

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Caracterização de polimorfismos na região do
promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu
efeito sobre a atividade enzimática em vacas
leiteiras**

Pedro Augusto Silva Silveira

Pelotas, 2014

PEDRO AUGUSTO SILVA SILVEIRA

Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Augusto Schneider

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S587c Silveira, Pedro Augusto Silva

Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (pon1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras / Pedro Augusto Silva Silveira ; Augusto Schneider, orientador. — Pelotas, 2014.

35 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Dna. 2. Fatores de transcrição. 3. Enzima. 4. Snp. I. Schneider, Augusto, orient. II. Título.

CDD : 636.236

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (UFPel)

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros (UFPel)

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer (EMBRAPA - Rondônia)

Prof. Dr. Vinícius Farias Campos (UFPel)

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (UFPel) - Suplente

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Universidade Federal de Pelotas por disponibilizar a estrutura física e humana no desenvolvimento deste trabalho, instituição esta que vem sendo a minha segunda casa há alguns anos.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, *Campus Pelotas – Visconde da Graça*, por concordar e apoiar no que foi possível para que este projeto fosse concluído e espero assim continuar contribuindo cada vez mais com os objetivos da instituição.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), por ser a base forte para o surgimento e execução deste trabalho em equipe e, em especial, a Jéssica e ao Tiago pela indispensável colaboração.

Agradeço ao Augusto Schneider orientador, amigo e exemplo de pesquisador e ser humano, pela paciência e por não medir esforços em transmitir conhecimentos e guiar-me em mais esta empreitada. Obrigado por permitir que eu fizesse parte deste projeto fascinante!

Agradeço ao professor Marcio Nunes Corrêa pelos conselhos, pelas sábias palavras, pela cobrança quando foi preciso, pela amizade e pelo orientador e exemplo que sempre será.

Ao Lucas Hax, companheiro e colega de serviço, meu muito obrigado pela inestimável ajuda prestada nas mais diversas atividades, sem as quais nada disto seria possível.

Agradeço ao Diego Acosta pela fundamental contribuição para que iniciássemos o projeto e por mais uma vez trabalhar ao meu lado com muita disposição e alegria.

Agradeço aos meus amigos e familiares pelas risadas nos momentos alegres, pela palavra de apoio nos momentos difíceis e principalmente pela compreensão da minha ausência neste período de intenso trabalho.

Por fim, agradeço aos meus pais Sadi e Sônia e à minha irmã Cynara por estarem ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio e dedicação incondicionais, por me inspirarem a continuar e jamais desistir, por todas as conversas e conselhos... Enfim, dedico este trabalho a vocês.

A Deus, agradeço pela vida!

“O medo tem alguma utilidade, mas a covardia não.”
Mahatma Gandhi

Resumo

SILVEIRA, Pedro Augusto Silva. **Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras.** 2014. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Marcadores moleculares, cada vez mais, vem sendo utilizados em programas de melhoramento genético de bovinos leiteiros, incluindo várias características produtivas e sanitárias. Por outro lado, a reduzida atividade da paraoxonase (PON1) na circulação dos animais está associada com maior ocorrência de doenças nestes indivíduos, sendo que há pouca informação quanto a influência do gene da PON1 neste processo. O objetivo deste estudo foi caracterizar a ocorrência de polimorfismos na região promotora do gene da PON1, bem como avaliar a sua relação com a atividade sérica desta proteína no periparto de vacas leiteiras da raça Holandês. Foram utilizadas 28 vacas da raça Holandês, das quais coletou-se sangue para análise da atividade sérica da PON1. Estas avaliações foram feitas nos dias -21, -7, 0, 3, 6, 9, e 23 (dia 0 = dia do parto). Foi realizada a extração de DNA dos leucócitos circulantes e a partir daí foi feito o PCR dessas amostras, visando a amplificação de um fragmento de DNA contendo 828 pb no promotor da PON1. Após a eletroforese em gel de agarose, as amostras foram purificadas e sequenciadas para identificação dos polimorfismos. Foram encontrados seis SNPs no promotor do gene da PON1, localizados nas posições -22, -105, -221, -392, -611 e -676. Destes, os SNPs -105, -221 e -611 foram correlacionados com a atividade sérica da PON1 no período avaliado ($p<0,05$), sendo que os genótipos PON1-105(AA), PON1-221(AA) e PON1-611(CC) apresentaram os maiores níveis de PON1 ($p<0,05$). Além disto, os SNPs -105 e -221 apresentaram diferenças nos níveis de PON1 durante o pré-parto ($p<0,05$). Em conclusão, foram identificados 6 SNPs na região do promotor do gene da PON1, dos quais três estão associados com a atividade da enzima.

Palavras-chave: DNA. Fatores de Transcrição. Enzima. SNP.

Abstract

SILVEIRA, Pedro Augusto Silva. **Characterization of polymorphisms in the promoter region of the paraoxonase 1 (PON1) gene and its effect on enzyme activity in dairy cows.** 2014. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Molecular markers, increasingly are being used in breeding programs of dairy cattle, including several production and health characteristics. On the other hand, the reduced activity of paraoxonase (PON1) in the circulation of animals is associated with increased occurrence of diseases in these individuals, there is little information regarding the influence of the PON1 gene in this process. The aim of this study was to characterize the occurrence of polymorphisms in the promoter region of the PON1 gene and to evaluate its relationship with serum PON1 activity in peripartum dairy Holstein cows. For that blood was collected from 28 Holstein cows for analysis of serum activity of paraoxonase (PON1). The sampling was performed on days -21, -7, 0, 3, 6, 9 and 23 (day 0 = day of calving). DNA extraction was performed in circulating leukocytes and PCR of these samples was performed, targeting the amplification of a DNA fragment containing 828 bp in the PON1 promoter. After agarose gel electrophoresis, the samples were purified and sequenced to identify the polymorphisms. Six SNPs were found in the promoter of the PON1 gene, located at positions -22, -105, -221, -392, -611 and -676. From these, SNPs -105, -221 and -611 were associated with serum PON1 activity during the study period ($p < 0.05$), whereas the PON1-105(AA), PON1-221(AA) and PON1 -611(CC) genotypes had higher levels of PON1 ($p < 0.05$). Moreover, SNPs -105 and -221 had differences in the levels of PON1 already during the prepartum period ($p < 0.05$). In conclusion, 6 SNPs were identified in the promoter of the PON1 gene, three of which are associated with the activity of the enzyme.

