

## CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA PARAOXONASE 1 EM VACAS DA RAÇA NELORE

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO<sup>1</sup>; BRUNA MION<sup>2</sup>; JOSÉ VICTOR ISOLA<sup>3</sup>; PEDRO AUGUSTO SILVA SILVEIRA<sup>4</sup>; LUIZ FRANCISCO MACHADO PFEIFER<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – nataliavetufpel@gmail.com; <sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – brunamion@gmail.com; <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jv.isola@hotmail.com; <sup>4</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense – pedrosilveira3@hotmail.com; <sup>5</sup>Embrapa - Rondônia – luiz.pfeifer@embrapa.br; <sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas– augustoschneider@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima sintetizada no fígado e encontrada no soro associada à lipoproteína de alta densidade (HDL), atuando como fator de proteção contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL; AVIRAM, 1999). A PON1 reduz sua atividade em casos de processo inflamatório (BIONAZ et al., 2007), sendo, em bovinos considerada um confiável biomarcador de saúde uterina, especialmente em vacas leiteiras pós-parto (SCHNEIDER et al., 2013). Além disso, maiores níveis de PON1 têm sido associados com maiores índices de fertilidade em vacas leiteiras logo após o parto (KRAUSE et al., 2014) e também com a melhora no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (RINCÓN et al., 2016).

Em bovinos, o gene da PON1 é localizado no cromossomo quatro e possui aproximadamente 33.000 pares de base (número de acesso NCBI: AC\_000161.1). Recentemente, sete polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram descritos na região promotora do gene da PON1 bovina, sendo que o SNPs presentes nas posições -221 foi fortemente associado com a atividade sérica de PON1 (SILVEIRA ET AL., 2015). Além disso, o SNP localizado na posição -221 foi identificado como um local para transcrição de moduladores da resposta de fase aguda (WEDEL & ZIEGLER-HEITBROCK, 1995), que pode afetar a saúde uterina de vacas no pós-parto, refletindo-se na redução da fertilidade desses animais. Entretanto, até o momento não há estudos avaliando a ocorrência e localização de SNPs na região promotora do gene da PON1 em bovinos *Bos indicus*. Além disso, não existe uma padronização para a técnica de genotipagem em bovinos da raça Nelore.

Com base nessas considerações, os objetivos deste estudo foram caracterizar SNPs na região promotora do gene da PON1 bovina e padronizar a técnica de genotipagem por enzima de restrição para avaliar a distribuição genotípica da posição -221 da região promotora do gene da PON1 bovina em vacas da raça Nelore.

### 2. METODOLOGIA

Para este experimento, foi feita extração de DNA de amostras de sangue de 17 vacas da raça Nelore. A região promotora de 828 pares de base (pb) do gene da PON1 bovina foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) incluindo 80 pb do primeiro exon e 78 pb da região reguladora a montante, através do uso de primers específicos (Forward: 5'-

CGGTAATCCCTGAAGAATGC-3' e Reverse: 5'-GCACTTCCTACCCTGCTTTG-3). Para a amplificação foram feitos 40 ciclos de 95°C por 45 s, 57° por 45 s e 72°C por 1 min e a análise do produto do PCR foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo detectado um único amplicon em torno de 800 pb.

Os produtos de PCR adequadamente amplificados foram, então submetidos a sequenciamento (HELIXXA) para determinação da ocorrência e localização de SNPs. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas através do software BioEdit (Ibis Biosciences), sendo utilizada a sequência de PON1 bovina publicada no NCBI (número: AC\_000161.1) como referência para o alinhamento. As posições dos SNPs foram determinadas com base nos dados de estudo anteriormente realizado em vacas da raça Holandês (SILVEIRA et al., 2015).

Após, com o intuito de padronizar da técnica de genotipagem em vacas Nelore, cinco amostras de DNA foram inicialmente amplificadas por PCR e em seguida os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática por polimorfismo de restrição específica para identificar a o SNP na posição -221, utilizando-se a enzima BseLI, incubada com o produto de PCR a 37° C por 12 horas. A genotipagem foi analisada após 2h de corrida dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose a 2,5% e a visualização dos segmentos gênicos amplificados e digeridos foi feito em luz ultravioleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do sequenciamento dos nucleotídeos da região promotora do gene da PON1 bovino indicaram a presença de oito SNPs nesta região em amostras de vacas da raça Nelore (tabela 1). As posições dos SNPs foram numeradas em relação ao primeiro nucleotídeo da sequência de mRNA publicado (NM\_001046269.2), conforme descrito por SILVEIRA et al. (2015). Neste estudo, foi, também, feita a padronização da genotipagem por enzima de restrição do polimorfismo -221 na região promotora do gene da PON1 em bovinos da raça Nelore (figura 1). A genotipagem deste SNP foi feita pelo fato deste SNP estar associado aos outros polimorfismos presentes na região promotora do gene da PON1. Além disso, o SNP -221 parece estar associado com performance reprodutiva, saúde e produção em vacas leiteiras (SILVEIRA ET AL., 2018). Na genotipagem, foram encontrados os genótipos AA e GG, não sendo detectado nenhum animal heterozigoto (figura 1).

