

Avaliação de mutações no gene receptor da prolactina em bovinos da raça Holandesa do Instituto Agrônomo de Pernambuco

Clarissa Vidal de Carvalho⁽¹⁾⁽⁷⁾, Ariany Lacerda Nogueira⁽²⁾, João Marcos Alves da Silva⁽³⁾, Robert Domingues⁽⁴⁾, Marco Antônio Machado⁽⁵⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁵⁾, Sebastião Inocêncio Guido⁽⁶⁾, Marcos Vinícius Gualberto Silva⁽⁵⁾, Luiz Sergio de Almeida Camargo⁽⁵⁾ e Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq.), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Pesquisadores, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾Pesquisador, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Estação Experimental de São Bento do Una, PE. ⁽⁷⁾E-mail: clarissavidal4gmail.com.

Resumo – Os bovinos e sua produtividade são altamente influenciados pelas condições ambientais. Mutações no gene do receptor de prolactina, PRLR, foram associadas ao fenótipo conhecido como slick hair, caracterizado por animais com pelagem mais curta e menor densidade folicular em comparação a animais selvagens, levando a uma melhor termorregulação, e conseqüentemente, maior produtividade. O presente trabalho avaliou, através de genotipagem e sequenciamento, a presença de mutações no gene PRLR, em uma população de 71 animais da raça Holandesa do Instituto Agrônomo de Pernambuco, adaptados e com boa produtividade em clima tropical. Todos os animais apresentaram o alelo tipo selvagem CC. Uma nova mutação foi encontrada, troca de T para G em outro ponto, resultando na troca de aminoácidos de cisteína para glicina. Não foi encontrada nenhuma mutação que cause slick hair nesta população. A identificação de polimorfismos dentro de genes contribui para a descoberta de novas variações proteicas e podem ser aplicadas em pesquisas futuras.

Termos para indexação: PRLR, pelagem, produtividade, genotipagem, sequenciamento.

Evaluation of mutations in the prolactin receptor gene in Holstein cattle from the Agronomic Institute of Pernambuco

Abstract – Cattle and their productivity are highly influenced by environmental conditions. Mutations in the prolactin receptor gene, PRLR, have been associated with the phenotype known as slick hair, characterized by animals with shorter hair and lower follicular density compared to wild-type animals, leading to better thermoregulation and, consequently, greater productivity. This study evaluated, through genotyping and sequencing, the presence of mutations in the PRLR gene in a population of 71 Holstein cattle from the Agronomic Institute of Pernambuco, which are adapted and have good productivity in a tropical area. All animals presented the wild-type CC allele. A new mutation was found, a T to G substitution at another point, resulting in the amino acid change from cysteine to glycine. No mutations causing slick hair were found in this population. The identification of polymorphisms within genes contributes to the discovery of new protein variations and can be applied in future research.

Index terms: PRLR (Prolactin Receptor Gene), coat, productivity, genotyping, sequencing.

Introdução

A temperatura ambiental é um importante fator de pressão seletiva e já resultou em diversas adaptações nos mamíferos eutérios, como os bovinos, que regulam a temperatura corporal de maneira homeotérmica (Littlejohn et al., 2014). Adaptações relacionadas a temperaturas mais baixas como as apresentadas por *Bos taurus*, incluem camadas mais espessas de gordura subcutânea e pelagem maior e mais espessa. Em contrapartida, animais como *Bos indicus*, mais adaptados ao calor tendem a apresentar camadas de gordura mais finas e distribuídas de forma restrita em diferentes regiões do corpo, e uma pelagem menos espessa. (Porto Neto et al., 2018). Além de influenciar no bem estar animal, existem evidências que apontam uma forte interferência do estresse térmico por calor na produção leiteira (Dikmen et al., 2014; Huson et al., 2014) e reprodução de bovinos (Ortiz-Colón et al., 2018).