Keywords : DNA . Transcription Factors . Enzyme. SNP .

Lista de Figuras

- Figura 1 Atividade sérica da PON1 (U/ml) (médias \pm EP) no periparto de vacas leiteiras, entre os dias -21 pré-parto e 23 pós-parto para os genótipos encontrados nos SNPs -105 (a), -221 (b) e -611 (a).....30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Efeito de polimorfismos encontrados na região do promotor do gene da PON1 sobre a atividade sérica de PON1 (U/mL) no período periparto de acordo com os genótipos identificados.....	29
Tabela 2	Sequência de nucleotídeos presentes no local de ligação dos fatores de transcrição, distribuídos entre os SNPs encontrados em vacas leiteiras.....	31

.SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 ARTIGO.....	16
4 CONCLUSÃO GERAL	33
5 REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Mutações são alterações na sequência normal dos nucleotídeos do material genético de um organismo (WATSON et al.; 2007). As mutações são herdáveis, podendo trazer ganhos aos indivíduos através da modificação estrutural que podem causar às proteínas que irão originar, otimizando sua ação. Porém, são na sua maior parte maléficas aos seus portadores, uma vez que têm a capacidade de alterar processos vitais como a replicação do DNA, a transcrição gênica (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1998), além de estarem associadas ao desenvolvimento de processos tumorais e morte celular.

Diferentes versões de certa sequência de DNA em um determinado *locus* são chamadas de alelos (WATSON et al.; 2007). Os polimorfismos genéticos são alelos múltiplos que coexistem entre os indivíduos de uma população. Porém, o alelo só será polimórfico se estiver distribuído em pelo menos 1% da população (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1998). O polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) são variações na sequência do DNA que alteram apenas uma base nitrogenada. Este é o tipo de mutação mais comum na maioria das espécies e seus efeitos vão desde mudanças morfológicas até diferenças na produtividade, resposta a doenças e fármacos (LIPSHUTZ et al., 1999). A seleção genética de bovinos, que historicamente vem sendo realizada através da manutenção de indivíduos com fenótipo desejável como progenitores para as gerações subsequentes, cada vez mais abre espaço para novas tecnologias como a genotipagem, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores. A maioria das características de interesse econômico em bovinos é controlada por vários genes. Entretanto, alguns desses genes apresentam um maior controle sobre o fenótipo expresso. A presença de SNPs nesses genes candidatos pode estar associada com fenótipos de interesse ou características indesejáveis. Por exemplo, a lecitina ligadora de manose é uma proteína importante na resposta imune inata. Yuan et al. (2013) encontraram 3 SNPs no seu gene (*MBL1*), todos no exon 2, dos quais a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) está relacionada com

o aumento na contagem de células somáticas (CCS) em vacas leiteiras, onde animais com genótipo GG obtiveram menores valores de CCS do que animais com genótipo AG e AA. Além disto, os animais GG apresentaram uma maior resistência a mastite do que os animais AA.

As características de conformação de patas e aprumos dos bovinos é uma avaliação importante para a predição de futuros distúrbios locomotores das vacas leiteiras e suas descendentes. Porém um SNP localizado na região intrônica do gene *IQGAP1*, envolvendo os nucleotídeos A e G, parece ser um bom marcador molecular para estas características, apresentando forte predisposição para hemorragia de sola (SWALVE et al., 2014). Este gene pode ser considerado um gene candidato, podendo ser utilizado em programas de melhoramento genético visando aprumos e redução de doenças do sistema locomotor de vacas. Por outro lado, qualquer metabólito atuante durante a resposta imune, cujo gene apresente mutações, pode interferir na suscetibilidade dos animais às doenças. Os receptores do tipo Toll (TLRs) são responsáveis pelo reconhecimento dos patógenos e estimulação da resposta imune. Foram encontrados vários SNPs em diversos genes *TLR*, alguns deles sugerem um efeito sobre doenças do trato reprodutivo como metrite, endometrite clínica e endometrite citológica (PINEDO et al., 2013), mesmo tratando-se de doenças que dependem de uma série de fatores ambientais e, portanto, de difícil predisposição genética.

A paraoxonase (PON1) é uma proteína sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, possuindo atividade de hidrolase. A PON1 hidrolisa diversos compostos oxidantes em humanos, prevenindo a oxidação de lipídeos nas lipoproteínas de baixa (LDL) e alta (HDL) densidades. Em humanos, a enzima têm apresentado capacidade anti-aterogênica, impedindo o desenvolvimento de aterosclerose (AVIRAM e ROSEMBLAT, 2009). Este fato é agravado em pacientes com o sistema cardiovascular comprometido por outras doenças, como o lupus eritematoso sistêmico. Nestes pacientes a atividade da PON1 é menor, aliada a elevada titulação para anticorpos anti-Apolipoproteína A-1, molécula na qual a PON1 encontra-se associada no HDL, favorecendo casos prematuros de aterosclerose (ELSEROUGY et al., 2013). Também, os níveis elevados de PON1 estão positivamente correlacionados com a atividade pulmonar. Porém foram encontrados níveis baixos de PON1 em idosos, agravados pela exposição continuada destes aos gases tóxicos como o gás mostarda (TARAVATI et al., 2013). Nestes casos, os

baixos níveis de PON1 reduzem o efeito antioxidante desta sobre as substâncias tóxicas, favorecendo o desenvolvimento de doenças respiratórias.

