

## EFEITO DO POLIMORFISMO *BstEII* NO GENE *STAT5A* E *AluI* NO GENE *GHR* SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDÊS

LUCAS TEIXEIRA HAX<sup>1,2</sup>, AUGUSTO SCHNEIDER<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  
Universidade Federal de Pelotas – UFPel  
Campus Universitário – 96010 900

<sup>2</sup>[lucashax@gmail.com](mailto:lucashax@gmail.com), <sup>3</sup>[marcio.nunescorrea@gmail.com](mailto:marcio.nunescorrea@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na sequência dos genes que codificam proteínas do eixo somatotrófico têm sido associados à síntese e qualidade do leite (MAJ. et al, 2008). Dessa forma, tais genes têm sido estudados como candidatos a preditores em programas de seleção genética assistida por marcadores moleculares (MAJ. et al, 2008).

A ação do hormônio do crescimento (GH), integrante do eixo somatotrófico, em seus tecidos alvo é mediada principalmente pelo fator de transdução e ativador de transcrição 5A (STAT5A). Dessa forma, o GH ligado ao seu receptor, receptor do hormônio do crescimento (GHR), estimula a síntese do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) que atua em diversos tecidos (ARGETSINGER et al, 1996). Um dos tecidos afetados pelo eixo somatotrófico é a glândula mamária (AGGREY et al 1999). FALAKI (1996) e demais autores identificaram uma diferença no percentual de proteína no leite de vacas holandesas com diferentes sequências no gene que codifica para GHR.

Já o STAT5A, também conhecido como fator da glândula mamária, é responsável, dentre outras funções, pela regulação da expressão gênica da proteína do leite (WATSON 2001). O STAT5A está envolvido na transdução de sinal de diferentes células, incluindo o útero e o epitélio da glândula mamária (SPENCER and BAZER 2002). Segundo SPENCER and BAZER (2002), o STAT5A induz a expressão dos genes como o *bovine uterine milk protein* (UTMP) e o *osteopontin* (OPN), cujos transcritos possuem marcado efeito na produção e composição do leite (KHATIB ET AL 2007a,b).

O objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre os polimorfismos *BstEII* no gene *STAT5A* e *AluI* no gene *GHR* e a composição do leite de vacas da raça holandês.

### 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas.

Foram avaliadas 268 vacas da raça Holandês de uma fazenda comercial do sudeste do Brasil no ano de 2011. Os dados de percentual de gordura, proteína, lactose e células somáticas do leite foram obtidos do software de gestão da fazenda, cujos dados são alimentados pelos resultados das análises mensais realizadas pela Clínica do Leite (Piracicaba, São Paulo).

Os animais foram manejados em sistema freestall, no qual a totalidade da dieta foi ofertada no cocho afim de atender à exigências nutricionais de cada categoria segundo o NRC (2001) considerando o nível de produção e o número de lactações.

O DNA foi extraído de uma amostra de sangue total através de um protocolo previamente descrito (KANAI et al, 1994). A análise dos polimorfismos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose do resultado da digestão enzimática dos produtos de PCR. Os primers e as temperaturas de anelamento na PCR, bem como as enzimas de restrição podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Primers, temperatura de anelamento e enzimas utilizadas na genotipagem dos genes GHR e STAT5A.

Gene	T° de anelamento	Tamanho do fragmento	Enzima	Referência
<b>GHR Primers</b>				
FW: TCGGTGCACAGCAGCTCAACC RV: AGCAACCCCACTGCTGGGCAT	66°C	836bp	<i>AluI</i>	Aggrey et al 1999.
<b>STAT5A Primers</b>				
FW: GAGAAGTTGGCGGAGATTATC RV: CCGTGTGTCCTCATCACCTG	65-57.5°C	820bp	<i>BstEII</i>	Khatib et al 2008.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.0 software (SAS, Cary, NC, USA) através do procedimento GLM. Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na tabela 2, não houve diferença na gordura, lactose, proteína e CCS do leite entre os genótipos de GHR *AluI* bem como entre os genótipos de STAT5A *BstEII* ( $P>0,05$ ). Foi observada uma tendência linear de maior percentual de lactose no leite em animais com o alelo (+) de STAT5A *BstEII* ( $P=0,06$ ).