Uma mutação identificada inicialmente no gene do receptor de prolactina (PRLR) em bovinos da raça Senepol (Dikmen et al., 2014) foi associada a um fenótipo conhecido como *slick hair*, que caracteriza os animais com pelagem mais curta e menor densidade folicular em comparação aos animais do tipo selvagem. Este fenótipo torna a termorregulação mais eficiente pois facilita a dispersão e perda de calor da superfície da pele e assim tem relevância nos âmbitos econômico e produtivo. Estudos indicam que vacas produtoras de leite com o fenótipo *slick hair* são mais eficientes durante períodos de estresse térmico por calor em comparação a vacas que não apresentam este fenótipo (Dikmen et al., 2014; Huson et al., 2014).

O gene PRLR em sua forma selvagem codifica uma proteína de 581 aminoácidos. Determinadas mutações do tipo deleção e substituição de nucleotídeos já foram descritas em raças taurinas. A mutação p.R497 em que o nucleotídeo C é substituído por T na posição 39136666, gera um códon de parada e, conseqüentemente, uma menor isoforma desse receptor (Porto-Neto et al., 2018). Esta mutação pontual, foi encontrada nas raças Limonero e Carora, e também em raças taurinas brasileiras localmente adaptadas como Caracu, Pantaneiro, Mocho Nacional e Criolo Lageano (Faza et al., 2021). No entanto, nenhuma mutação no gene PRLR relacionada ao fenótipo *slick hair* foi identificada em animais da raça Holandesa, reconhecida pela alta produtividade leiteira e sensibilidade ao estresse térmico por calor. No Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado na região Nordeste do Brasil, existe uma população de bovinos da raça Holandesa adaptados ao clima tropical. Estes animais mantêm bons índices de produtividade, mesmo com temperaturas desfavoráveis e pode-se notar que alguns deles apresentam pelos mais curtos e lisos. O objetivo do presente trabalho é realizar a genotipagem e o sequenciamento de animais da raça holandesa pertencentes ao rebanho do IPA, com o intuito de detectar possíveis mutações no gene PRLR, que possam influenciar na pelagem de animais da raça Holandesa associada ao fenótipo do *slick hair*.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 1 – “Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares”; ODS 2 - “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável”; ODS 8 – “Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos”; ODS 12 - “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

Foi realizada a extração do DNA de 71 amostras de pelo bovino através de um protocolo ajustado baseado nas técnicas descritas por Sambrook e Russel (2001). A genotipagem dos animais para o SNP do gene PRLR, na posição 39136666, foi realizada a partir da técnica tetra-primers ARMS-PCR (Li et al., 2014), conforme descrito por Faza et al. (2021). Após o processamento, as bandas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo a 8% e visualizadas por coloração com nitrato de prata.

O sequenciamento de 15 amostras foi realizado pela técnica de Sanger usando os *primers outers*, descritos por Faza et al. (2021) no equipamento SeqStudio usando as recomendações do kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems USA). As sequências foram analisadas pelos programas DNA Baser Assembler versão 5.21.0 e Mega versão 11.0.13 (Tamura et al., 2021).

Resultados e discussão

Dos 71 animais genotipados pela técnica Tetra-primers ARMS-PCR, todos apresentaram o genótipo CC na posição 39136666, ou seja, não possuem a mutação que causa o fenótipo *slick hair*, encontrada em outras raças taurinas no Brasil. Este resultado foi esperado, uma vez que mutações neste local estão ausentes na raça Holandesa pura, apesar de estarem presentes em alguns poucos animais gerados por cruzamento absorvente com a raça Senepol nos Estados Unidos (Dikmen et al., 2014). Em relação aos 15 animais sequenciados, todos confirmaram o genótipo CC na posição 39136666, porém, numa posição de 36 pares *upstream*, na posição 39136630, foi observado que 3 dos 15 animais possuíam uma substituição de T para G em um dos alelos. Ou seja, 12 animais apresentaram o genótipo TT e 3 animais apresentaram o genótipo TG. A substituição analisada, gera uma troca de aminoácidos na posição 485 da proteína, de uma cisteína para uma glicina. Essa substituição não levou a um códon de parada como as outras que causam *slick hair* e não estava relacionada ao tamanho do pelo do animal. A identificação desse novo SNP contribui para uma compreensão mais abrangente da variação genética na região e tem valor significativo no avanço do nosso conhecimento dos mecanismos genéticos subjacentes implicados nessa característica.