Porém, a PON1 não é determinada apenas pela inflamação. Pacientes humanos, infectados por HIV e apresentando síndrome metabólica, demonstraram menor atividade da PON1 em comparação com portadores do vírus que não apresentaram esta síndrome. Aparentemente, a PON1 pode ser considerada um marcador para síndrome metabólica em portadores do vírus da AIDS. Sua atividade está relacionada com deslipidemia e status imunológico dos pacientes (BOB IN-DUBIGEON et al., 2013). Os produtos da peroxidação lipídica podem inibir a diferenciação dos osteoblastos por alterarem a sua constituição, diminuindo a mineralização óssea, o que pode causar osteoporose em humanos. As moléculas antioxidantes, como a PON1, podem prevenir os efeitos do estresse oxidativo sobre a formação óssea. Foram encontrados valores de PON1 menores em mulheres com osteoporose comparadas com pacientes sem a doença. Além disto, também foi encontrado um efeito do genótipo sobre esta doença, onde o PON1 55LL (leucina) e o PON1 192RR (arginina) apresentam maiores atividades da enzima e menores chance de apresentarem a doença do que os genótipos PON1 55MM (metionina) e o PON1 192QQ (glutamina) (TOPTAS et al., 2013). Todavia, em ruminantes a atividade sérica de PON1 também apresentou relação com algumas doenças, como metrite, laminita (BIONAZ et al., 2013) e fígado gordo (FARID et al., 2013), embora não haja evidências de polimorfismos genéticos envolvendo o gene da PON1 nestas avaliações.

São descritos alguns polimorfismos localizados na região do promotor do gene da PON1, os quais apresentam importantes efeitos sobre a concentração plasmática e a atividade da enzima. Mesmo não alterando a sequência de aminoácidos que compõem a proteína, eles podem interferir na ligação de alguns fatores de transcrição ao DNA, reduzindo a formação de mRNA e a tradução da proteína. O polimorfismo PON1-108C>T foi relatado em diversos estudos, demonstrando uma maior frequência do alelo T em pessoas com doença de Alzheimer em relação a pessoas saudáveis (BEDNARSKA-MAKARUK et al., 2013). Uma menor atividade da PON1 também foi atribuída a esta mutação, a qual foi correlacionada com maiores chances de ocorrência de aterosclerose em humanos, porém, neste caso, o alelo C demonstrou efeitos maléficos à saúde frente ao alelo T (LEVIEV et al., 2000).

Porém, mesmo comprovados os efeitos da PON1 em diversas doenças dos humanos, pouco se sabe a respeito de sua importância clínica em bovinos, principalmente em relação à importância das mutações genéticas sobre sua atividade, já que apesar deste gene já ter sido sequenciado suas mutações ainda não foram caracterizadas em bovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar polimorfismos na região promotora do gene da PON1 em vacas da raça Holandês.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Descrever a atividade sérica da PON1 no periparto de vacas leiteiras.
- 2) Avaliar os efeitos dos polimorfismos no promotor do gene da PON1 sobre a atividade sérica da proteína no periparto de vacas leiteiras.

3 ARTIGO

Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras

Irá ser submetido à revista The Veterinary Journal

Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras

Pedro Augusto Silva Silveira, Elizabeth Schwegler, Paula Montagner, Ana Rita Tavares Krause, Jéssica Halfen, Tiago Garlet, Diego Andres Velasco Acosta, Carlos Castilho Barros, Marcio Nunes Corrêa, Augusto Schneider

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil – pedrosilveira@hotmail.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a ocorrência de polimorfismos na região promotora do gene da PON1, bem como avaliar a sua relação com a atividade sérica desta proteína no periparto de vacas leiteiras da raça Holandês. Foram utilizadas 28 vacas da raça Holandês, das quais coletou-se sangue para análise da atividade sérica da paraoxonase (PON1). Estas avaliações foram feitas nos dias -21, -7, 0, 3, 6, 9, e 23 (dia 0 = dia do parto). Foi realizada a extração de DNA dos leucócitos circulantes e a partir daí foi feito o PCR dessas amostras, visando a amplificação de um fragmento de DNA contendo 828 pb no promotor da PON1. Após a eletroforese em gel de agarose, as amostras foram purificadas e sequenciadas para identificação dos polimorfismos. Foram encontrados seis SNPs no promotor do gene da PON1, localizados nas posições -22, -105, -221, -392, -611 e -676. Destes, os SNPs -105, -221 e -611 foram correlacionados com a atividade sérica da PON1 no período avaliado ($p<0,05$), sendo que os genótipos PON1-105(AA), PON1-221(AA) e PON1-611(CC) apresentaram os maiores níveis de PON1 ($p<0,05$). Além disto, os SNPs -105 e -221 apresentaram diferenças nos níveis de PON1 já durante o pré-parto ($p<0,05$). Em conclusão, foram identificados 6 SNPs na região do promotor do gene da PON1, dos quais três estão associados com a atividade da enzima.

Palavras-chave: DNA. Fatores de Transcrição. Enzima. SNP.

Introdução

O gene da paraoxonase (PON1) está presente no cromossomo quatro dos bovinos e apresenta aproximadamente 33.000 pares de base. Em humanos diversos polimorfismos encontrados neste gene provaram interferir diretamente na expressão e atividade 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 modificarem a atividade da PON1 na circulação estão associadas com uma série de doenças circulatórias em humanos (MACKNEES et al., 2001). Por outro lado, vários estudos citam alguns polimorfismos na região reguladora do gene da PON1, os quais interferem na atividade enzimática sem alterarem a estrutura básica da proteína. Brophy et al. (2001) encontrou uma mutação na região -108 com um efeito significativo sobre a atividade sérica da PON1. Neste mesmo estudo, outro polimorfismo na região -162 mostrou um efeito menor sobre a atividade da proteína. Apesar destas evidências significativas dos efeitos de polimorfismos no gene da PON1 em humanos sobre sua atividade sérica e incidência de doenças, pouco se sabe a respeito da interferência do genótipo sobre a atividade da PON1 em ruminantes.

