



Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
(NUPEEC)



Defesa de Estágio Extracurricular e Apresentação de Artigo

Apresentação: Joao Alvarado e Thaís Casarin

Pelotas, 12 de setembro de 2014

Área: Biologia Molecular/Genética

Orientador de estágio: Augusto Schneider

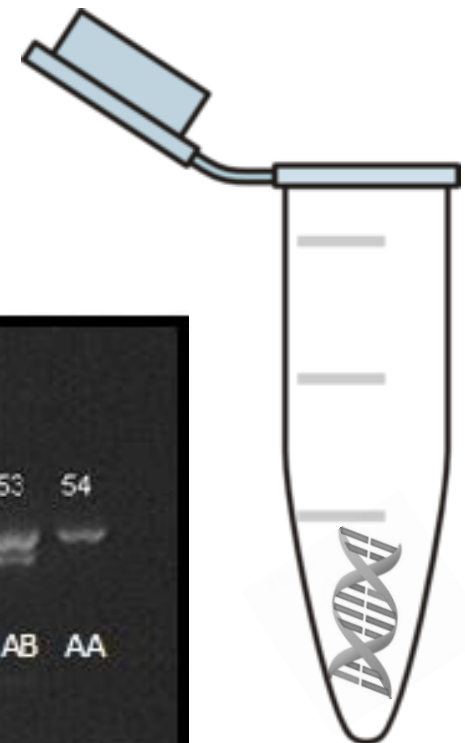
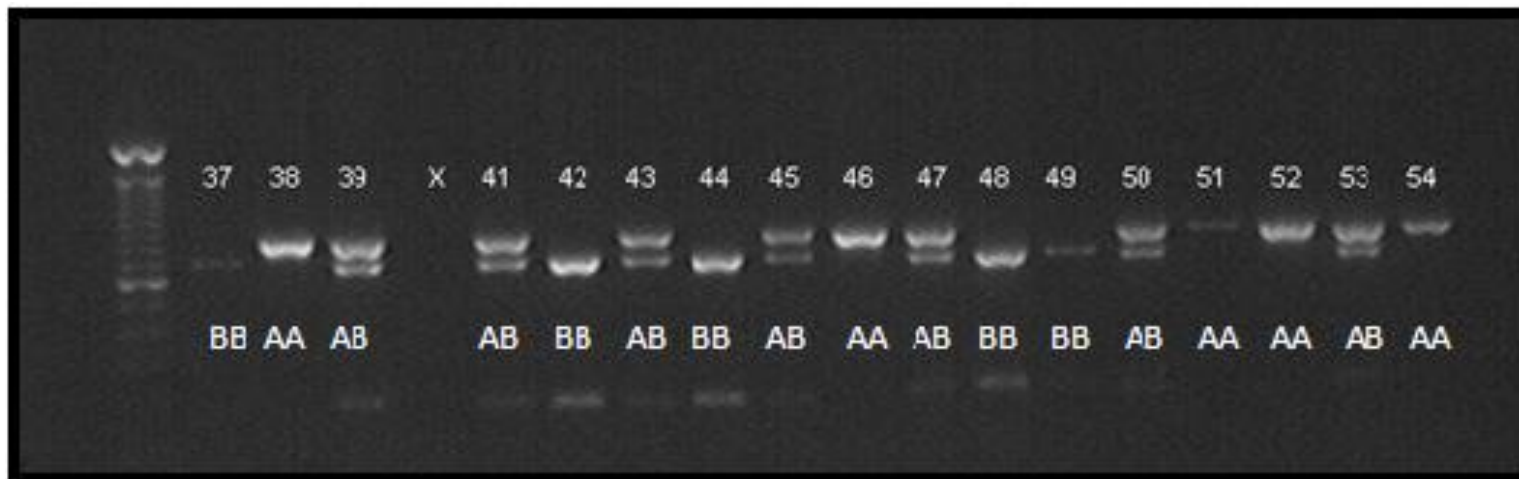
Duração: 3 semanas

Local: Faculdade de Nutrição – (UFPEL)



Atividades Desenvolvidas:

- ✓ Técnica de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em DNA
- ✓ Digestão Enzimática
- ✓ Eletroforese em gel de agarose
- ✓ Análises dos genótipos

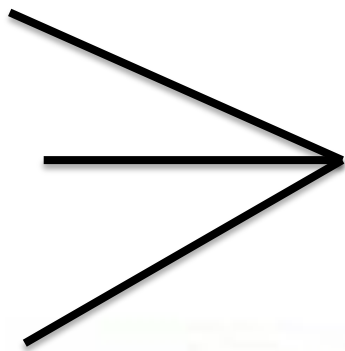


Genes Avaliados:

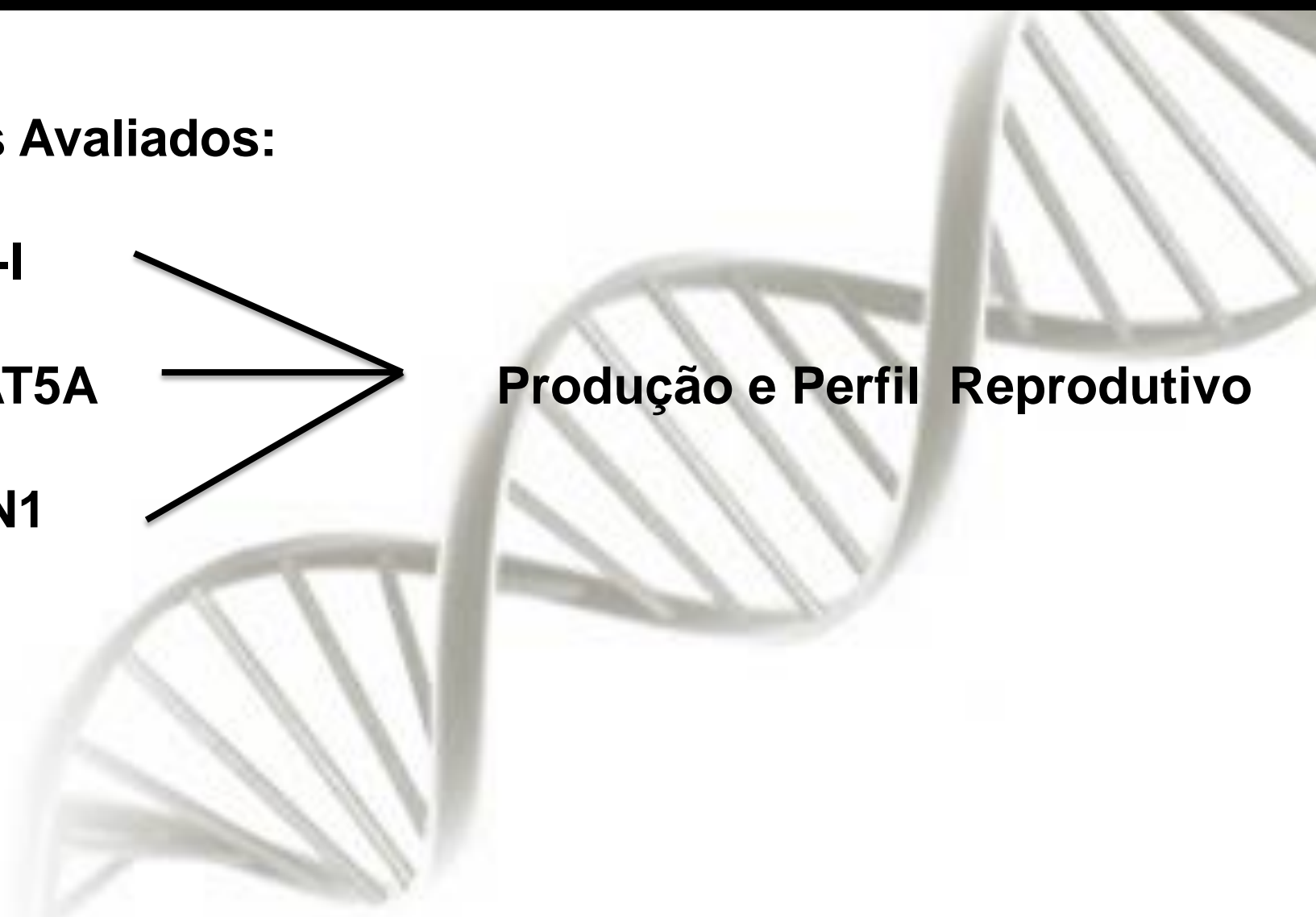
✓ IGF-I

✓ STAT5A

✓ PON1



Produção e Perfil Reprodutivo



Critérios:

- ✓ Assunto do estágio
 - Genotipagem e técnicas moleculares
- ✓ Trabalho de mestrado
 - Expressão gênica
- ✓ Estudos da equipe NUPEEC
 - Identificação de SNPs
 - Genotipagem
 - Nutrigenética
- ✓ Inovação
 - Desenvolvimento de novos produtos





Apresentação do Artigo



J. Dairy Sci. 95:4109–4113

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5178>

© American Dairy Science Association[®], 2012.

Identifying cows with subclinical mastitis by bulk single nucleotide polymorphism genotyping of tank milk

G. Blard, Z. Zhang, W. Coppieters, and M. Georges¹

Fator de Impacto: 2.550

Introdução

Mastite

O que é?



Processo Inflamatório da glândula mamária.



Mobilização de células de defesa



Neutralizar o agente infeccioso

Mastite Clínica X Subclínica



Mastite Clínica: Há sinais clínicos evidentes

Mastite Subclínica: Sinais não aparentes, mudanças ocorrem na composição do leite e na produção

Importância Econômica



✚ No leite

✚ Produção

✚ Qualidade do leite

✚ Alterações físicas, químicas e microbiológicas

✚ Descarte de animais

✚ Gastos em tratamento

A mastite é a principal causa de perdas econômicas na cadeia produtiva do leite

M. Subclínica
70%

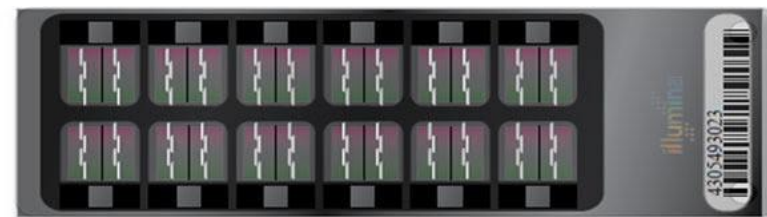
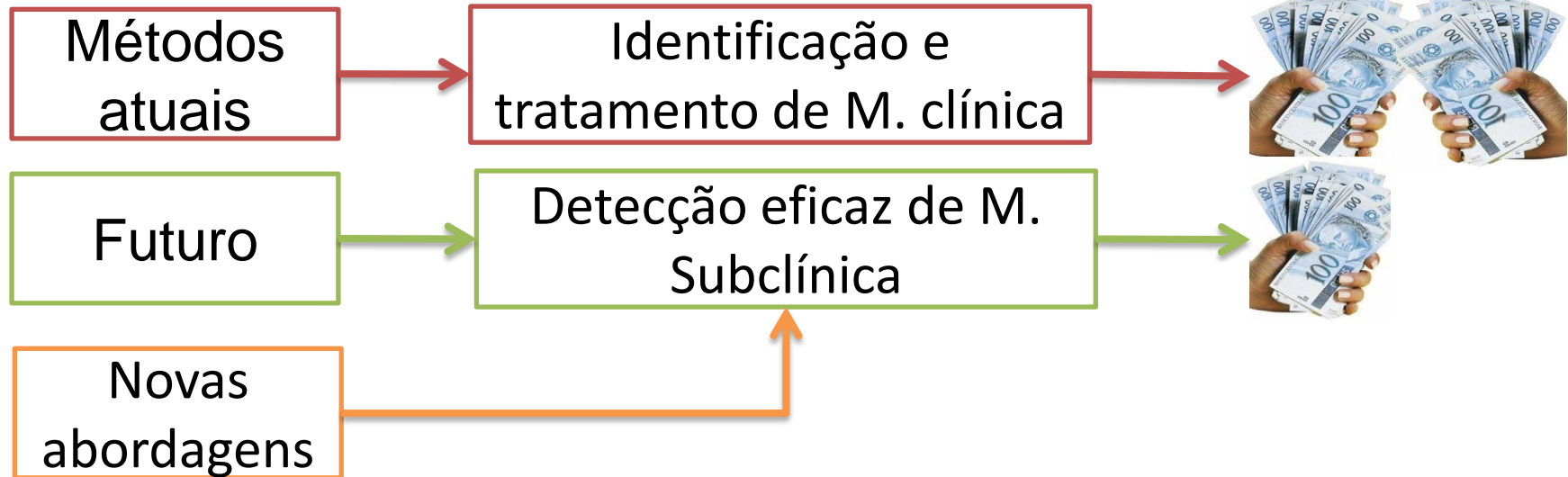
Introdução

