

Polimorfismos no SNP CGIL4: estudo de associação ao fenótipo de resistência a mastite clínica em vacas holandesas

Rachel Dias Molina¹, Débora Mara Kich², Tatiane Vendramin³, Claucia Fernanda Volken de Souza⁴, Daniel Neutzling Lehn⁵, Adriane Pozzobon⁶, Ivan Cunha Bustamante-Filho⁷

Resumo: A mastite bovina é a principal patologia da glândula mamária e a maior causadora de prejuízos na produção leiteira. Sua etiologia é quase sempre relacionada a problemas de manejo sanitário e de ordenha. Entretanto, observa-se a existência de animais com maior ou menor resistência a mastite, mesmo quando fatores ambientais são controlados. Recentemente, alguns marcadores moleculares foram associados ao fenótipo de resistência a mastite. O presente estudo teve como objetivo verificar se com base no histórico de mastites clínicas em vacas de 2^a e 3^a lactação, o SNP CGIL4 está relacionado ao fenótipo de resistência a mastite em vacas holandesas em um rebanho no Sul do Brasil. Para obtenção do DNA genômico, foram utilizadas amostras de sangue de 160 vacas de segunda e terceira lactação de rebanhos tecnificados no Vale do Taquari, RS. O fenótipo de resistência ou susceptibilidade à mastite clínica foi determinado com base no histórico clínico dos animais, sendo classificada como susceptível a vaca com mais de 3 episódios da doença durante a lactação anterior. A identificação do SNP CGIL4 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP. Foi utilizada uma PCR touch down para obter o amplicon de 399 pb. A análise de RFLP foi feita utilizando a enzima TaqI para identificar o SNP (G→A). A

relação com o fenótipo e genótipo foi analisada pelo teste Qui-quadrado. O genótipo mais frequente observado foi GG (47,5%), seguido por AG com 45% e AA com 7,5%. O presente resultado difere de outros estudos que apontaram AG como o genótipo mais encontrado. As frequências alélicas foram 69,8% para o alelo G e 30,2% para o alelo A. Não foi observada associação entre os genótipos testados e fenótipos de resistência e susceptibilidade à mastite clínica baseada em registros clínicos.

Palavras-Chave: patologia, marcador molecular, holandês.

Polymorphisms in SNP CGIL4: association study on the phenotype of clinical mastitis resistance in Holstein cows

Abstract : Bovine mastitis is the most important udder pathology and have a significant economic impact in the dairy industry. Its etiology is associated to problems with health and milking management. However, there are animals with resistance or susceptibility to mastitis, even when environmental factors are controlled. Recently, some molecular markers were associated to the phenotype of resistance to mastitis. The present study aims to verify if, based on clinical history of cows of second and third lactation, the SNP CGIL4 is associated to the phenotype of resistance to mastitis in Holstein cows in a herd in southern Brazil. Genomic DNA was obtained from blood samples of 160 Holstein cows (second and third lactation) from dairy herds from Rio Grande do Sul state, Brazil. Phenotype of resistance or susceptibility to clinical mastitis was defined based on animal's clinical history, and the animal was classified as susceptible if presented at least 3 episodes of clinical mastitis during the last lactation. The identification of the CGIL4 SNP was performed using a PCR-RFLP. The association between genotypes and phenotypes was accessed by the χ^2 test. To detect polymorphism, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using a touch-down PCR reaction producing an amplicon of 399 bp. The Restriction Fragment Length

Polymorfism (RFLP) analysis was performed using TaqI restriction enzyme to identify the SNP (G→A). The association between genotypes and phenotypes was accessed by the χ^2 test. The most frequent genotype observed was GG (47.5%), AG with 45% and AA with 7.5%. Other results point AG as the most frequent genotype. Allele frequencies were 69.8% and 30.2% for the alleles G and A, respectively. No association was found between genotypes and phenotype of resistance and susceptibility to clinical mastitis, based in clinical records.

Key words: pathology, molecular marker, Holstein.