A 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, o que a torna capaz de sinalizar processos patológicos precoces e doenças subclínicas. Também a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais da PON1. Atualmente, alguns estudos sugerem o papel importante atribuído a esta enzima na suscetibilidade a várias doenças e a deficiências imunológicas quando os seus níveis apresentam-se muito baixos (PEZZULO et al., 2012).

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 e ampliar estes conhecimentos em bovinos. Estudos de nosso grupo avaliando o comportamento de determinadas proteínas de fase aguda (PFA) no periparto de vacas leiteiras sobre a ocorrência de infecções uterinas indicam uma redução mais drástica nos níveis de PON1 pré-parto nas vacas que apresentaram casos de infecções uterinas no pós-parto recente (SCHNEIDER et al., 2013). Outro estudo de nosso grupo encontrou uma menor

porcentagem de células polimorfonucleadas no útero de vacas que ovularam mais precocemente no período pós-parto, com uma tendência de menores níveis de haptoglobina e maior atividade da PON1 no periparto (KRAUSE et al,2014). Estes dados sugerem a importância das PFAs na detecção de processos inflamatórios no período periparto recente.

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, causam debilidade no sistema imune e favorecem a ocorrência de diversas doenças (CHAMBERLIN et al., 2013). Neste momento, a identificação precoce dos animais doentes 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 indicar precocemente 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.

Baseado nestas evidências, o objetivo deste estudo foi caracterizar a ocorrência de polimorfismos na região promotora do gene da PON1, bem como avaliar a sua relação com a atividade sérica desta proteína no periparto de vacas leiteiras da raça Holandês.

Materiais e Métodos

Animais e coletas

Foram utilizadas 28 vacas da raça holandês, criadas em um sistema semi-extensivo no município de Rio Grande, sul do Brasil. O ECC médio das vacas no período foi de $2,6 \pm 0,3$ (escala de 1 a 5). A produção média de leite dos animais nas primeiras 4 semanas de lactação foi de $18,6 \pm 1,8$ kg. Foram excluídos os animais que apresentaram qualquer sinal clínico de doenças no início do experimento e durante o período de coletas. As vacas eram inspecionadas diariamente durante as duas ordenhas diárias quanto à presença de sinais clínicos compatíveis com alguma doença. Também era realizado teste diagnóstico para mastite clínica em todas as ordenhas. Os animais eram submetidos à palpação retal semanalmente durante o experimento. 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. Os dias de coleta -23, -7 e 0 foram agrupados, compondo a média da atividade da PON 1 pré-parto. Já os dias de coleta 3, 6, 9 e 23 foram distribuídos na média de atividade da enzima pós-parto. Também foi feita uma média geral utilizando todas as coletas realizadas.

Atividade sérica da paraoxonase 1

A determinação da atividade sérica da paraoxonase foi feita utilizando um tampão 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), adicionando-se a ele 4mM de fenilacetato para preparo da solução de trabalho. As amostras foram diluídas na proporção de 1:3 no tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 μ l da amostra diluída e 500 μ l da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. Para cálculo do valor da amostra foi medida a diferença de absorbância no tempo de 60s e 0s, multiplicando-se este valor pelo fator de correção 115 e pelo fator de diluição 3. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL (BROWNE et al., 2007).

PCR e sequenciamento de DNA

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: 5'-GCACTTCCTACCCTGCTTG-3', visando obter um fragmento com 828 pb (NCBI AC_000161.1), que incluía 80 pb do exon e 748 pb correspondentes a região 3' não traduzida e promotor. Os iniciadores para a PCR foram construídos no programa Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Para a reação de PCR se utilizou as temperaturas de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 57°C e 1min a 72°C, e por fim 10 min a 72°C. Foi realizado uma eletroforese com gel de agarose a 1,5%, do qual foi recortada a banda de DNA na posição equivalente aos 828 pb. Esta alíquota de gel foi purificada 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 (Helixxa, São Paulo, Brasil). As sequências foram alinhadas no programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e os SNPs foram

identificados manualmente. Através do site Gene Promoter Miner (gpminer.mbc.nctu.edu.tw), foi realizada uma avaliação *in silico* para a identificação dos prováveis fatores de transcrição presentes na região do promotor avaliada.

Análise estatística

A análise estatística foi feita através do modelo GLM (SAS 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), utilizando os MIXED MODELS para análise de variância a fim de comparar as médias de atividade da PON1 entre os genótipos. Além disto, foram realizados testes para verificar o efeito linear ou quadrático da presença de 0, 1 ou 2 alelos. Foi considerada como diferença estatística valores de $p<0,05$.

Resultados

SNPs e atividade sérica da PON1

Foram encontrados seis SNPs no promotor do gene da PON1, localizados nas posições -22, -105, -221, -392, -611 e -676, considerando-se como 1 o primeiro nucleotídeo do éxon 1 do gene. A atividade enzimática da PON1 foi avaliada entre os diferentes genótipos encontrados para cada SNP. Os dados dos genótipos observados, sua frequência e atividade média de PON1 estão sumarizados na Tabela 1. Observou-se um efeito significativo dos SNPs -105, -221 e 611 sobre a média geral da PON1 ($p<0,05$). Ainda, os SNPs -105 e -221 foram associados ($p<0,05$) com a média de atividade da enzima no pré-parto e o SNP -105 também apresentou diferença entre os seus genótipos para a média da PON1 no pós-parto ($p<0,05$). Além disto, os SNPs -221 ($p=0,10$) e -611 ($p=0,07$) apresentaram uma tendência em relação as médias de atividade enzimática pós-parto. O genótipo PON1-105(AA) apresentou valores médios de PON1 superiores ao genótipo heterozigoto, PON1-105(AG), em todos os períodos avaliados ($p<0,05$), o que pode ser observado ao longo de todo período periparto apesar de não haver interação entre o genótipo e o dia pós-parto (Figura 1A). O genótipo PON1-221(AA), também esteve correlacionado com maiores níveis de PON1 no pré-parto e na média geral, em comparação com o PON1-221(AG). Este genótipo também apresentou médias de atividade da PON1 superiores ao PON1-221(GG) durante o pré-parto e em todo o período avaliado (Figura 1B; $p<0,05$). Já a média geral de PON1 para o PON1-611(CC) foi maior do que para o PON1-611(CT) ($p<0,05$), sendo esta diferença mantida ao longo de todo o período periparto (Figura 1C; $p<0,05$). Houve uma tendência de maior atividade de PON1 pós-parto para o genótipo PON1-611(CC) (p