Identificação de Mastite Subclínica

Tabela 1. Relação da contagem de células somáticas do tanque e prevalência de mastite subclínica

CCS (x1000)	Perda de produção (%)	Mastite subclínica
<200	0-5	Próxima a zero
<u>200</u> -500	6-9	Alguns casos
500-1000	10-18	Muitos casos
>1000	19-29	Epidêmica

❖ >250.000



Nos EUA foram genotipadas 85.000 vacas Holandês em 2011

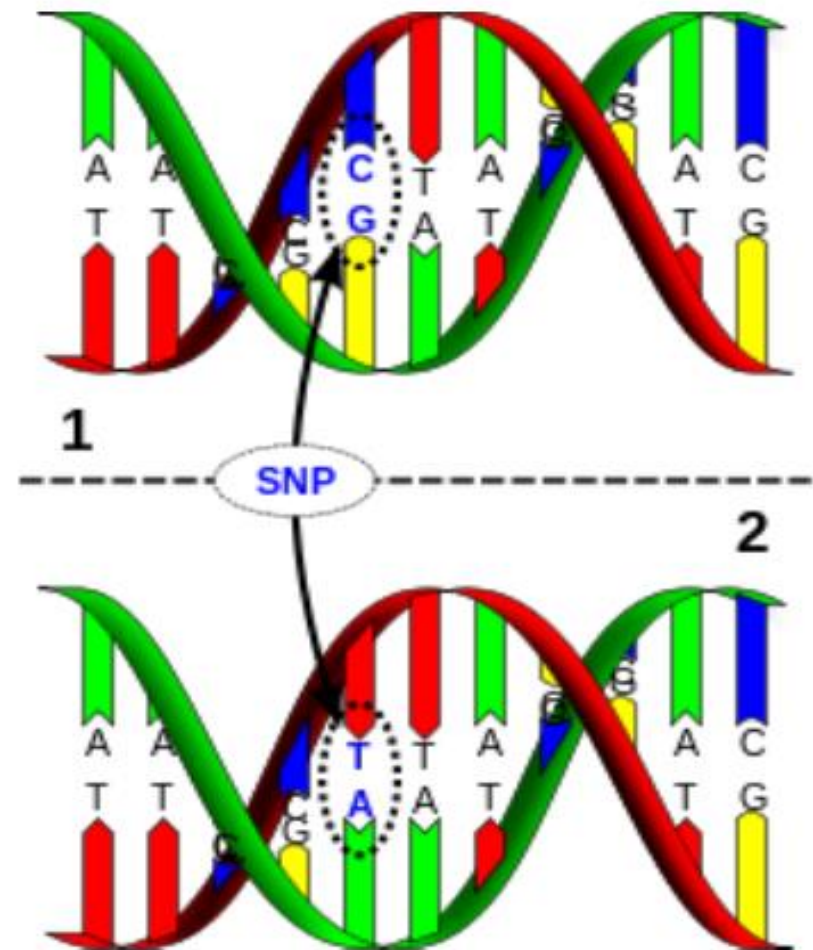
- Marcadores moleculares
 - SNPs
 - Genotipagem

O que é SNP ?



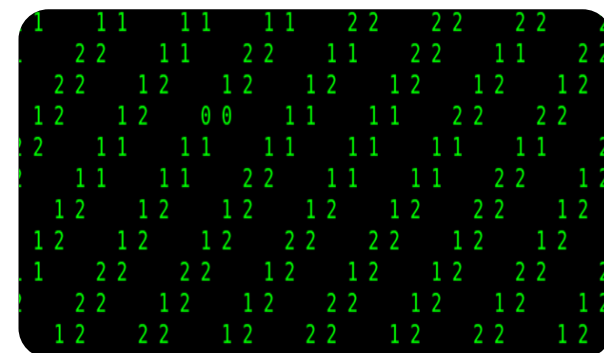
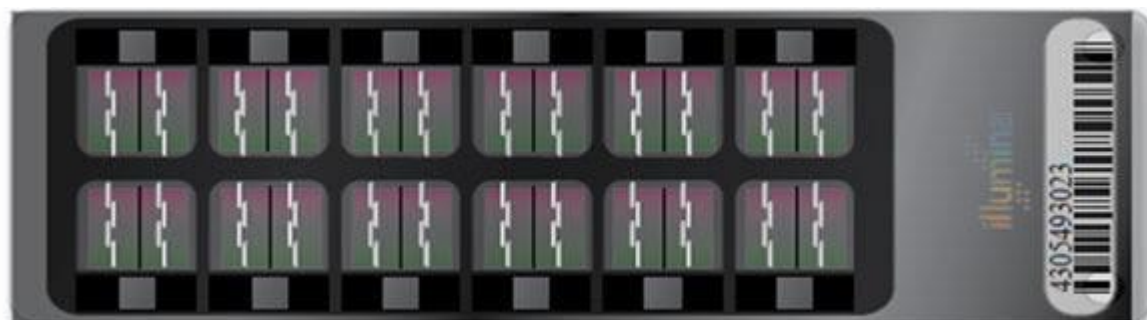
Polimorfismo de nucleotídeo
único

- Tipo mais comum de variação genética
- Ocorre a cada 300 nucleotídeos
- 10 milhões de SNPs



Chips de genotipagem

- Alta densidade
- O mesmo SNP é genotipado mais de 10 vezes por ensaio;
- Diminui erros para 0,01 %;
- Menos tempo.

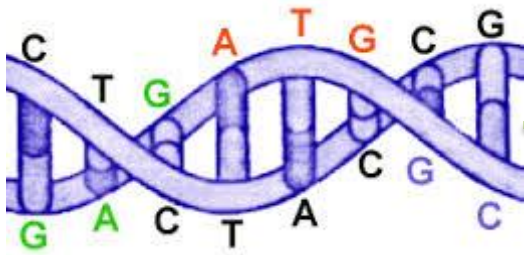


Objetivo

Descrever um novo método de identificação de animais com mastite subclínica a partir da genotipagem de uma única amostra de leite do tanque.