Tabela 2. Valores de gordura, lactose, proteína e CCS por genótipo.

	Gordura (%)	Lactose (%)	Proteína (%)	CCS ( $\times 10^3$ cels./mL)
<b>GHR</b>				
(-/-) (n=48)	3,3 $\pm$ 0,05	4,6 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,02	433,8 $\pm$ 69,17
(-/+) (n=98)	3,3 $\pm$ 0,03	4,5 $\pm$ 0,01	3,07 $\pm$ 0,02	437,3 $\pm$ 58,5
(+/+) (n=122)	3,3 $\pm$ 0,03	4,5 $\pm$ 0,01	3,1 $\pm$ 0,01	435,07 $\pm$ 52,4
Linear	0,76	0,16	0,44	0,26
<b>STAT5A</b>				
(-/-) (n=31)	3,3 $\pm$ 0,06	4,54 $\pm$ 0,03	3,1 $\pm$ 0,03	449,05 $\pm$ 106,1
(-/+) (n=102)	3,3 $\pm$ 0,03	4,58 $\pm$ 0,01	3,1 $\pm$ 0,01	432,5 $\pm$ 57,05
(+/+) (n=135)	3,3 $\pm$ 0,03	4,6 $\pm$ 0,01	3,0 $\pm$ 0,01	434,7 $\pm$ 49,7
Linear	0,84	0,06	0,16	0,45

O GH é um hormônio polipeptídico que, através de seu receptor GHR, atua na regulação da fisiologia dos mamíferos (JONES & CLEMONS, 1995). Na glândula mamária, o GH participa da regulação do crescimento celular e

lactogêne (AGGREY et al 1999). Tais características evidenciam o gene que codifica para o GHR como candidato à pesquisas de associação entre suas variações genotípicas e características de interesse econômico como composição do leite. No entanto, as variações na sequência dos genes candidatos podem ou não afetar a sua expressão e a estrutura e funcionalidade do transcrito. Dessa forma, estudos dessa natureza pesquisam a associação entre genótipos e características fenotípicas de forma estatística. Por conseguinte, se faz necessário um elevado número de animais por genótipo para a realização dessas análises e a realização de uma adequada inferência estatística (AGGREY et al 1999). Nós observamos 48, 98 e 122 vacas dos genótipos GHR *Alul* (-/-), (-/+) e (+/+) respectivamente. O baixo número de animais por genótipo pode ter contribuído para a não identificação de associação entre os genótipos e as características avaliadas.

No estudo de FALAKI (1996) e colaboradores foi observada associação entre os genótipos de GHR e a porcentagem de proteína no leite. Tal trabalho utilizou vacas confinadas para fins experimentais, com total controle sobre todas as variáveis. Já no presente trabalho, os dados foram coletados de uma fazenda comercial, o que pode ter acarretado em erros de gerenciamento de dados bem como diferenças de manejo entre os animais, fatores que podem ter alterado a significância dos dados.

O STAT5A é conhecido por regular a expressão gênica de proteína no leite (WATSON 2001). Por essa razão, esse trabalho avaliou a associação dos genótipos de STAT5A *BstEII* e a composição do leite. KHATIB (2008) e demais autores avaliaram um grupo de SNPs no gene que codifica para STAT5A e demonstraram uma associação entre os percentuais de proteína e gordura no leite e alguns dos polimorfismos avaliados. No entanto, outros polimorfismos investigados no mesmo gene pelos mesmos autores não foram associados às características de composição do leite.

