

## EFEITO DO POLIMORFISMO GHR *ALUI* NA INCIDÊNCIA DE MASTITE EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS

LUCAS TEIXEIRA HAX<sup>1</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>1</sup>; CAROLINA BESPALHOK JACOMETO<sup>1</sup>; PATRÍCIA MATTEI<sup>1</sup>; THAÍS CASARIN DA SILVA<sup>1</sup>; MARCIO NUNES CORRÊA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [lucashax@gmail.com](mailto:lucashax@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [marcio.nunescorreia@pesquisador.cnpq.br](mailto:marcio.nunescorreia@pesquisador.cnpq.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma enfermidade que gera um elevado prejuízo econômico para a cadeia produtiva do leite (BECK et al., 1992; JANZEN, 1970; KIM & HEALD, 1999; KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997; LESCOURRET & COULON, 1994; SHOOK, 1989). Dessa forma, a incidência de mastite apresenta um forte impacto no custo de produção do leite (COLDEBELLA et al 2004; Grohn et al 2000).

A ocorrência dessa enfermidade é determinada pelo manejo de ordenha, ambiente de criação dos animais, número de lactações que o animal apresenta, entre outros (BARTTLET et al 1990). Além disso, o desenvolvimento do tecido mamário é modulado por fatores endócrinos (AGGREY ET AL 1999) que podem afetar a susceptibilidade da glândula mamária à ação de agentes agressores.

Um dos hormônios que afeta a lactogênese é o Hormônio do Crescimento (GH) (AGGREY ET AL 1999). Características do leite são afetadas por variações na sequência do gene que codifica o GH (LAGZLEL ET AL 1996). O GH é um hormônio polipeptídico que exerce sua atividade biológica através do seu receptor GHR (AGGREY ET AL 1999). Dessa forma, alterações na sequência do gene que codifica para o receptor de GH (GHR) afetam o desenvolvimento do tecido mamário (FELDMAN ET AL 1993). Em vacas holandesas da Itália, foi observada uma associação entre variações na sequência do gene que codifica para GHR e o percentual de proteína no leite (FALAKI ET AL 1996).

Por essas razões, o GHR se apresenta como um gene candidato para a pesquisa de alelos favoráveis para seleção genética em nível de DNA (AGGREY ET AL 1999). Um estudo identificou a existência de uma transversão na região promotora do GHR. Essa mutação é a troca de uma adenina por uma timina, a qual ocorre upstream na posição -1182 do GHR (MAJ ET AL 2008). Os elementos da região promotora do gene são importantes na determinação da expressão gênica (COOPER 1992) e consequente efetivação da sua função biológica.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do polimorfismo *Alul* no gene do GHR na incidência de mastite de vacas da raça Holandês.

### 2. METODOLOGIA

Foram avaliados os dados referentes ao ano de 2011 de 221 vacas da raça Holandês com até seis lactações de uma propriedade do sul do Brasil. Os dados foram fornecidos pelo responsável pelos animais mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O presente trabalho foi regularmente inscrito no Comitê de Ética da UFPel sob o número 10516.

Os dados foram coletados do *software* de gestão da fazenda ALPRO<sup>®</sup> Herd Management System DeLaval. Foram coletadas as informações de incidência de mastite, produção de leite e número de lactações.

Os animais foram criados em sistema semi-extensivo, no qual a dieta foi baseada em pastagens cultivadas de acordo com a estação do ano. Os animais eram suplementados com concentrado e sal mineral para ajuste da exigência nutricional de cada categoria segundo o NRC (2001).

Para obtenção do DNA foi realizada uma coleta de sangue de cada animal por punção da veia coccígea. De uma alíquota de 500uL de sangue foi realizada a extração do DNA. Para determinação dos alelos de GHR *Alul* foi amplificado um fragmento de 836-pb utilizando os *primers*: *Forward*: TGCGTGACAGCAGCTCAACC e *Reverse*: AGCAACCCCACTGCTGGGCAT. As reações de PCR foram efetuadas com um volume final de 20µL (Taka Ex Taq, Takara Bio Inc, Otsu, Japan). A temperatura de anelamento do *primer* foi de 66°C. Os fragmentos de GHR amplificados passaram por digestão em uma reação contendo 7µL do produto da PCR e 3 unidades da enzima de restrição *Alul* (New England Biolabs, UK) a 37°C por três horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram impregnados com Gel Red e separados em gel de agarose a 1,5% juntamente com um padrão de peso molecular de 100-pb em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos digeridos e visualização por exposição à 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 para o GHR foram: *Alul* (+/+): 602pb, 145pb, 75pb; *Alul* (-/-): 747pb, 75pb; *Alul* (+/-): 747pb, 602pb, 145pb, 75pb (Aggrey et al., 1999).