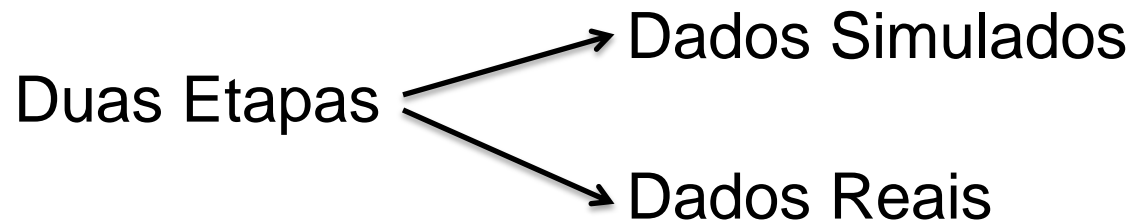
Hipótese



Células somáticas

Identificar animais com mastite subclínica





Primeira Etapa → Dados Simulados

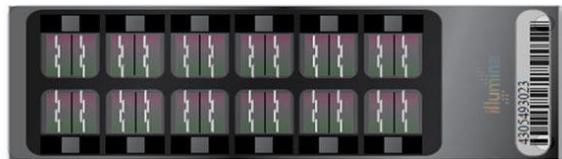
- 25, 100 e 500 vacas
 - Genotipadas
- $30 \pm 0,2$ L/dia
- Amostra de leite do tanque para CCS
- 3 Chips para identificação de SNPs de diferentes capacidades (3K, 50K e 700K)

Segunda Etapa → Dados Reais

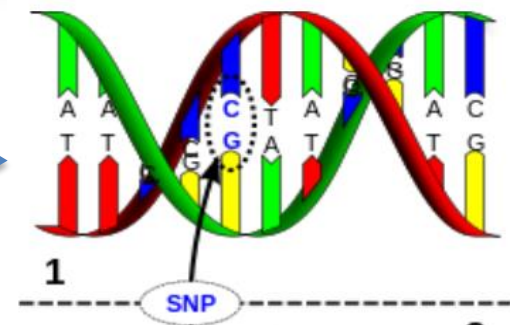
Foram utilizadas 40 vacas;

- $29,5 \pm 5,3L$
- Genotipadas (50K Illumina[®])
- Amostra de leite
 - CCS: Fossomatic[®]

Materiais e Métodos



Illumina Bovine SNP50



Software BeadStudio pacote (Illumina Inc.)

1	1357	0	0	1	0	2	2	1	1
2	1	1	1	1	2	2	1	1	2
3	1	1	2	2	1	1	1	2	2
4	1	1	1	2	1	2	1	1	1
5	2	2	1	2	1	2	2	2	2
6	2	2	2	2	2	1	1	2	2
7	2	2	2	2	2	1	1	2	2
8	2	2	2	2	2	1	1	2	2
9	2	2	2	2	2	1	1	2	2
10	2	2	2	2	2	1	1	2	2
11	2	2	2	2	2	1	1	2	2
12	2	2	2	2	2	1	1	2	2
13	2	2	2	2	2	1	1	2	2
14	2	2	2	2	2	1	1	2	2
15	2	2	2	2	2	1	1	2	2
16	2	2	2	2	2	1	1	2	2
17	2	2	2	2	2	1	1	2	2
18	2	2	2	2	2	1	1	2	2
19	2	2	2	2	2	1	1	2	2
20	2	2	2	2	2	1	1	2	2

Genótipo
 AA = 0
 AB = 0,5
 BB = 1

Materiais e Métodos

- Genotipagem da amostra do leite (matriz de SNPs)
- Genotipagem das vacas (matriz individual de SNPs)

Variáveis

- Volume de leite/vaca
- CCS/vaca
- Genótipo

$$AA = 0$$

$$AB = 0,5$$

$$BB = 1$$

$$f_j = \sum_{i=1}^n p c_i \times g_{ij} + \varepsilon_j$$

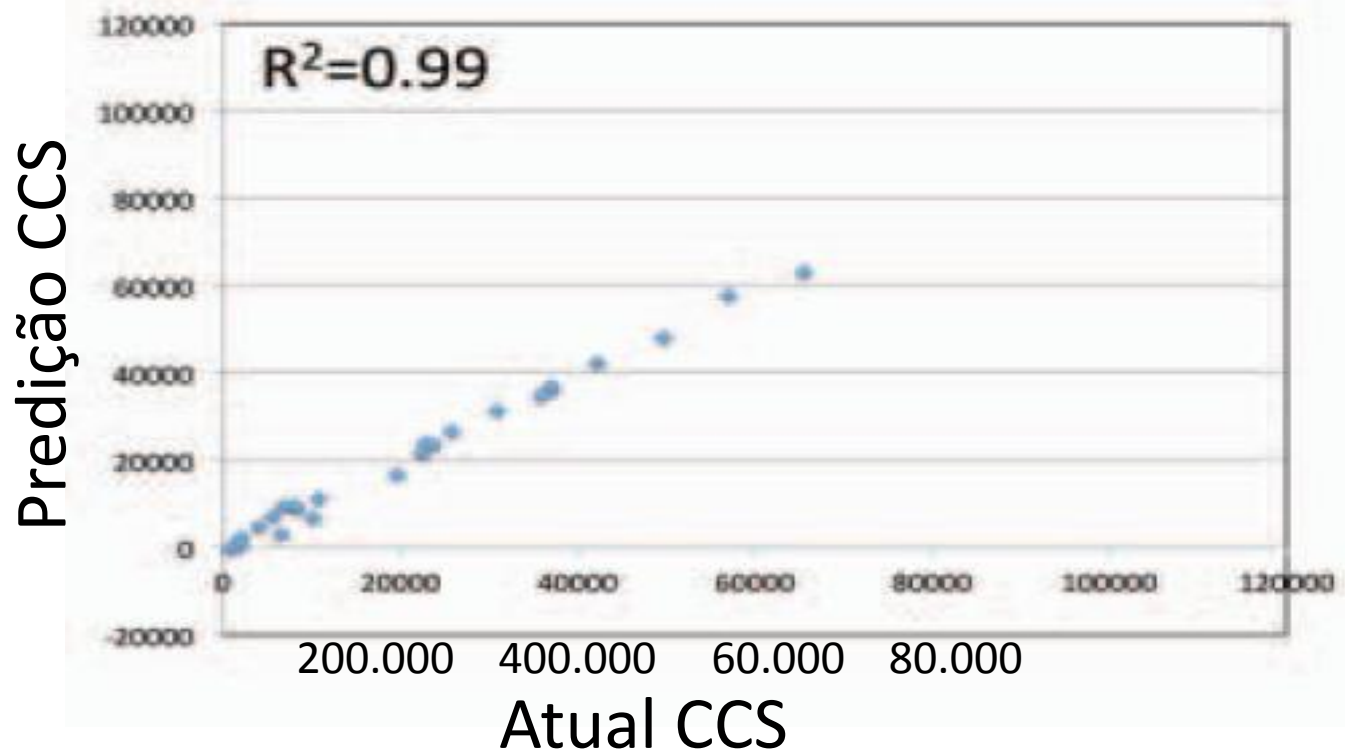
- Comparação entre matrizes (Tanque-Vacas)
- Proporção do alelo estimado na amostra de leite