Conclusões

O rebanho da raça Holandesa do IPA, embora apresente relatos de diferenças na pelagem, termotolerância e boa produtividade em clima tropical, não apresentou o alelo causador do fenótipo *slick hair* descrito em outras raças taurinas brasileiras localmente adaptadas. A única mutação relatada, em heterozigose e em poucos animais, causava apenas uma troca de aminoácidos no gene PRLR. Mais estudos são necessários para identificar a causa deste fenômeno. A identificação de polimorfismos dentro de genes contribui para a descoberta de novas variações proteicas e podem ser aplicadas em pesquisas futuras.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil e à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa Pibic, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; à analista Daniele Faza pela orientação.

Referências

- DIKMEN, S.; KHAN, F. A.; HUSON, H. J.; SONSTEGARD, T. S.; MOSS, J. I.; DAHL, G. E.; HANSEN, P. J. The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5508-5520, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8087>.
- FAZA, D.; PEREIRA, H.; TORRES-JÚNIOR, A.; KIM, E.; SOSTENGARD, S.; MARTINS, M.; PANETTO, J.; SILVA, M.; MACHADO, M. Development of tetra-primer ARMS-PCR protocol to genotype the prolactin receptor SNP 39136666 and assessment of this SNP in Brazilian locally adapted cattle breeds. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 2, p. 534-538, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12104>.
- HUSON, H. J.; KIM, E.-S.; GODFREY, R. W.; OLSON, T. A.; MCCLURE, M.; CHASE, C. C.; RIZZI, R.; O'BRIEN, A.; TASSELL, C.; GARCIA, J.; SONSTERGARD, T. Genome-wide association study and ancestral origins of the slick hair coat in tropically adapted cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 101, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389%2Ffgene.2014.00101>.
- LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: an example from SIRT2. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1835-1840, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3AY41370E>.
- LITTLEJOHN, M. D.; HENTY, K. M.; TIPLADY, K.; JOHNSON, T.; HARLAND, C.; LOPDELL, T.; SHERLOCK, R.; LI, W.; LUKEFAHR, S.; SHANKS, B.; GARRICK, D.; SNELL, G.; SPELMAN, R.; DAVIS, S. Functionally reciprocal mutations of the prolactin signalling pathway define hairy and slick cattle. **Nature Communications**, v. 5, article 5861, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6861>.
- ORTIZ-COLÓN, G.; FAIN, S. J.; PARÉS, I. K.; CURBELO-RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ-CABÁN, E.; PAGÁN-MORALES, M.; GOULD, W. A. Assessing climate vulnerabilities and adaptive strategies for resilient beef and dairy operations in the tropics. **Climatic Change**, v. 146, p. 47-58, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10584-017-2110-1>.
- PORTO-NETO, L. R.; BICKHART, D. M.; LANDAETA-HERNANDEZ, A. J.; UTSUNOMIYA, Y. T.; PAGAN, M.; JIMENEZ, E.; HANSEN, P. J.; DIKMEN, S.; SCHROEDER, S. G.; KIM, E.-S.; SUN, J.; CRESPO, E.; AMATI, N.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; GARCIA, J. F.; REVERTER, A.; BARENDSE, W.; SONSTEGARD, T. S. Convergent evolution of slick coat in cattle through truncation mutations in the prolactin receptor. **Frontiers in Genetics**, v. 9, article 57, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00057>.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.