= 0,07). Além disto, apenas para o SNP -221 foi encontrado um efeito linear em relação às médias geral ($p = 0,03$) e pré-parto (0,03) para a presença de nenhum, um ou dois alelos A. Porém não foi encontrado nenhum efeito quadrático para nenhum dos polimorfismos avaliados.

Fatores de Transcrição

Na análise dos fatores de transcrição que se ligam na região onde os polimorfismo foram identificados foi encontrado pelo menos 1 fator de transcrição que se liga em cada uma destas regiões (Tabela 2). Os *fatores hepatocyte nuclear factor 3* (HNF3), *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP) e *lymphoid enhancer-binding factor-1* (LEF1), foram identificados como ligantes das regiões -105, -221 e -611, respectivamente, que foram as regiões com um efeito positivo sobre a atividade da PON1 sérica.

Discussão

No presente estudo, pela primeira vez estão sendo relatados 6 polimorfismos na região promotora do gene da PON1 nas posições -22, -105, -221, -392, -611 e -676. É possível observar que nem todos os SNPs encontrados apresentaram os três genótipos possíveis. Este tipo de distribuição genética também foi encontrado em outros estudos, avaliando diferentes genes (LI et al., 2003). Porém, é possível que em populações maiores do que a deste estudo estes genótipos recessivos apareçam, devido a sua baixa porcentagem de distribuição. A maior parte do que se sabe até hoje sobre o comportamento genético da PON1 foi desvendado através de estudos em humanos. Nesta espécie, o gene da enzima esta localizado no cromossomo 7, juntamente com os genes da PON2 e PON3 (LI et al., 2003), enquanto que nos bovinos está localizado no cromossomo 4. Para o gene da PON1, duas mutações na região codificadora vêm sendo amplamente descritas. A primeira no códon 192, que leva a substituição de uma glutamina por uma arginina, e outra no códon 55, ocasionando a substituição de uma leucina por uma metionina (LI et al., 2003). Já em relação às mutações na região do promotor do gene PON1 em humanos, foram encontrados pelo menos cinco polimorfismos bem definidos, sendo eles: [C(-107/-108)T, G(-126)C, G(-162)A, G(-832)A e G(-909)C] (ADKINS et al., 1993; HUMBERT et al., 1993), sendo que as mutações C(-107/-108)T e G(-909)C foram positivamente associadas com a atividade sérica da enzima (MACKNESS et al., 2013). Em nosso estudo dos 6 polimorfismos identificados na região promotora,

3 foram significativamente associados com a atividade sérica da enzima, sendo eles nas posições -105, -221 e -611. Além disto, o presente trabalho foi desenvolvido em animais sadios, que mesmo assim apresentaram-se diferentes quanto a atividade da PON1. Nossos resultados são similares aos relatados em humanos anteriormente e indicam que estes novos SNPs podem ser usados como preditores do nível de atividade sérica da enzima em bovinos. Apesar da relação do polimorfismo C(-107/-108)T com a atividade sérica da enzima, a relação deste polimorfismo com a incidência de doenças cardíacas ainda é controversa (GRUBISA et al., 2013; MACKNESS et al., 2013). Estes dados sugerem que novos estudos podem elucidar melhor o papel dos polimorfismos na região promotora do gene da PON1 sobre a saúde dos bovinos, onde os animais com genótipo favorável à atividade enzimática podem ser mais resistentes às doenças, levando a investigação destes polimorfismos como marcadores moleculares para estas características.

No nosso estudo foram observados níveis menores de PON1 entre os animais com os genótipos PON1-105(AG), PON1-221(GG) e PON1-611(CT). A PON1, uma PFA negativa, reduz os seus níveis circulantes após danos teciduais e quebra de lipopolissacarídeos de membrana (LPS). Vacas com baixos níveis de PON1 no periparto apresentaram maior ocorrência de metrite e laminita enquanto que vacas com maiores níveis de PON1 nesta fase reduziram os riscos de apresentarem quadros graves de inflamação nos primeiros 30 dias em lactação (BIONAZ et al., 2007). Neste mesmo trabalho, os animais doentes já apresentavam níveis reduzidos de PON1 desde o pré-parto, o que sugere que, mais do que um marcador metabólico precoce, a menor atividade desta enzima pode contribuir no desencadeamento de distúrbios patológicos. Avaliações feitas no periparto de vacas leiteiras demonstram que os animais que apresentaram maior ocorrência de infecções uterinas no pós-parto recente possuíam uma redução mais drástica nos níveis de PON1 desde o pré-parto (SCHNEIDER et al., 2013). Além disto, outro estudo de nosso grupo encontrou uma menor porcentagem de células polimorfonucleadas no útero de vacas que ovularam mais precocemente no período pós-parto, fato que foi associado a uma tendência de menores níveis de PON1 no periparto destes animais (KRAUSE et al., 2014).

