

EFEITO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA PARAOXONASE (PON1) SOBRE A SUA ATIVIDADE SÉRICA

PEDRO AUGUSTO SILVA SILVEIRA^{1*}; MARCIO NUNES CORRÊA^{2*};
FRANCISCO AUGUSTO BURKERT DEL PINO^{2*}; JÉSSICA HALFEN^{2*}; TIAGO
GARLET^{2*}; AUGUSTO SCHNEIDER^{3*}

¹ Faculdade de Veterinária, pedrosilveira3@hotmail.com

² Faculdade de Veterinária, marcio.nunescorreia@gmail.com; fabdelpino@gmail.com;
halfen.jessica@hotmail.com; garlettiago.garlet@hotmail.com

³ Faculdade de Nutrição, augustoschneider@gmail.com

*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)
Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil
nupeec@ufpel.edu.br – www.ufpel.edu.br/nupeec

1. INTRODUÇÃO

Durante o periparto, período compreendido entre as três últimas semanas de gestação e as três primeiras semanas de lactação, as diversas alterações metabólicas e hormonais que são observadas no organismo da vaca, como eventos necessários para o desenvolvimento final do feto, preparação para o parto e para a lactação, fazem com que o sistema imunológico do animal torne-se mais frágil, predispondo-o às diversas doenças (CHAMBERLIN et al., 2013). Neste momento, a identificação precoce dos animais predispostos a desenvolver doenças é fundamental tanto para o tratamento destes quanto para a intervenção com medidas preventivas para todo o rebanho. Além disto, o conhecimento de genótipos e marcadores moleculares que possam apontar os animais mais suscetíveis passa a ser uma vantagem na seleção genética e tomada de decisões visando melhorar o perfil imunológico e reduzir as doenças no rebanho, mesmo antes do período crítico.

A paraoxonase (PON1) é uma proteína sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, possuindo atividade de hidrolase. Durante processos inflamatórios que causam dano ao fígado a PON1 atua como um indicador da função hepática, auxiliando no diagnóstico precoce de diversas doenças. Ela é caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta a citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007). Eventos que danificam as camadas celulares de lipopolissacarídeos e o estresse oxidativo levam a redução da atividade plasmática da PON1. Também a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais da PON1. Porém, muito do que se sabe até hoje a respeito do comportamento da PON1 e sua relação com as doenças baseia-se em estudos envolvendo humanos e camundongos, devendo-se validar estes conhecimentos e ampliá-los em bovinos (FARID et al., 2013).

O gene da PON1 está presente no cromossomo quatro dos bovinos e apresenta aproximadamente 33 kpb. Em humanos diversos polimorfismos encontrados neste gene provaram interferir diretamente na expressão da proteína. Um exemplo é a mutação PON1_{Q192R}, que causa a substituição de uma glutamina por uma arginina na posição 192 da proteína. Outro polimorfismo bastante descrito é o PON1_{L55M}, uma substituição da leucina pela metionina na

posição 55 do gene. Estas alterações, além de alterarem a atividade da PON1 na circulação estão associadas com uma série de doenças circulatórias em humanos (MACKNEES et al., 2001). Porém, pouco se sabe a respeito da interferência do genótipo sobre a atividade da PON1 em ruminantes. Existem alguns relatos de polimorfismos na região promotora do gene da PON1 alterando o nível circulante desta enzima (LI et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação de polimorfismos observados na região promotora do gene da PON1 sobre a atividade sérica desta proteína no periparto vacas leiteiras.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 20 vacas da raça holandês, criadas em um sistema semi-extensivo no município de Rio Grande, sul do Brasil. Foram feitas coletas de sangue de todas as vacas, através de punção da veia coccígea. As amostras foram divididas em dois frascos, um com anticoagulante (EDTA 10%), utilizado para as análises moleculares, e outro sem anticoagulante, para as análises bioquímicas. Considerando-se o dia do parto como o dia 0, todas as vacas foram coletadas nos dias -21, -7, 0, 3, 6, 9 e 23, totalizando 7 coletas. Os frascos sem anticoagulantes foram centrifugados a 1500 rpm imediatamente após as coletas, e o soro foi congelado a -20°C até o momento das análises.