Da mesma forma, no presente trabalho não foi observado efeito do polimorfismo STAT5A *BstEII* e a gordura, proteína, lactose e CCS do leite. Entretanto, os resultados apresentaram uma tendência de maior percentual de lactose no leite de animais com o alelo (+) do polimorfismo STAT5A *BstEII* ( $P=0,06$ ). Por se tratar de um estudo de associação, o baixo número de animais por genótipo pode ter influenciado a avaliação. Nesse sentido, um número maior de animais avaliados poderia ter evidenciado os efeitos desse polimorfismo de acordo com o relatado na literatura. A tendência de maior percentual de lactose em animais portadores do alelo (+) do STAT5A *BstEII* suporta essa afirmação, dando indícios de que pode haver um efeito desse polimorfismo nas características estudadas.

#### 4. CONCLUSÕES

Os polimorfismos GHR *Alul* e STAT5A *BstEII* estão relacionados às características do leite em rebanhos norte americanos. No entanto, essa associação não foi observada nesse trabalho realizado com vacas na América do Sul. É possível que os critérios de seleção da fazenda avaliada, bem como o efeito ambiental no processo de seleção diferenciem o perfil genético do rebanho avaliado e dos demais rebanhos utilizados nos trabalhos citados. Dessa forma, apesar do polimorfismo GHR *Alul* e STAT5A *BstEII* serem passíveis de utilização em programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares em rebanhos na América do Norte, mais estudos com um maior número de fazendas

e animais são necessários para validar esses marcadores como preditores de características relacionadas à qualidade do leite em rebanhos sul americanos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGREY S.E., YAO J., SABOUR M.P., LIN C.Y., ZADWORN D., HAYNES J.F., KUHNLEIN, U. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. **J Herd** 90, 148-151, 1999.
- ARGETSINGER, L.S., CARTER-SU, C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physiol Rev** 76, 1089-1107, 1996.
- FALAKI M, GENGLER N, SNEYERS M, PRANDI A, MASSART S., FORMIGONI A, BURNY A, PORTETELLE D, AND REVAVILLE R. Relationship of polymorphism of growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **J Dairy Science** 79:1446-1453, 1996.
- FELDEMAN M, RUAN W, CUNNINGHAM BC, WELLS JA, AND KLEINBERG DL. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinology** 133:1602-1608, 1993.
- JONES JI, CLEMMONS DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev**, 16:3-34, 1995.
- KANAI N, FUJI T, SAITO K, YOKOYAMA T. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. **J Clin Pathol**, 47:1043-4, 1994.
- KHATIB, H.; MONSON, R.L.; SCHUTZKUS, V.; KOHL, D.M.; ROSA, G.J.M. AND RUTLEDGE, J.J. Mutations in the STAT5A gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. **Journal of Dairy Science** 91, 784-793, 2008.
- KHATIB, H., V. SCHUTZKUS, Y. M. CHANG, AND G. J. M. ROSA. Pattern of expression of the uterine milk protein gene and its association with productive life in dairy cattle. **J. Dairy Sci**, 90:2427-2433, 2007a.
- KHATIB, H., I. ZAITOUN, J. WIEBELHAUS-FINGER, Y. M. CHANG, AND G.J. M. ROSA. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. **J Dairy Sci**, 90:2966-2970, 2007b.
- MAJ, A., SNOCHOWSKI, M., SIADKOWSKA, E., ROWINSKA, B., LISOWSKI, P., ROBAKOWSKA-HYZOREK, D., OPRZADEK, J., GROCHOWSKA, R., KOCHMAN, K., ZWIERZCHOWSKI, L. Polymorphism in genes of growth 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 – Friesian cattle. **Neuroendocrinology Letters** 29, 6, 981-989, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirement of dairy cattle. **National Academy Press**. Washington. D.C. 7 ed, p. 381, 2001.
- SAS. Statistical Analysis System. SAS/STAT Users Guide, Release 9.1. Cary, NC, USA, **SAS Inst**, Inc, 2002.
- SPENCER, T. E., AND F. W. BAZER. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Front. Biosci.** 1:d1879-d1898, 2002.
- WATSON, C. J. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol. Neoplasia**, 6:115-127, 2001.