A PON1 caracteriza-se por ser uma enzima multifuncional, com propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, aterogênicas e antidiabéticas. Ela possui diversas atividades enzimáticas como lactonase, arilesterase e fosfotriesterase, estando

associada com a HDL na circulação. Esta associação não só otimiza a atividade catalítica da enzima, mas também favorece a sua estabilidade e atua como proteção contra sua inativação. Porém, a composição molecular pode estar alterada durante a evolução de diversas doenças, o que pode afetar a proteção que esta lipoproteína presta a PON1. Moléculas de fosfolipídeos oxidadas podem conjugar-se com a HDL, o que reduz a atividade da PON1 sérica (KAR et al., 2013). Isto pode inibir a ação da PON1 durante os processos inflamatórios e oxidativos, potencializados em indivíduos com níveis baixos da enzima, o que é mais provável entre os indivíduos portadores dos polimorfismos PON1-105(AG), PON1-221(GG) e PON1-611(CT) no nosso estudo. Portanto, mais estudos associando à presença destes polimorfismos a ocorrência de doenças no periparto são necessários para validar estas mutações como ferramentas de seleção para bovinos leiteiros.

O processo inflamatório, iniciado através de uma agressão tecidual localizada, pode evoluir até uma resposta sistêmica mediada por citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6. A partir daí algumas proteínas de fase aguda (PFA) irão apresentar atividade aumentada enquanto outras terão sua síntese e atuação reduzidas. Devido a estes eventos ocorrerem antes mesmo da resposta específica ao agente causador ou ao inicio dos sinais clínicos, as PFAs, incluindo a PON1, são consideradas marcadores metabólicos, auxiliando na detecção antecipada de processos patológicos e doenças subclínicas, de difícil diagnóstico. 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., 2001). Porém, a regulação da expressão do gene PON1 é dependente de alguns fatores ambientais, onde apenas o código genético não é capaz de determinar a atividade da proteína. Por outro lado, indivíduos genotipicamente ineficientes em expressar a PON1, como podemos inferir para os genótipos PON1-105(AG), PON1-221(GG) e PON1-611(CT), não conseguirão elevar seus níveis de proteína até valores considerados ótimos em situações de desafio metabólico/inflamatório. Esta informação pode auxiliar na seleção de animais imunologicamente mais eficientes e com menores chances de desenvolverem doenças no periparto.

Através da análise *in silico* foram identificados os prováveis fatores de transcrição que se ligam nos locais dos SNPs identificados na região promotora do

gene da PON1. Os fatores HNF3, C/EBP e LEF1, foram identificados como ligantes nas regiões -105, -221 e -611, respectivamente, que foram as regiões significativamente associadas com o nível de atividade da enzima PON1 sérica neste estudo. O HNF3, que foi associado ao polimorfismo na região -105, é um dos mais abundantes fatores de transcrição hepáticos (LAI & DARNELL, 1991), sendo também encontrado na região do promotor da albumina (HERBST et al., 1991), que segundo outros estudos correlaciona bem com o nível de atividade da PON1 em situação de inflamação (BIONAZ et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2013; KRAUSE et al., 2014). Já o fator C/EBP, que foi ligado a região -221, é outro importante e abundante fator de transcrição hepático (WEDEL & ZIEGLER-HEITBROCK, 1995). O C/EBP responde ao estímulo das interleucinas e é um importante mediador da resposta de fase aguda, estando presente na região promotora de vários genes, incluindo albumina, haptoglobina, proteína C-reativa, entre outros (WEDEL & ZIEGLER-HEITBROCK, 1995). Isto é bastante interessante, pois deste ponto de vista é possível que a menor atividade da PON1 no soro de vacas com SNP na região -221 pode estar associada a um menor estímulo das interleucinas sobre a expressão do gene da PON1 e, portanto merece estudos mais detalhados a este respeito. Por fim, o fator LEF1, relacionado ao polimorfismo na posição -611, já teve sua presença demonstrada no tecido hepático anteriormente (HUANG et al., 2012), sendo que está relacionado ao controle da expressão de imunoglobulinas, metaloproteinases e interleucinas (SCHMITT-GRAEFF et al., 2005) e portanto também relacionada a resposta imune e inflamatória. Desta maneira fica claro que além dos SNPs encontrados se relacionarem com a atividade sérica da PON1, e, portanto, possivelmente, estarem relacionados ao nível de transcrição do gene, estes foram ligados a fatores de transcrição presentes no tecido hepático, que além de responderem a citocinas inflamatórias, tem relação com a expressão de proteínas comumente observadas na resposta de fase aguda.

Conclusão

Foram identificados seis novos SNPs na região do promotor do gene da PON1 em vacas leiteiras da raça holandês, sendo que os polimorfismos nas posições -105, -221 e -611 estão associados com a atividade da enzima no sangue. Para estes polimorfismos, respectivamente, os genótipos PON1-105(AA), PON1-221(AA) e PON1-611(CC) apresentaram os maiores níveis de PON1 durante o período avaliado. Isto sugere que indivíduos com esta caracterização genética

podem vir a ser selecionados com o intuito de aumentar a atividade da PON1 no periparto de vacas leiteiras. Porém, são necessários novos estudos avaliando a relação destes polimorfismos encontrados aqui com a incidência de doenças em bovinos.

Referências

- ADKINS, S.; GAN, K. N.; MODY M.; DU, B. N. L. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/ arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. **Am J Hum Genet**, v. 53, p. 598-608, 1993.
- 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**, v. 90, p. 1740–1750, 2007.
- BROPHY, V. H.; JAMPSA, R. L.; CLENDENNING, J. B.; MCKINSTRY, L. A.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **Am. J. Hum. Genet**, v. 68, p. 1428–1436, 2001.
- BROWNE, R. W., KOURY, S. T., MARION, S., WILDING, G., MUTI, P., TREVISAN, M. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 310 –317, 2007.
- 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**, v. 96, n. 11, p. 7001-7013, 2013.
- GRUBIŠA, I. OTAŠEVIĆ, P.; ĐIMKOVIĆ, N.; NEDELJKOVIĆ, I.; TOLJIĆ, B.; VUČINIĆ, N. Genetic polymorphisms of paraoxonase 1 and susceptibility to

atherogenesis. **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo**, v. 141, n. 9-10, p. 629-633, 2013.