Para determinação da atividade sérica da paraoxonase foi utilizado um tampão 20 mM Tris/HCl, 1 mM cloreto de cálcio e 4mM fenilacetato para preparo da solução de trabalho. As amostras eram misturadas ao Tampão 20mM Tris/HCl na proporção de 10 µl da amostra para 20 µl do tampão. A leitura era realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 µl da amostra diluída e 500 µl da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: Δ Absorbância x 115 x 3.

Foi feita a extração do DNA das amostras de sangue total para a realização do PCR (reação em cadeia da polimerase), para o qual se utilizou as sequências de primers Forward: 3'-CGGTAATCCCTGAAGAATGC-5'; e Reverse: 3'-GCACTTCCTACCCTGCTTTG, visando obter um fragmento com 828 pb. A reação utilizou as temperaturas de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 57°C e 45 s a 72°C, após a solução ficava por 10 min a 72°C. Foi realizado uma eletroforese com gel de agarose a 1%, do qual foi recortada a banda de DNA na posição equivalente aos 828 pb. Esta alíquota de gel foi purificada através através da utilização de um kit comercial (Bio Basic Inc., Ontário, Canadá). As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento de DNA, através do método de Sanger. As amostras foram sequenciadas no sentido forward e reverse.

A análise estatística foi feita através do método de Tukey-Kramer (SAS 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e foi considerada como diferença estatística valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados três alelos distintos na posição 465 do fragmento analisado, o qual continha 828 pb. São eles: A – Adenina, C – Citosina e M – Adenina/Citosina (heterozigoto). Este polimorfismo está localizado na posição -393, considerando-se como 0 o início do exon 1 do gene PON1. Isto caracteriza um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região equivalente ao promotor deste gene. Na tabela 1 são apresentadas as porcentagens encontradas dos

diferentes alelos entre os animais, assim como as concentrações médias de PON nos dias avaliados, as quais não foram diferentes estatisticamente entre os alelos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Média da paraoxonase para os diferentes alelos encontrados na região -393. Não houve diferença estatística entre os alelos ($p > 0,05$).

| Alelo | Porcentagem de animais (%) | Média da PON (U/mL) |
|-------|----------------------------|---------------------|
| A | 25 (5/20) | 87,7 ± 32,2 |
| C | 40 (8/20) | 92,6 ± 13,2 |
| M | 35 (7/20) | 91,6 ± 13,2 |
| | 100 | 90,6 |

O gráfico 1 mostra a atividade da paraoxonase durante as semanas de coleta em relação aos diferentes alelos. Embora existam algumas diferenças entre as datas de coleta, inclusive dentro dos grupos, não foi observada diferença estatística entre os alelos em nenhuma das datas. Porém, na coleta -21 há uma tendência ($p = 0,0591$) de que a atividade da paraoxonase dos animais com o alelo A seja menor do que esta atividade para os animais com o alelo C.

