteases, nutrição do concepto, controle do crescimento, supressão do sistema imune materno.



INTRODUÇÃO



Gene Osteopontin (OPN)

Em bovinos da raça Holandês:

*Desenvolvimento da glândula mamária;

*A proteína deste gene possui multiplicidade de funções, com expressão em diversos tecidos;

ex: plasma seminal em bovinos
crescimento e remodelação óssea em humanos,



INTRODUÇÃO



OSTEOPONTIN



↓
**Período
inicial da
lactação**

↑
Após o parto

- **Relacionado com a caracterização do leite:**

➔ Polimorfismo em um único par de base (SNP) no íntron 4 → associado com o aumento da produção de gordura e de proteína no leite;



Tese do Vinícius Tabeleão

Hipótese: A suplementação de vacas leiteiras com Catosal B12® no pós-parto aumenta a produção de leite devido ao aumento de síntese de caseína e lactose.



Expressão do
gene OPN

=

Produção das proteínas:
 β -caseína e K-caseína

(Sheehy et al., 2009)



RESUMO



Interferon – t + Lactogênio Placentário



OPN e UTMP



Objetivo do Artigo



Objetivo: Avaliar as mutações no gene do STAT5A associadas com a produção de leite e características reprodutivas em gado leiteiro, usando testes de associação e fertilização in vitro.





Materiais e Métodos



- Foram coletados ovários de 160 vacas da raça Holandês → Abatedouro de Wisconsin – USA
- Extração de DNA (ovários) e identificação dos polimorfismo no gene STAT5A;
- Fertilização in vitro (FIV) – sêmen de 3 touros;
- Foi feita a genotipagem das vacas e dos touros para as mutações previamente identificadas no gene do STAT5A;
- Avaliação dos ovócitos submetidos a FIV – associação com a genotipagem dos pais com a sobrevivência embrionária e ovos não fertilizados, através do método aGLM (McCullagh e Nelder, 1989);



- A **extração de DNA** → trituração dos ovários (30 a 100mg de cada ovário);
(Kit Genomic Aquapure DNA)

PCR → Amplificação de éxons e íntrons da região desejada do gene – Primers
(Kit BigDye terminator)

- **FIV** → Óocitos foram aspirados de folículos antrais (>2 a 6mm) - Fertilização no dia 0 e avaliação de desenvolvimento do embrião no dia 7;



ATIVIDADES RELACIONADAS COM O NUPEEC

Referente ao trabalho do Joao





ATIVIDADES RELACIONADAS COM O NUPEEC



“Efeito da adição de diferentes níveis de PON1 em um protocolo de fertilização in vitro sob a qualidade oocitária e embrionária”

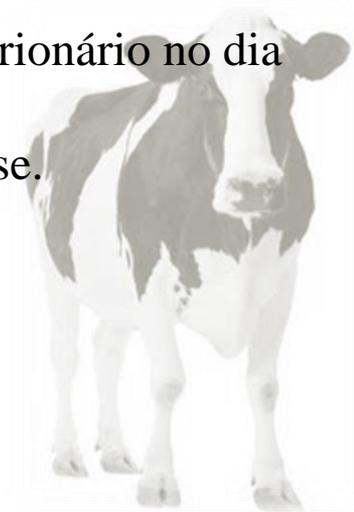
Estudos em mulheres têm indicado a atividade da PON1 como preditor positivo da qualidade do embrião e o número de células no dia da transferência de embriões, sugerindo que a PON1 pode exercer efeitos protetores em geral, especialmente relacionados ao estresse oxidativo.

Metodologia:

- Aspiração folicular
- Seleção oócitos viáveis
- MIV e adição de PON1
- FIV
- CIV e adição de PON1
- Avaliação de desenvolvimento embrionário no dia 7
- PCR
- Quantificação gênica

Avaliando:

- Taxa de clivagem.
- Desenvolvimento embrionário no dia 7.
- Marcadores de apoptose.