HERBST, R. S.; NIELSCH, U.; SLADEK, F.; LAI, E.; BABISS, L. E.; DARNELL, J. E. JR. Differential regulation of hepatocyte-enriched transcription factors explains changes in albumin and transthyretin gene expression among hepatoma cells. **New Biol.** Mar, v. 3, n. 3, p. 289-96, 1991.

HUANG, F. I.; CHEN, Y. L.; CHANG, C. N.; YUAN, R. H.; JENG, Y. M. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. **Carcinogenesis**, Jun, v. 33, n.6, p. 1142-1148, 2012.

HUMBERT, R.; ADLER, D. A.; DISTECHE, C. M.; OMIECINSKI, C. J.; FURLONG, C. E. The molecular basis of the human serum paraoxonase polymorphisms. **Nat Genet**, v. 3, n. 1, p. 73-6, 1993.

KAR, S.; PATEL, M. A.; TRIPATHY, R. K.; BAJAJ, P.; SUVARNAKAR, U. V.; PANDE, A. H. Oxidized phospholipid content destabilizes the structure of reconstituted high density lipoprotein particles and changes their function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 9, p. 1200-1210, 2012.

KRAUSE, A. R. T.; PFEIFER, L. F M.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M. M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M. E.; XAVIER, E. G; BRAUNER, C. C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F. A. B.; MARTINS, C. F.; CORRÊA, 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**, 2014.

LAI, E.; DARNELL, J. E. Transcriptional control in hepatocytes: a window in development. **Trends Biochem Sci.** v. 16, p. 427-430, 1991.

LEVIEV, I.; RIGHETTI, A.; JAMES, R. W. Paraoxonase promoter polymorphism T (-107) C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. **J Mol Med.** v. 79, p. 457–463, 2001.

LI, H. L.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **J. Mol. Med.**, v. 81, n. 12, p.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.**, v. 21, p. 1451–1457, 2001.

MACKNESS, B.; TURKIE, W.; MACKNESS, M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease. **Archives of medical science: AMS**, v. 9, n. 1, p. 8-13, 2013.

PEZZULO, A. A.; HORNICK, E. E.; RECTOR, M. V.; ESTIN, M.; REISETTER, A. C.; TAFT, P. J.; BUTCHER, S. C.; CARTER, A. B.; MANAK, J. R.; STOLTZ, D. A.; ZABNER, J. Expression of Human Paraoxonase 1 Decreases Superoxide Levels and Alters Bacterial Colonization in the Gut of *Drosophila melanogaster*. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43777, 2012.

WEDEL, A.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. The C/EBP family of transcription factors. **Immunobiology**. Jul, v. 193, n. 2-4, p. 171-85, 1995.

SCHMITT-GRAEFF, A.; ERTEL-T-HEITZMANN, V.; ALLGAIER, H. P.; OLSCHEWSKI, N. M.; NITSCHKE, R.; HAXELMANS, S.; KOELBLE, K.; BEHRENS,

J.; BLUM, H. E. Coordinated expression of cyclin D1 and LEF-1/TCF transcription factor is restricted to a subset of hepatocellular carcinoma. **Liver International**, v. 25, p. 839–847, 2005.

SCHNEIDER, A.; CORRÉA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, p. 269-291, 2013.

Tabela 1. Efeito de polimorfismos encontrados na região do promotor do gene da PON1 sobre a atividade sérica de PON1 (U/mL) no período periparto de acordo com os genótipos identificados.

		Genótipos		p	Efeito Linear	Fatores de transcrição ¹
	CC	CG	AA			
<i>PON1</i> -22	85,7% (24/28)	14,3% (4/28)				NF1
Geral	91,6 ($\pm 4,0$)	79,6 ($\pm 9,6$)		0,2814		
Pré-parto	81,9 ($\pm 4,7$)	69,2 ($\pm 11,3$)		0,3064		
Pós-parto	98,1 ($\pm 5,8$)	85,1 ($\pm 13,5$)		0,3856		
<i>PON1</i> -105	82,1% (5/28)	17,9% (23/28)				HNF3
Geral	94,9 ^a ($\pm 3,5$)	67,2 ^b ($\pm 7,3$)		0,0025		
Pré-parto	84,7 ^a ($\pm 4,4$)	59,6 ^b ($\pm 9,3$)		0,0222		
Pós-parto	101,6 ^a ($\pm 5,4$)	72,9 ^b ($\pm 11,1$)		0,0291		
<i>PON1</i> -221	71,4% (20/28)	25% (7/28)	AA	3,6% (1/28)		C/EBP
Geral	96,0 ^a ($\pm 3,9$)	77,8 ^b ($\pm 6,4$)	AG	55,0 ^c ($\pm 16,9$)	0,0132	
Pré-parto	85,4 ^a ($\pm 4,8$)	71,5 ^b ($\pm 7,9$)	GG	37,0 ^c ($\pm 20,8$)	0,0491	
Pós-parto	103,4 ($\pm 6,0$)	81,1 ($\pm 9,6$)	AC	68,5 ($\pm 25,4$)	0,0994	
<i>PON1</i> -392	25% (7/28)	39,3% (11/28)	AA	35,7% (10/28)		ELF1
Geral	84,6 ($\pm 7,5$)	90,4 ($\pm 6,0$)	AC	93,1 ($\pm 6,6$)	0,6964	
Pré-parto	75,9 ($\pm 8,3$)	79,6 ($\pm 22,0$)	CC	81,1 ($\pm 7,2$)	0,6201	
Pós-parto	91,2 ($\pm 10,5$)	100,0 ($\pm 8,8$)	CT	95,5 ($\pm 9,3$)	0,8106	
<i>PON1</i> -611	92,6% (25/27)	7,4% (2/27)	AA			PU1
Geral	92,0 ^a ($\pm 3,6$)	61,8 ^b ($\pm 12,7$)	AT			
Pré-parto	81,6 ($\pm 4,5$)	60,7 ($\pm 15,8$)	CC			
Pós-parto	98,9 ($\pm 5,2$)	62,5 ($\pm 18,1$)	CT			
<i>PON1</i> -676	85,2% (23/27)	14,8% (4/27)	AA			TATA
Geral	89,3 ($\pm 3,9$)	88,5 ($\pm 9,6$)	AT			
Pré-parto	81,9 ($\pm 4,7$)	69,2 ($\pm 11,3$)	CC			
Pós-parto	98,1 ($\pm 5,8$)	85,1 ($\pm 13,5$)	CT			

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

¹ Fatores de transcrição que se ligam no local de cada SNP encontrado.