Resultados

Dados simulados:

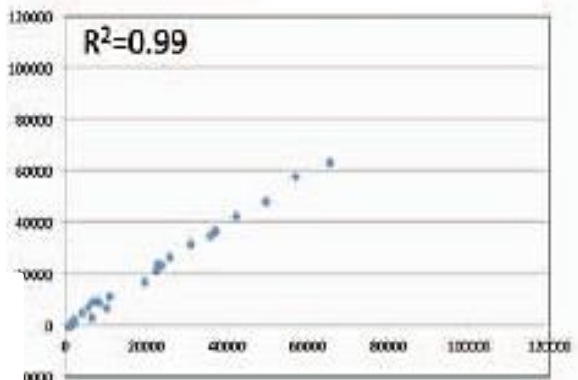
Para cerca de 80% das vacas, os valores foram significativos ($P \leq 0.0001$) ao usar os três chips.

25 Vacas

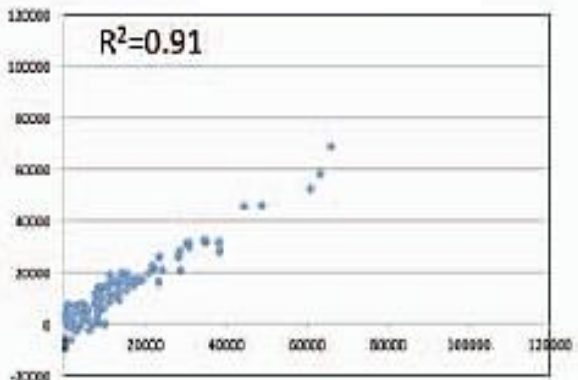


Resultados

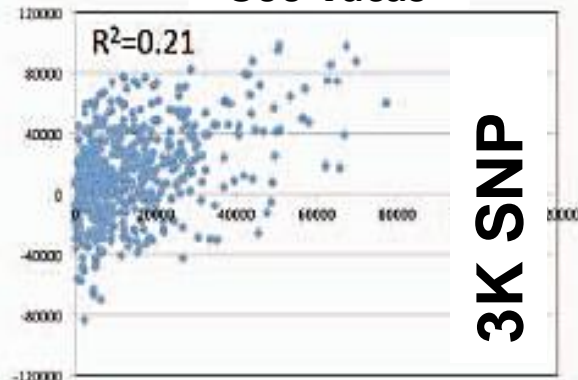
25 Vacas



100 Vacas

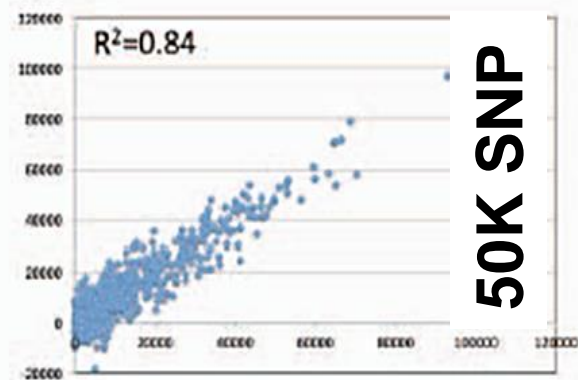
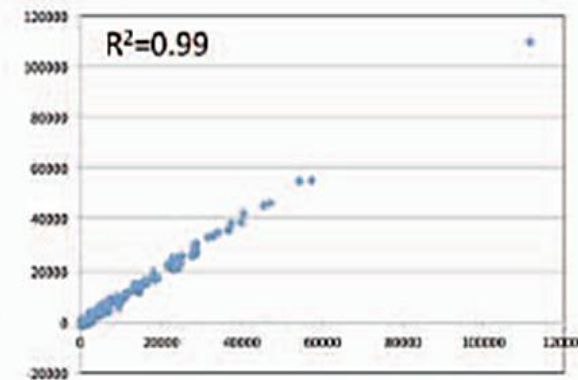
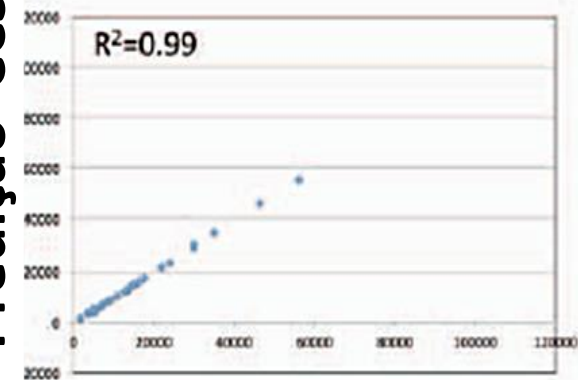


500 Vacas

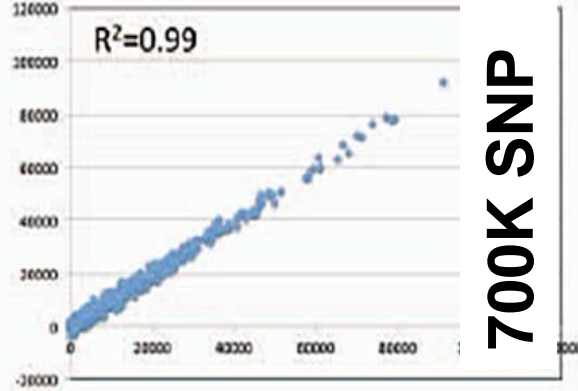
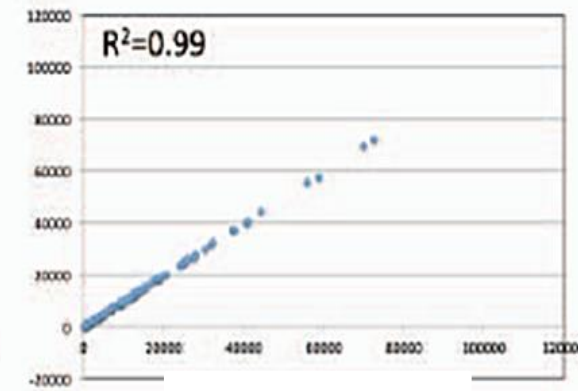
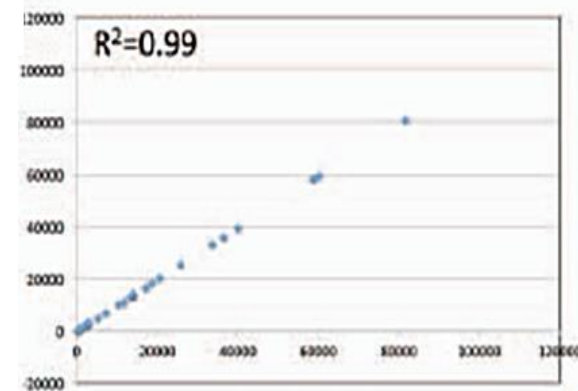