¹ Centro de Ciências da Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES

² Centro de Ciências e Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES

³ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES

Introdução

A mastite caracteriza-se pela resposta inflamatória na glândula mamária, sendo esta causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas ou, mais frequentemente, por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos (REBHUN, 2007). Os impactos econômicos surgem através da queda na produção leiteira, perda na qualidade do leite, maior custo de produção e o descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos

mamários, que se tornam fibrosos e improdutivos (OVIDO-BOYSO et al., 2007). Estima-se que no Brasil a queda de produção com esta doença chegue de 2 a 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros (SANTOS, 2001). Uma das abordagens para a redução na incidência da mastite e seus impactos é a seleção de animais resistentes e a inserção desta característica nos rebanhos. Para a seleção de animais melhores adaptados,

pode-se utilizar marcadores genômicos associados a característica fenotípica de interesse.

O estudo de marcadores moleculares de DNA permite detectar diferenças nas sequências do DNA possibilitando a seleção indireta para genes de interesse. O uso de ferramentas moleculares revolucionou o melhoramento genético em bovinos, e com a recente publicação do genoma da espécie (THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009), buscam-se cada vez mais marcadores moleculares para fenótipos de interesse produtivo. Na pecuária leiteira, características produtivas como produção de leite, concentração de gordura e proteína no leite e resistência a mastite clínica são os principais focos na busca por marcadores moleculares.

Em um amplo estudo, SHARMA et al. (2006) examinaram 3314 vacas holandesas na busca por marcadores genéticos para resistência

ou susceptibilidade à mastite. Os animais foram testados com a técnica AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), utilizando 89 combinações de primers e a análise de AFLP revelou 27 marcadores significativos. O marcador mais promissor foi então selecionado sendo descrito como um SNP (CGIL4) caracterizado pela troca de bases G →A.

Em virtude do comércio globalizado de doses de sêmen, a genética de rebanhos da raça Holandesa no Brasil são muito semelhantes aos rebanhos americanos e europeus (PAIVA, 2006). Assim, candidatos a marcador de resistência à mastite identificado em rebanhos norte americanos e europeus podem ser válidos na seleção de rebanhos no Brasil. Porém, a maior parte do rebanho brasileiro não dispõe de um sistema de coletas de dados de produção e sanitários que permitam a implantação

em larga escala de seleção genética baseada em marcadores moleculares. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar se, com base no histórico de mastites clínicas em vacas de 2^a e 3^a lactação, o SNP CGIL4 está relacionado ao fenótipo de resistência a mastite em vacas holandesas em um rebanho no Sul do Brasil.

Material e Métodos

Um total de 160 animais oriundos de seis propriedades tecnificadas de pecuária leiteira foram utilizados na análise. Os rebanhos eram compostos exclusivamente por vacas da raça Holandesa pura por cruza, estágio de 2^o ou 3^o lactação, com controle sanitário. O registro dos históricos clínicos eram realizados pela assistência veterinária da propriedade durante a segunda e terceira lactação. Não foram considerados casos subclínicos. Os animais que apresentavam mais de 3 episódios de mastite clínica na lactação anterior em pelo menos um dos tetos

foram classificados como susceptíveis. A classificação de resistência foi dada aos animais que não apresentaram casos clínicos da doença, exceto por trauma na glândula mamária (REBHUN, 2007).

Foram coletados 5 mL de sangue com a utilização de um tubo de coleta estéril com agulha de sistema de vácuo, e o DNA genômico foi extraído a partir de sangue total usando o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, sendo posteriormente armazenado a -20°C. Para detectar o SNP CGIL4, foi utilizado o método de PCR-RFLP, utilizando os primers: E155F (5' TGA CGC AGA ATC CAA AGT TAA AAC A 3') e E155R (5' GAG GAG GTG GCC GGT TCA GA 3'), para a obtenção de um amplicon de 399 pb (Sharma et al., 2006). Para a PCR foram utilizadas: 200ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada primer, 200 µM de dNTP, 1 mM de MgCl₂, Taq Polimerase Buffer, água ultra-pura e 0,3

U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A técnica utilizada foi de Touchdown-PCR usando Hot Start (Sambrook & Russell, 2001), sendo as condições de reação: 94°C por 5min, 42 ciclos de 94°C por 30 s, 52,5°C por 45 s e 72°C por 45 s. Após, o produto da PCR foi clivado com a enzima de restrição TaqI (T¹CGA) (Fermentas, Waltham, EUA). As condições de reação foram 0,5 µg de DNA, TaqI Buffer, água ultra-pura e 8 U de TaqI (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Os genótipos do SNP CGIL4 foram determinados por eletroforese em gel de agarose 3% (Sambrook & Russell, 2001), sendo caracterizados como: GG (dois fragmentos de 125 e 235pb), AA (dois fragmentos de 125 e 274pb) ou AG (três fragmentos de 125, 235 e 274pb).