Materiais e Métodos



Genotipagem do embrião

- DNA genômico – a partir do dia 7 = Genotipagem dos embriões – SNP 12195 (G/C)
- No éxon 8 – primers STATF1 e STATR1

Nested PCR

Amplificação genômica:

- 3 μ L do DNA embrionário
- 50ng de primer
- 200 μ L de DNTP
- 5,0 μ L de 5X buffer
- 1.5 μ L de Taq DNA polimerase





Materiais e Métodos



Ciclos de temperatura da PCR

- 95 °C por 5 min;
 - 92 °C por 45 seg – 32 ciclos;
 - 65 a 53 °C – 45 seg
 - 72 °C – 45 seg
 - 72 °C – 7 min
- Foi feito “nested PCR” = nova amplificação em certas regiões



Atividades Relacionadas ao NUPEEC



Trabalho do Lucas Hax :

Enzima de restrição → BstEII

STAT5A atua na sinalização do GHR



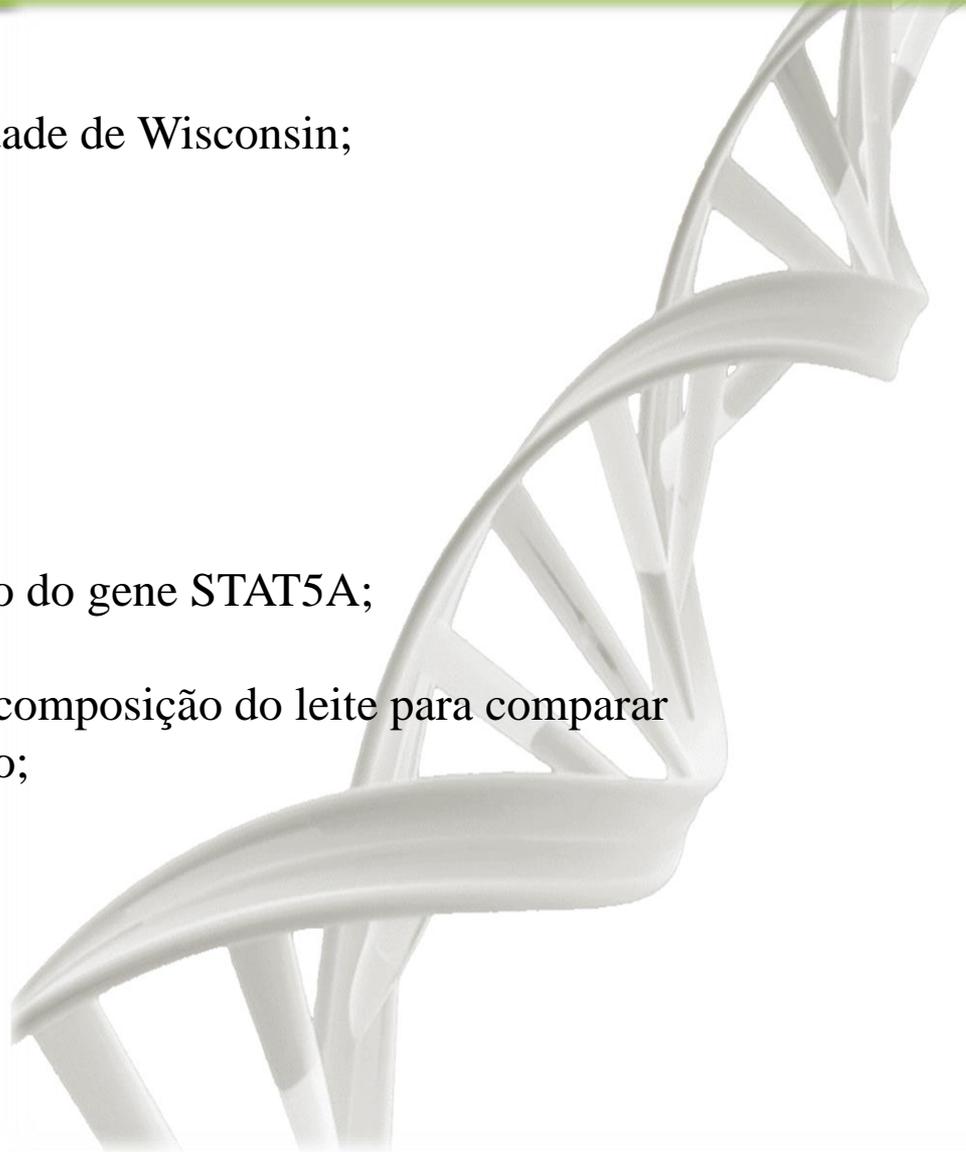
Expressão de IGF-I



Segundo experimento



- Foi utilizado 887 vacas da universidade de Wisconsin;
- Coleta de sangue;
- Extração de DNA;
- PCR;
- Genotipagem quanto á polimorfismo do gene STAT5A;
- Utilizou-se os dados de produção e composição do leite para comparar com a genotipagem do polimorfismo;





Resultados e Discussão



1º Experimento

- 1.551 embriões foram produzidos por FIV;
- Nos ovários coletados - análise de 12 SNPs