3K SNP

Predição CCS



50K SNP

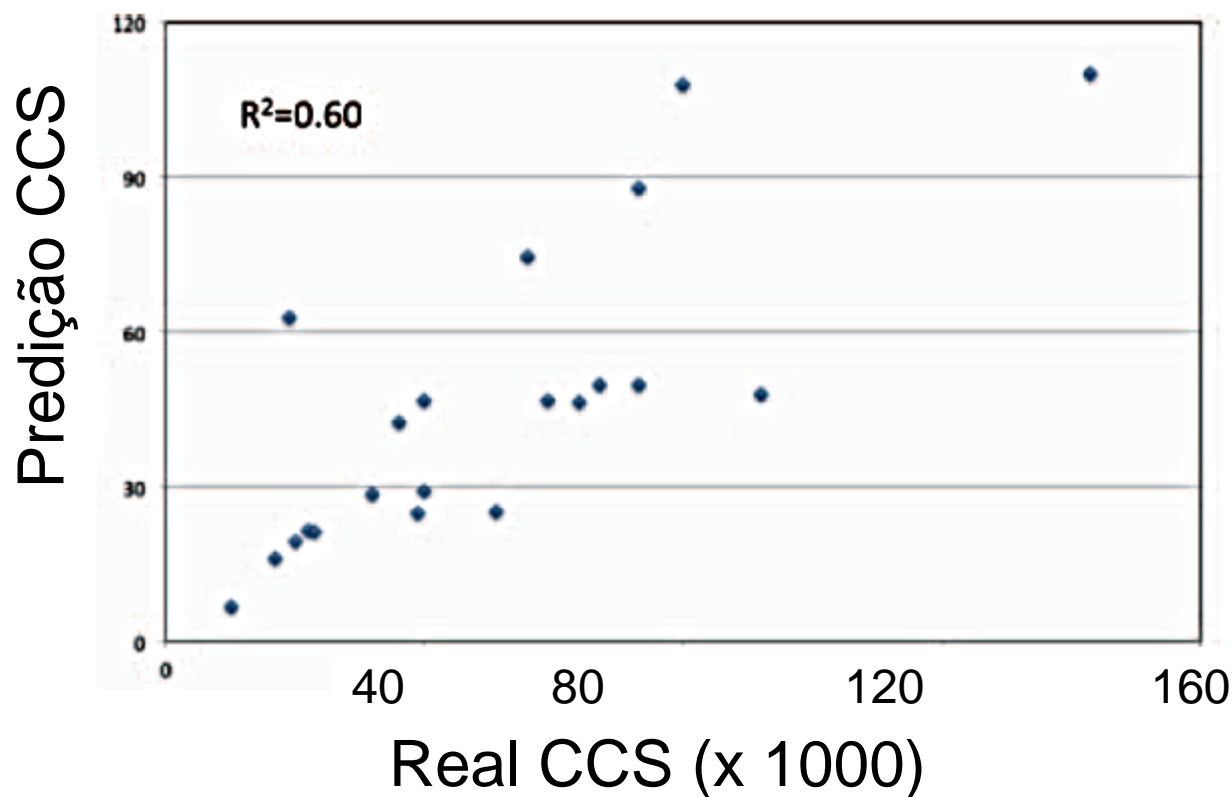


700K SNP

Atual CCS

Dados reais

($P=0.001$)



- 8.696 SNPs
- 21 Vacas CCS
- 19 vacas não aportaram CCS
- <10.000 CCS ($P=0.006$)

Resultados

- Quanto maior a concentração de CCS, menor foi o valor de P. (dados não mostrados)
- Os resultados dos dados simulados apresentaram maior correlação ($R^2 > 0,98$) do que os resultados reais ($R^2 = 0,60$).
 - Impresição na CCS real
 - Desequilíbrio de ligação entre os modelos
 - Parentesco entre vacas reais

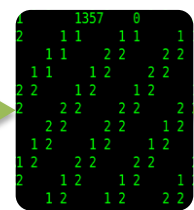
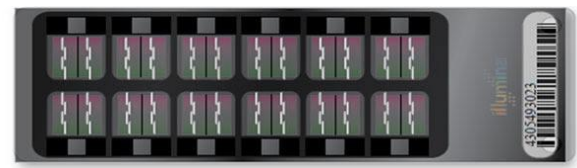
Ainda assim, evidencia-se a eficiência do método em identificar vacas com mastite subclínica

Conclusão

A genotipagem dos animais e consequente monitoramento de leite do tanque, pode ser eficaz para a identificação e controle de vacas com mastite subclínica.