As frequências alélicas e genotípicas entre os grupos resistente e susceptível foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado e o teste exato de

Fischer. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 5 (GraphPad, Califórnia, EUA), adotando nível de significância 5%.

Resultados e Discussão

Na amostra populacional avaliada, observou-se que 76 (47,5%) eram homozigotos GG e 72 (45%) eram heterozigotos AG. A frequência alélica G foi de 69,8% e a frequência alélica A foi de 30,2%. A literatura descreve os indivíduos AG, associado à resistência a mastite, como sendo os mais frequentes, variando entre 73% (ČÍTEK et al., 2011) e 61,5% (SHARMA et al., 2006). Da mesma forma o genótipo GG representa 10% e 35% nos mesmos trabalhos, respectivamente. O genótipo AA ocorreu em apenas 12 (9,83%) indivíduos, sendo tal proporção também reduzida em outros trabalhos [3% por SHARMA et al., (2006) e 16,7% por ČÍTEK et al., (2011)]. A figura 1 representa a identificação dos genótipos obtidos.

Não foi encontrada associação entre os fenótipos de resistência e susceptibilidade e as frequências genóticas ($P = 0,8412$) e alélicas ($P = 1,000$) no grupo amostral estudado (Tabela 1). Os dados obtidos não concordam com os achados dos autores que propuseram o SNP CGIL4, que encontraram uma associação significativa para o alelo A e genótipo AA ao fenótipo de resistência a mastite. No entanto, estudo recente realizado

com o SNP CGIL4 em vacas holandesas na República Tcheca também não observou a relação proposta (ČÍTEK et al., 2011). Contudo, a comparação deve ser feita com cautela dada as diferenças genéticas entre as populações estudadas por SHARMA et al. e ČÍTEK et al., e também pela classificação dos rebanhos realizada por estes autores. Em seus estudos, a classificação do fenótipo de resistência ou susceptibilidade foi feita através de valores de CCS, parâmetro não utilizado neste trabalho.

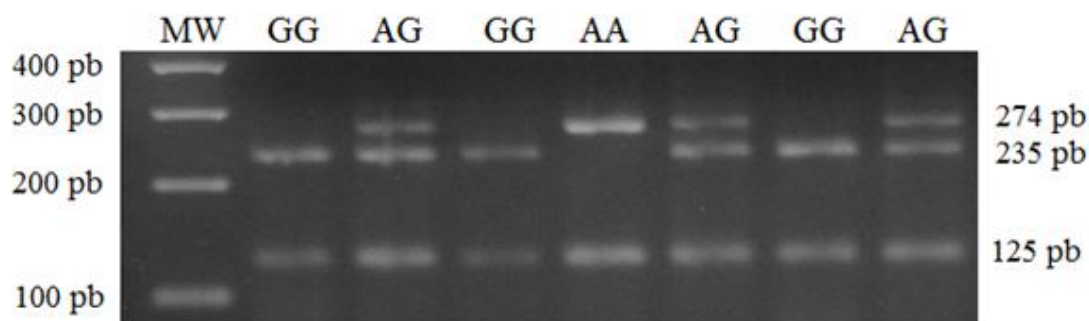


Figura 1 – Imagem representativa da genotipagem de vacas para o SNP CGIL4. Os três genótipos podem ser identificados pelo padrão de corrida. Gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio.