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS (Institute Inc. Cary, NC, USA, 2002). A avaliação da produção de leite entre os genótipos foi realizada através do método ANOVA. Foi utilizado o teste do Chi-Quadrado para análise da incidência de mastite entre os animais de cada genótipo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência de mastite não foi diferente entre os animais de diferentes genótipos ( $P > 0,05$ ). Os dados de incidência de mastite entre os diferentes genótipos estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Animais com e sem mastite de acordo com os genótipos de GHR *Alul*

Genótipo	Animais com mastite	Animais sem mastite	Total
GHR <i>Alul</i> (+/+)	37 25,35%	20 26,76%	57
GHR <i>Alul</i> (+/-)	85 58,22%	48 64,00%	133
GHR <i>Alul</i> (+/-)	24 16,44%	7 9,33%	31

$P > 0,05$

Não houve diferença na produção de leite dos animais com e sem mastite entre os diferentes genótipos ( $P > 0,05$ ), indicando que não houve diferença no desafio lactogênico dos animais. Os dados de produção de leite podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Produção de leite ajustada para 305 dias dos animais com e sem mastite de acordo com os genótipos de GHR *Alul*

Genótipo	Animais com mastite	Animais sem mastite
GHR <i>Alul</i> (+/+)	6063,45 L	5839,97 L
GHR <i>Alul</i> (+/-)	6043,00 L	5961,25 L
GHR <i>Alul</i> (-/-)	5544,00 L	6170,00 L

$P > 0,05$

Os estudos que observaram associação entre polimorfismos no GHR e características da lactogênese trabalharam com animais de alta produção em regime intensivo. Tal condição de manejo eleva o desafio da glândula mamária, deixando a mesma mais susceptível à ação de patógenos e desenvolvimento de mastite.

Os animais avaliados nesse estudo foram manejados em sistema semi-extensivo. Conseqüentemente, as vacas avaliadas apresentaram uma baixa produção total na lactação. Provavelmente, o tecido mamário menos desafiado não foi desgastado ao ponto de aumentar a sua susceptibilidade à infecção. Com um desafio menor, o efeito do polimorfismo GHR *Alul* pode não ter sido relevante a ponto de interferir na ocorrência de mastite.

#### 4. CONCLUSÕES

Não foi observada associação entre o polimorfismo GHR *Alul* e a incidência de mastite em vacas da raça Holandês. Novos estudos com vacas com maiores níveis de produção e conseqüentemente maior desafio para a glândula mamária podem melhor elucidar o efeito dessa mutação na incidência de mastite e assim determinar sua eficácia como marcador molecular para seleção genética.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGREY, S.E.; YAO, J.; SABOUR, M.P.; LIN, C.Y.; ZADWORNÝ, D.; HAYES, J.F.; KUHNLEIN, V.. Markers within the regulatory region of growth hormone receptor gene and their association with Milk-related traits in Holsteins. **The American Genetic Association**. 90:148 – 151, 1999.
- BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y.; ANDERSON, C. R. Milk production an somatic cell count in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, V. 73, n.10, p. 2794-2800, 1990.
- BECK, H.S.; WISE, W.S; DOOD, F.H.. Cost-benefit analysis of bovine mastitis in UK. **Journal of Dairy Research**, V. 59, p. 449, 1992.
- COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMÉRITO, C.G.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.J.; MEYER, P.M.; CORASSIN, C.H.; CASSOLI, L.D.. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V.33, n. 3, p. 623-634, 2004.
- COOPER, D.N.. Regulatory mutations and human disease. **Ann Med**, 24: 427 – 437, 1992.
- FALAKI, M.; GENGLER, N.; SNEYERS, M.; PRANDI, A.; MASSART, S.; FORMIGONI, A.; BURNÝ, A.; PORTELLE, D.; REVAVILLE, R.. Relationship of polymorphism of growth hormone an growth hormone receptor genes with milk production traits for italian Holstein-fresian bulls. **Journal of Dairy Science**. 79:1446 – 1453, 1996.
- FELDMAN, M.; RUAN, W.; CUNNINGHAM, B.C.; WELLS, J.A.; KLEINBERG, D.L.. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinology**. 133:1602 – 1608, 1993.
- GRÖHN, Y.T., RAJALA-SCHULTZ, P.J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, p. 605-614, 2000.
- JANZEN, J.J. Economic losses resulting from mastitis. A review. **Journal of Dairy Science**, V. 53, n. 9, p. 1151-1161, 1970.
- KIM, T.; HEALD, C.W. Inducing inference rules for the classification of bovine mastitis. **Computers and Electronics in Agriculture**, V. 23, p. 27-42, 1999.
- KOSSAIBATI, M.A.; ESSLEMONT, R.J.. The cost of production diseases in dairy herds in Eglan. **The Veterinary Journal**, V. 154, p. 41-51, 1997.
- LAGZIEL, A.; LIPKIN, E.; SOLLER, M.. Association between SSCP haplotypes of the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**. 142:945 – 951, 1996.
- LESCOURRET, F.; COULON, J.B. Modelling the impacto of mastitis on Milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, V. 77, n. 8, p. 2289-2301, 1994.
- MAJ, A., SNOCHOWSKI, M., SIADKOWSKA, E., ROWINSKA, B., LISOWSKI, P., ROBAKOWSKA-HYZOREK, D., OPRZADEK, J., GROCHOWSKA, R., KOCHMAN, K., ZWIERZCHOWSKI, L., 2008. Polymorphism in genes of groth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression liver and its level in blood in Polish Holstein – Fresian cattle. **Neuroendocrinology Letters** 29, 6, 981-989.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirement of dairy cattle**. 7 ed. National Academy Press. Waschington. D.C. 2001. 381 p.
- SAS. **Statistical Analysis System**. SAS/STAT Users Guide, Release 9.1 Edition 2002. Cary, NC, USA, SAS Inst, Inc.
- SHOOK, G.E. Slection for disease resistance. **Journal of Dairy Science**, V. 72, n. 5, p. 1349-1362, 1989.