Implicações



Mastite subclínica

Monitoramento

Microbioma

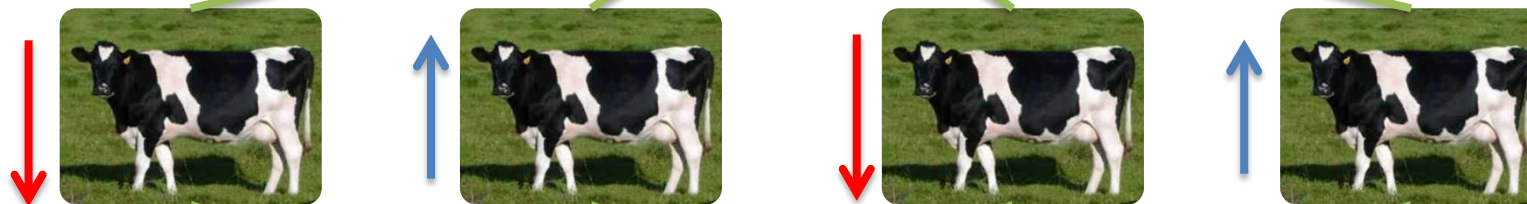


Genótipos SNPs



Relação com:
Parâmetros produtivos;
Reprodutivos
Transtornos metabólicos
Doenças

Genótipo



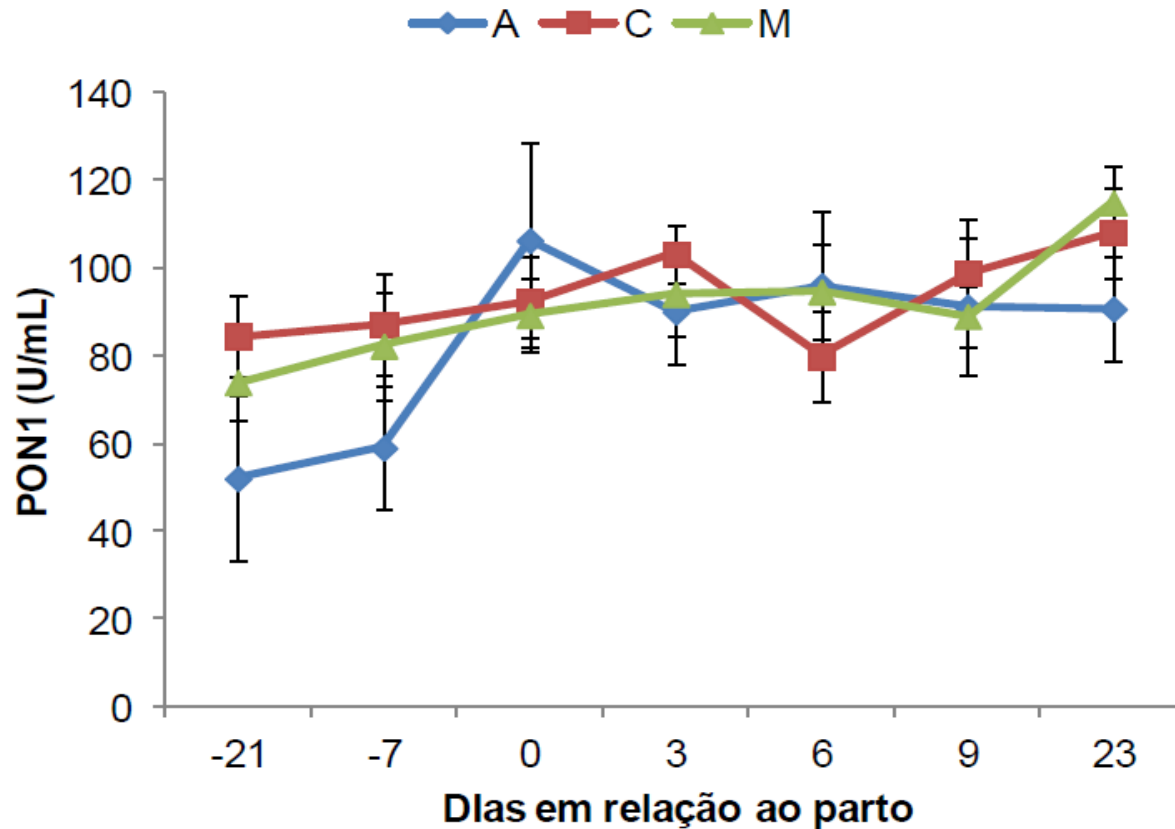
CCS

Outros parâmetros...

Efeito de polimorfismos no gene da PON-1 sobre a sua atividade sérica



Objetivo: avaliar a relação de polimorfismos observados na região promotora do gene da PON1 sobre a atividade sérica desta proteína no periparto vacas leiteiras.



Não houve diferença na atividade sérica da PON-1 em relação aos alelos A, C ou M na posição -393 do gene PON1.



Trabalhos do Nupeec



Dados não publicados:

Vacas carreadoras do genótipo AA na região -221 possuem atividade sérica duas vezes maiores do que as portadoras do genótipo GG.

Não houve diferença na atividade sérica da PON-1 em relação aos alelos A, C ou M na posição -393 do gene PON1.