Os SNPs são marcadores atraentes para a análise genética, pois encontram-se em praticamente qualquer região do genoma ou em qualquer

sequência de interesse (REGITANO et al., 2009). Como a resposta de resistência à mastite é uma característica complexa, vários genes podem estar

relacionados na determinação desta função. Assim, os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos para o fenótipo de resistência, sendo os principais genes que codificam mediadores pró ou antiinflamatórios (ex.: IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α , além dos receptores Toll-like) (ALLUWAIMI et al., 2003). Desta forma, vários polimorfismos são apontados como candidatos ao uso em seleção baseada por marcadores. O SNP SCN8A-54 (C \rightarrow T) foi associado à mastite em animais da raça Thai-

Friesian (SIRIWADEE et al., 2011). MESQUITA & COLABORADORES (2012) observaram que polimorfismos no gene TLR4 (toll like receptor 4) estão relacionados a menor valor de contagem de células somáticas (CCS) em vacas holandesas, sugerindo seu uso em seleção baseada em marcadores. LIU et al. (2012) descreveram um polimorfismo no gene ATP1A1 (responsável pela expressão da enzima Na⁺, K⁺-ATPase) associado a resistência a mastite clínica.

Tabela 1 - Frequências genotípica e alélica do SNP CGIL4, teste estatístico e valor P dos animais analisados.

Grupo	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	AA	AG	GG	A	G
Resistente	9 (5,6%)	49 (30,6%)	54 (33,8%)	67 (21,1%)	155 (48,7%)
Susceptível	3 (1,9%)	23 (14,4%)	22 (13,8%)	29 (9,1%)	67 (21,1%)
Teste	Qui quadrado: 0,7326			Teste Exato de Fisher	
Valor P	0,8412			1,000	

A mastite é um complexo processo patológico que tem sua

ocorrência e patogenia influenciada por diversos genes (PYÖRÄLÄ, 2008), em

especial aqueles voltados a processos imunológicos (TAO & MALLARD, 2007). Contudo, a expressão fenotípica de resistência depende não só da genética do animal, mas também da interação dos genes com os efeitos do ambiente, em especial desafios térmicos e microbiológicos.

Os casos de mastite clínica deste estudo foram identificados sem isolamento de micro-organismos, bem como em outros estudos sobre este SNP (ČÍTEK et al., 2011; Sharma et al., 2006). Como o SNP CGIL4 pode estar relacionado à atividade da lactoferrina na defesa antimicrobiana da glândula mamária, o grau do desafio microbiológico pode refletir no perfil de resistência a mastite das vacas. Sabe-se que diversas citocinas de resposta imune inata presentes no leite estão relacionadas a mastite clínica. O aumento da concentração no leite de proteínas como haptoglobina, IL-1 β , IL-10 e IL-12 foram associadas a casos

graves de mastite clínica (WENZ et al., 2010), demonstrando a importância da resposta humoral. O SNP CGIL4 está próximo ao gene *Lf*, no autossomo bovino 22 (*Bos taurus* autossome 22, BTA22), que codifica para a proteína lactoferrina (GI: AC_000179.1). Esta proteína atua na resposta de defesa contra infecção bacteriana durante processos inflamatórios, bem como media o transporte do íon ferro, participando da homeostase celular (SANCHEZ et al., 1992; SEYFERT et al., 1994). Neste sentido, faz-se necessário esclarecer se o SNP CGIL4 influencia a função do gene *Lf*, seja em nível de expressão (ex: modulação de promotor) ou alterações diretamente na sequência de aminoácidos da proteína.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados, utilizando o histórico clínico como parâmetro para classificação fenotípica de resistência a mastite clínica bovina, não foi encontrada, na amostra populacional analisada, relação do SNP CGIL4 com a

resistência a esta patologia. Apesar deste SNP já ser considerado um candidato a marcador molecular para resistência a mastite (OGOREVC et al., 2009), sugere-se que mais estudos com diferentes populações de bovinos da raça holandesa sejam realizadas para que este gene possa ser efetivamente validado para uso em programas de melhoramento genético baseado em marcadores.