TOURO	NÚMERO DE POLIMORFISMOS	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA
1	7	✓
2	5	✓
3	2	✓

- 15.291 pares de bases sequenciados do genoma de STAT5A
 - ✓ 12 SNPs (11 Introns, 1 Exon)

Table 2. Embryonic survival and unfertilized ova (UFO) ratios and genotypes of cows and sires for the 12 single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *STAT5A* gene

SNP/sire	Sire genotype	Dams' genotypes	Embryonic survival rate	Total embryos	UFO ratio	Total embryos and UFO
SNP3117						
Sire 1	AG	AA	0.28 ^b	188	0.41 ^a	317
		AG	0.21 ^b	95	0.38 ^{ab}	152
		GG	→ 0.46 ^a	200	0.30 ^b	285
Sire 2	GG	AA	0.42 ^a	124	0.35	192
		AG	0.27 ^b	139	0.37	219
		GG	→ 0.43 ^a	75	0.31	109
Sire 3	GG	AA	0.37 ^{ab}	188	0.36 ^a	293
		AG	0.42 ^a	281	0.30 ^a	399
		GG	→ 0.32 ^b	248	0.20 ^b	309
SNP12195						
Sire 1	GC	CC	→ 0.52 ^a	144	0.3	207
		GC	0.22 ^b	224	0.39	368
		GG	0.29 ^b	136	0.39	223
Sire 2	CC	CC	→ 0.44	96	0.31	140
		GC	0.33	138	0.34	208
		GG	0.34	96	0.43	168
Sire 3	GC	CC	→ 0.36	147	0.33	218
		GC	0.41	333	0.30	474
		GG	0.39	133	0.35	206

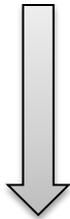


Resultados e Discussão



- **Apenas dois SNPs com efeitos similares (SNP3117 e SNP13244)**
 - ✓ Controle embrionário do STAT5A.
 - ✓ Interação de outro SNP em genes da região.
 - ✓ Forte associação com fertilização e ao mesmo tempo demonstra baixa associação com sobrevivência embrionária.

Distorção de segregação
entre genótipo parental



Seleção pré-zigótica de gametas
do touro (incompatibilidade)

Table 3. SNP12195 genotypes of embryos produced from sires 1, 2, and 3

Sire	Genotype	Dams' genotypes	Embryo genotype			χ^2 test (P-value)
			CC	GC	GG	
1	GC	CC	10	4	—	(0.108)
		GG	—	4	15	(0.011)
		GC	1	2	2	
2	CC	CC	23	—	—	
		GG	—	7	—	
		GC	11	15	—	(0.432)
3	GC	CC	8	1	—	(0.019)
		GG	—	14	2	(0.002)
		GC	13	13	0	(0.001)



Resultados e Discussão



Mecânismo de controle da sobrevivência embrionária:

Pré-fertilização

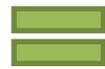
✓ Baixa fertilidade
através de fatores
de maturação de espermatozoides

Pós-fertilização

✓ Incompatibilidade
de gametas
Evitando a fusão de pró-núcleos

2º Experimento

Na região SNP12195 do
STAT5A



↓ % gordura e proteína do leite
($p < 0.01$)



Table 4. Estimates (\pm SE) of the allele substitution effect of single nucleotide polymorphisms (SNP) 14217 and 12195 for production traits in the UW resource population

Trait	SNP12195	SNP14217
Fat yield (kg)	-1.75 \pm 2.48	1.80 \pm 2.34
Fat (%) \longrightarrow	-0.0186 \pm 0.0090*	-0.0031 \pm 0.0084
Milk yield (kg)	82.8 \pm 64.6	69.1 \pm 60.9
Protein yield (kg)	0.01 \pm 1.74	1.20 \pm 1.64
Protein (%) \longrightarrow	-0.0101 \pm 0.0042*	-0.0035 \pm 0.0040
SCS	0.0226 \pm 0.0130 [†]	0.0190 \pm 0.0124

[†] $P < 0.10$; * $P < 0.05$.



Conclusão



STAT5A:

- Difícil identificação
 - ✓ Morte embrionária precoce
- Relacionado a composição do leite e infertilidade
 - ✓ Poucas evidências de correlação entre os dois efeitos
- Primeiro gene encontrado com atividade dupla (leite e fertilidade)
 - ✓ Destaque para o Alelo G do SNP12195 (Exônico)
- Queda de 55% para 35% na taxa de concepção nas últimas duas décadas nos EUA



Obrigada!!!!



arthurcjs@hotmail.com
thais_casarin@hotmail.com