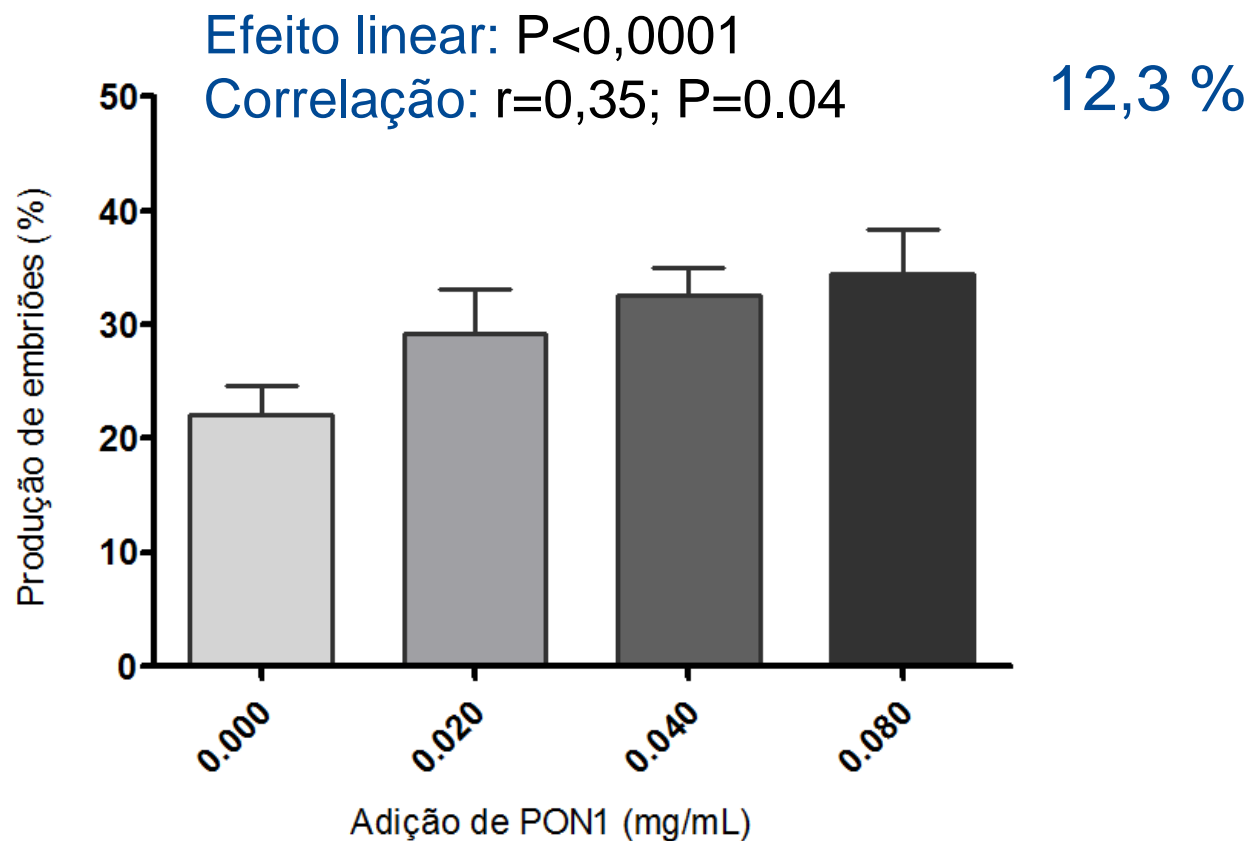


Joao Alvarado

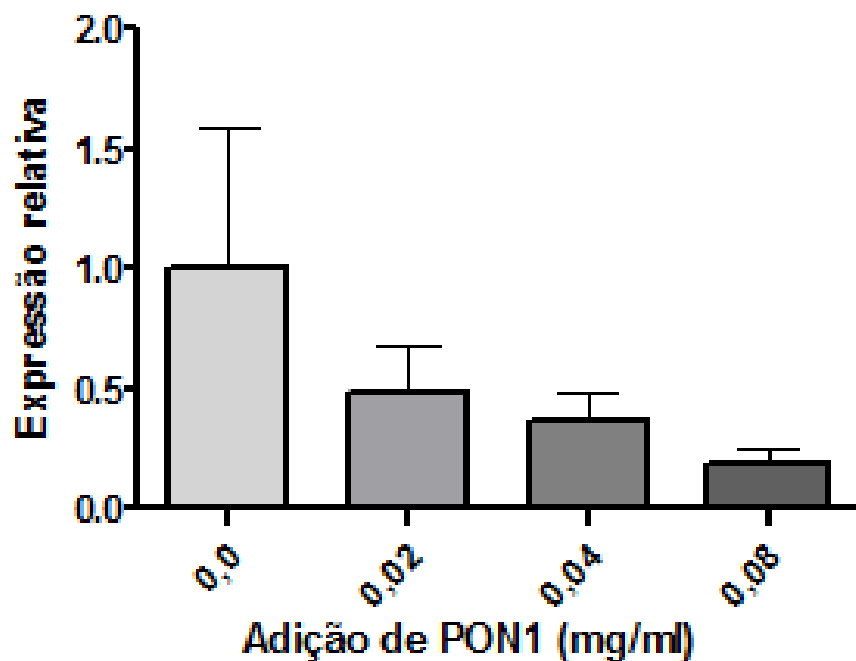
Efeito da paraoxonase 1 durante a maturação ovocitária sobre a expressão dos genes BCL2, BAX, INT-t no desenvolvimento de embriões bovinos em produção in vitro

Objetivo: avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 ao meio de maturação in vitro mediante taxas de clivagem, blastocistos em D2 e D7 do cultivo e a expressão dos genes respectivamente.

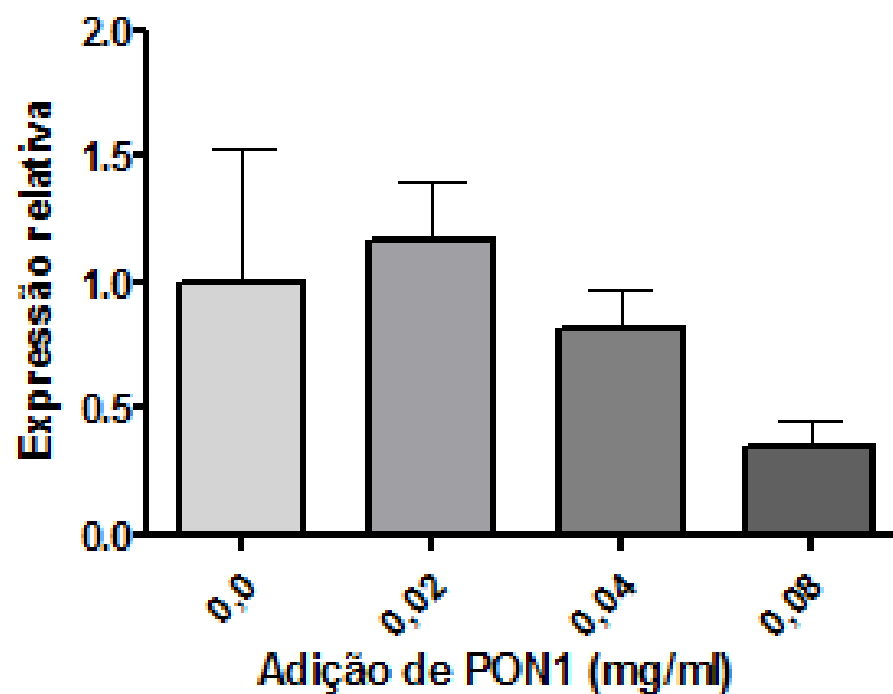
Desenvolvimento



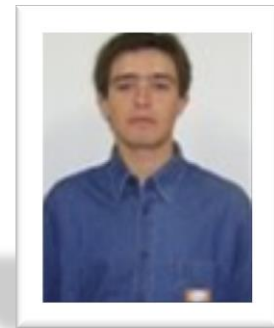
MNSOD



BAX



Efeito de polimorfismo nos genes GHR e IGF-I na fertilidade e produção de leite de vacas da raça Holandês



Objetivo: avaliar o efeito dos polimorfismos nos genes GHR e IGF-I na fertilidade e produção de leite de vacas da raça Holandês

Resultados parciais: não teve diferença estatística nas vacas da granja 4 irmãos.



Obrigado!!!!

thais_casarin@hotmail.com, Joaoal13@hotmail.com