Referências Bibliográficas

- ALLUWAIMI, A.M.; LEUTENEGGER, C.M.; FARVER, T.B.; ROSSITTO, P.V.; SMITH, W.L.; CULLOR, J.S. The Cutokine Markers in *Staphylococcus aureus* Mastitis of Bovine Mammary Gland. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 3, p. 105-111, Mar. 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.14390450.2003.00628.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false> Acesso em: 22 jan. 2013. Doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00628.x.
- ČÍTEK, J.; REHOUT, V.; HANUSOVÁ, L.; MÍKOVÁ, A.; JASKOVÁ, I. Polymorphisms in CGIL4, breeding value for somatic cell count and resistance to mastitis. **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, p. 301-304, Jul. 2011. Disponível em: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/43643.pdf> Acesso em: 18 jan. 2013.
- LIU, Y.X.; XU, C.H.; GAO, T.Y.; SUN, Y. Polymorphisms of the ATP1A1 gene associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Research**, p. 651-660, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535401> Acesso em: 2 fev. 2013. Doi: 10.4238/2012.March.16.3.
- MESQUITA, A.Q.; REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J.; JARDIM, E.A.G.V.; KIPNIS, A.P.J. Associação de polimorfismos TLR4 com mastite subclínica em raça Holandesa no Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151783822012000200034&script=sci_arttext Acesso em: 1 fev. 2013. Doi: 10.1590/S1517-83822012000200034.
- OGOREVC, J. et al. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. **Journal compilation**, 2009. Acesso em: 19 jan.

2013. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x.
- OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATÍÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, abril 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445306002076>
- Acesso em: 15 fev. 2013. Doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.010.
- PAIVA, A.L.C. **Endogamia na raça Holandesa no Brasil**. 2006. Dissertação (Especialização) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.
- PYÖRÄLÄ, S. Mastitis in Post-Partum Dairy Cows. **Journal compilation**, v. 43, p. 252-259, 2008. Acesso em: 19 nov. 2012. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01170.x
- REBHUN, W.C. **Diseases of Dairy Cattle**. Missouri: Saunders, 2007.
- REGITANO, L.C.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. **Embrapa Pecuária Sudeste - Capítulo em livro técnico-científico**, p. 1-15, 2009. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/48082> Acesso em: 16 fev. 2013.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANCHEZ, L.; CALVO, M.; BROCK, J.H. Biological role of lactoferrin. **Archives Disease in Childhood**, v. 67, p. 657-661, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1793702/>
- Acesso em: 12 fev. 2013.
- SANTOS, M. V. **Impactos econômicos da mastite**. 2001. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/artigos-tecnicos/qualidade-do-leite/impacto-economico-da-mastite-parte-12-16201n.aspx>
- SEYFERT, H. M. ; TUCKORICZ, A. ; INTERTHAL, H. ; KOCZAN, D. ; HOBOM, G. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. **Gene**, v. 143, p. 265–269, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111994901082> Acesso em: 12 fev. 2013. Doi: 10.1016/0378-1119(94)90108-2.
- SHARMA, B.S. ; JANSEN, G.B. ; KARROW, N.A. ; KELTON, D. ; JIANG, Z. Detection and characterization of amplified fragment

length polymorphism markers for clinical mastitis in canadian holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3653-3663, set. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030206724055>
Acesso em: 2 fev. 2013. Doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72405-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72405-5).

SIRIWADEE, C.; PRADIT, W.; NGANVONGPANIT, K.; ROJANASTHIEN, S. Marker Identification for Mastitis and its Association in Thai-Friesian Cattle in Northern Thailand. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p. 2783-2789, 2011. Disponível em: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2011.2783.2789>
Acesso em: 30 jan. 2013. Doi: [10.3923/javaa.2011.2783.2789](https://doi.org/10.3923/javaa.2011.2783.2789).

TAO, W.; MALLARD, B. Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis of Canadian Holstein cows. **Elsevier**, p. 201-211, 2007. Acesso em: 19 jan. 2013. Doi: 120 (2007) 201–211.

The Bovine HapMap Consortium Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 528-532, 2009.

Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/324/5926/528.short>

Acesso em: 23 jan. 2013. Doi: [10.1126/science.1167936](https://doi.org/10.1126/science.1167936).

WENZ, J.R.; FOX, L.K.; MULLER, F.J.; RINALDI, M.; ZENG, R.; BANNERMAN, D.D. **Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis.** **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2458-2470, 2010. Disponível em <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030210002493.pdf>
Acesso em 16 fev 2013. Doi: [doi: 10.3168/jds.2009-2819](https://doi.org/10.3168/jds.2009-2819).

Recebido em 09/03/2014
Aceito em 13/06/2014