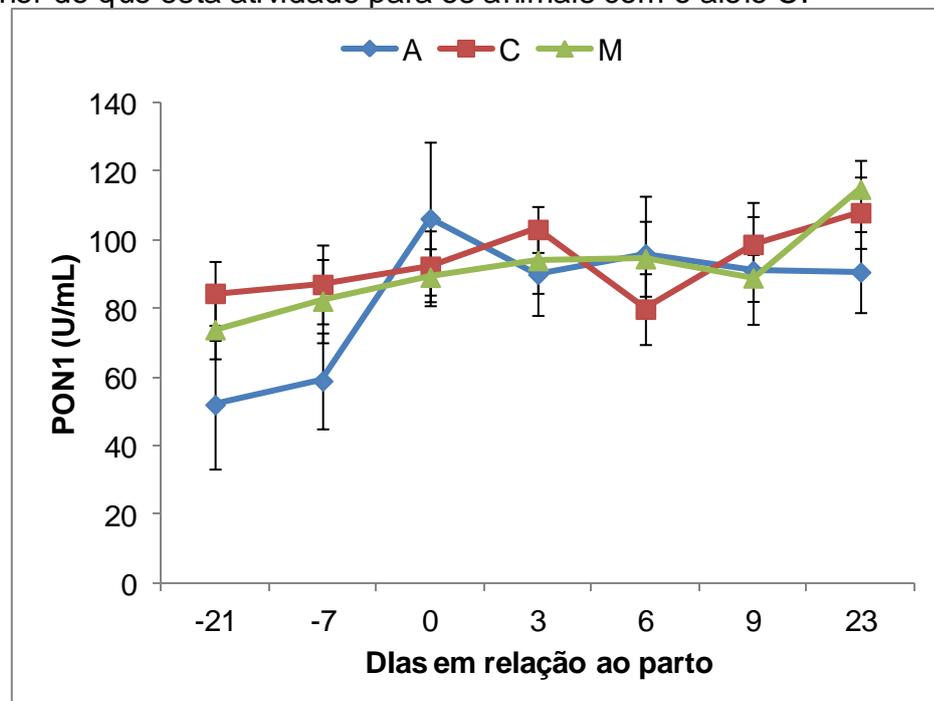


Gráfico 1. Médias de atividade da PON entre os grupos, nos dias avaliados. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma data ($p > 0,05$).

O estudo de BIONAZ et al. (2007) encontrou valores médios da PON neste período inferiores aos nossos (66,4 U/ml), assim como um comportamento diferente da PON, que reduzia no período pré-parto, alcançando seus menores níveis no dia 7 pós-parto. Porém FARID et al. (2013) encontrou valores semelhantes aos encontrados por nós (82,11 U/ml), porém avaliando vacas que não estavam prenhes.

Vários trabalhos em humanos descreveram polimorfismos, tanto na região codificadora quanto na região identificada como o promotor do gene. Considerando-se o início do gene PON1 como a posição 0, BROPHY et al. (2001) encontrou uma mutação na região -108 com um efeito significativo sobre a atividade da PON. Neste mesmo estudo, outro polimorfismo na região -162

mostrou um efeito menor sobre a atividade da proteína. Já o polimorfismo na região -909 também parece não interferir de forma significativa na atividade da PON.

Avaliando o DNA humano, alelos como a timina (T) na posição -107, guanina (G) na posição -824 e G na posição -907 estão correlacionados com uma maior concentração e atividade da PON e, ainda o -107T parece apresentar dominância na expressão do gene PON1 (LEVIEV et al., 2000). Porém, a regulação da expressão do gene PON1 é dependente de alguns fatores ambientais, onde apenas a regulação gênica não é capaz de determinar a atividade da proteína. Por outro lado, indivíduos genotipicamente ineficientes em expressar a PON não conseguirão elevar seus níveis até valores considerados ótimos. Estes indivíduos, uma vez identificados podem passar a receber um tratamento diferenciado como grupo de risco, principalmente em situações críticas (LI et al., 2003).

4. CONCLUSÕES

Não houve diferença na atividade sérica da PON em relação aos alelos A, C ou M na posição -393 do gene PON1. Porém, o aumento do número de animais em estudo pode tornar mais clara a compreensão deste SNP, e de outros que surgirão, sobre a expressão da PON.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 90, 1740–1750. 2007.

BROPHY, V. H.; JAMPSA, R. L.; CLENDENNING, J. B.; MCKINSTY, L. A.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **Am. J. Hum. Genet.** 68:1428–1436. 2001.

CHAMBERLIN, W. G.; MIDDLETON, J. R.; SPAIN, J. N.; JOHNSON, G. C.; ELLERSIECK, M. R.; PITHUA, P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of dairy science**. 2013.

FARID, A. S.; HONKAWA, K.; FATH, E. M.; NONAKA, N.; & HORII, Y. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC veterinary research**. 9(1), 73. 2013.

LEVIEV, I.; JAMES, R. W. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 20:516–521. 2000.

LI, H. L.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **J. Mol. Med.** 81(12):766-779. 2003.

MACKNESS, B.; GERSHAN, K. D.; TURKIE, W.; LEE, E.; ROBERTS, D. H.; HILL, E.; ROBERTS, C.; DURRINGTON, P.; MACKNESS, M. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 21:1451–1457. 2001.