Tabela 1. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) identificados na região promotora do gene da paraoxonase 1 (PON1) de bovinos em vacas da raça Nelore

Posição do SNP	Genótipos		
-105	AA 1/17 (5,9%)	AG 1/17 (5,9%)	GG 15/17 (88%)
-111	TT 5/17 (71,4%)	TC 0/17 (0%)	CC 12/17 (70,6%)
-130	AA 12/17 (70,6%)	AG 0/17 (0%)	GG 5/17 (29,4%)
-221	AA	AG	GG

	1/17 (5,9%)	1/17 (5,9%)	15/17 (88%)
-267	AA	AG	GG
	12/17 (70,6%)	0/17 (0%)	5/17 (29,4%)
-392	AA	AC	CC
	10/17 (58,8%)	2/17 (11,8%)	5/17 (29,4%)
-440	CC	CT	TT
	4/17 (23,5%)	1/17 (5,9%)	12/17 (70,6%)
-455	CC	CT	TT
	5/17 (29,4%)	0/17 (0%)	12/17 (70,6%)

Ao pesquisar ocorrência de haplótipo, foi observado que 70% das vacas apresentaram o haplótipo GG|CC|AA|GG|AA|AA|TT|TT como homozigose em todas as posições deste polimorfismo. Neste sentido, o próximo passo deste estudo é determinar se este haplótipo está associado com alterações nos níveis de atividade sérica da PON1.

Apesar do baixo número de animais utilizados neste estudo, os resultados indicaram haver diferenças nas proporções dos genótipos encontrados nas vacas deste estudo, em comparação com o que foi descrito em vacas da raça Holandês (SILVEIRA et al., 2015). Um exemplo é o SNP localizado na posição -221, em que houve uma predominância do genótipo GG (88%), enquanto que em vacas da raça Holandês, foi relatada uma predominância de 64% do genótipo AA (SILVEIRA et al., 2015). Além disso, em vacas leiteiras da raça Holandês foi relatado 31% de genótipo AG (SILVEIRA et al., 2015), enquanto que no presente estudo, apenas 6% das vacas apresentaram este genótipo na mesma posição. Neste sentido, é importante que mais estudos sejam feitos, no intuito de determinar a associação dos diferentes genótipos com possíveis alterações de saúde e fertilidade dos animais.

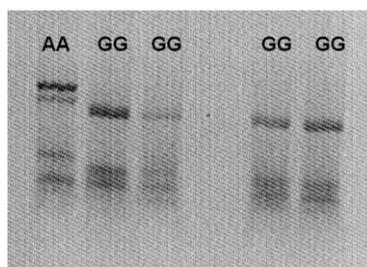


Figura 1. Imagem do gel de agarose a 2,5% corado com SYBR, contendo os segmentos gênicos amplificados digeridos pela enzima BseLI.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicaram a presença de oito polimorfismos de nucleotídeo único na região promotora do gene da PON1 bovina em vacas da raça Nelore. Além disso, foi possível padronizar a técnica de genotipagem do polimorfismo -221 por enzima de restrição da região promotora do gene da PON1 bovina em vacas da raça Nelore. A partir desta padronização, será possível genotipar um número maior de amostras de DNA provenientes de animais da raça Nelore, no intuito de buscar relações desses SNPs com índices de saúde e fertilidade de vacas Nelore.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIRAM, M; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radic Biol Med** 37, 1304–1316, 2004.

KRAUSE, A.R.T.; PFEIFER, L.F.M., MONTAGNER, P.; WESCHNFELDER, M.M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.B.; MARTINS, C.F.; CORREA, M.N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.145, p. 8-14, 2014.

RINCÓN, J., MADEIRA, E.M., CAMPOS, F.T., MION, B., SILVA, J.F., ABSALÓN-MEDINA, V.A., BUTLER, W.R., CORRÊA, M.N., PEGORARO, L., SCHNEIDER, A. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reproduction of Domestic Animals**, Oxford, p. 1-4, 2016.

SCHNEIDER, A., ABSALÓN-MEDINA, V.A., ESPOSITO, G., CORREA, M.N., BUTLER, W.R. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction of Domestic Animals**, Oxford v. 48, n. 6, p. 989-994, 2013.

SILVEIRA, P.A.; SCHWEGLER, E.; MONTAGNER, P.; KRAUSE, A.R.; ACOSTA, D.A.; HALFEN, J.; GARLET, T.; BARROS, C.C.; CORRÊA, M.N.; SCHNEIDER, A. Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows. **Veterinarian Journal**, v. 205, p. 101-103, 2015.

SILVEIRA, P.A.S.; BUTLER, W.R.; COUNT, S.L.; OVERTON, T.R.; BARROS, C.C.; SCHNEIDER, A. Association of polymorphisms in the promoter region of paraoxonase 1 (PON1) gene with reproductive performance, health and milk production of Holstein cows. In: **32 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES**, Florianópolis, 2018. *Animal Reproduction*, 2018. v. 15. p. 536.

WEDEL, A.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. The C/EBP family of transcription factors. **Immunobiology**, v. 193, p. 171–85, 1995.