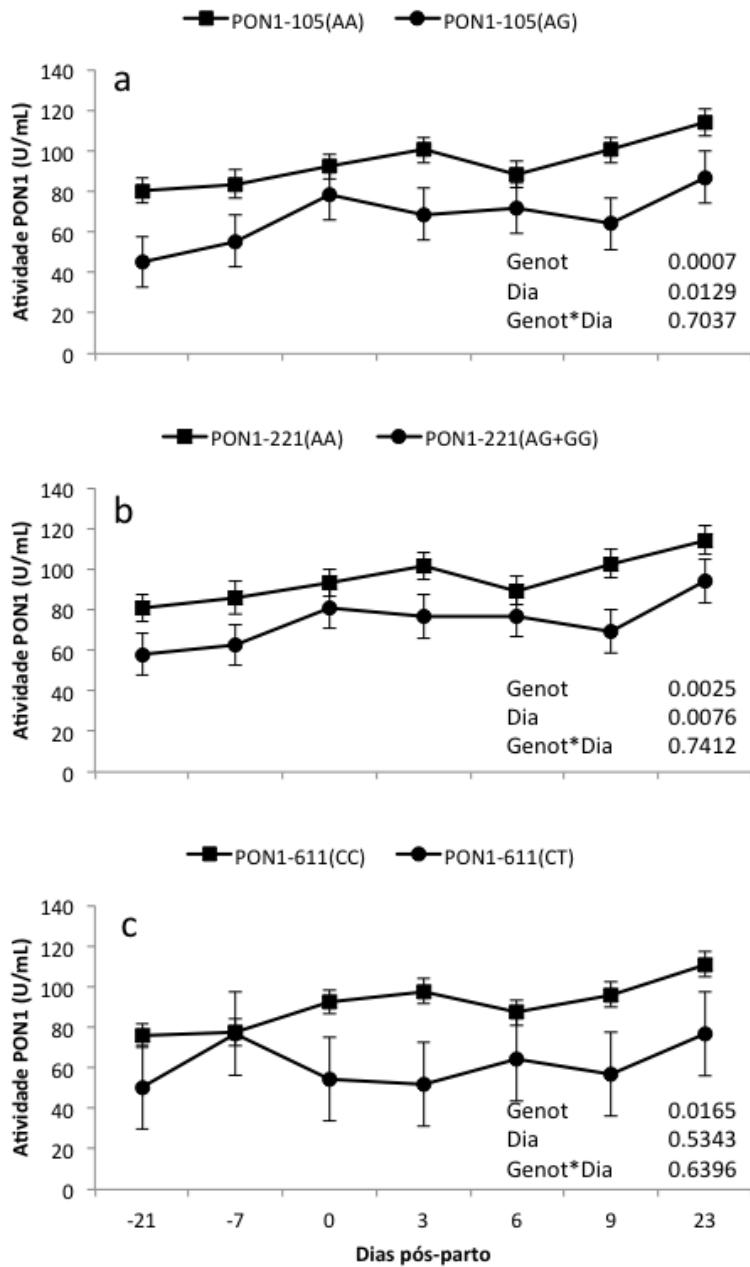


Figura 1. Atividade sérica da PON1 (U/ml) (médias \pm EP) no periparto de vacas leiteiras, entre os dias -21 pré-parto e 23 pós-parto para os genótipos encontrados nos SNPs -105 (a), -221 (b) e -611 (a).

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos presentes no local de ligação dos fatores de transcrição, distribuídos entre os SNPs encontrados em vacas leiteiras.

SNP	Fatores de transcrição	Sequência de nucleotídeos para ligação do fator de transcrição
<i>PON1</i> -22(C/G)	NF1	TCTT ¹ GGCTGACATTGAG
<i>PON1</i> -105(A/G)	HNF3	ATCCGTGTTAC G TTATG
<i>PON1</i> -221(A/G)	C/EBP	TGATAAGGCAAC
<i>PON1</i> -392 (A/C)	ELF1	TCTTCCT CT TCT
	PU1	CT TCCTCT
<i>PON1</i> -611(C/T)	LEF1+W46	CT TTGA
<i>PON1</i> -676(A/T)	TATA	TGC CT TAATTATAG
	Repetição	GCATACTGA
		GCATA CT GA

¹ Os nucleotídeos em negrito indicam o local de ocorrência do SNP.

4 CONCLUSÃO GERAL

Foram identificados seis novos SNPs na região do promotor do gene da PON1 em vacas leiteiras da raça holandês, sendo que os polimorfismos nas posições -105, -221 e -611 estão associados com a atividade da enzima no sangue. Para estes polimorfismos, respectivamente, os genótipos PON1-105(AA), PON1-221(AA) e PON1-611(CC) apresentaram os maiores níveis de PON1 durante o período avaliado. Isto sugere que indivíduos com esta caracterização genética podem vir a ser selecionados com o intuito de aumentar a atividade da PON1 no periparto de vacas leiteiras. Porém, são necessários novos estudos avaliando a relação destes polimorfismos encontrados aqui com a incidência de doenças em bovinos.

5 REFERÊNCIAS

- BEDNARSKA-MAKARUK, M. E.; KRZYWKOWSKI, T.; GRABAN, A.; LIPCYŃSKA-ŁOJKOWSKA, W.; BOCHYŃSKA, A.; RODO, M.; WEHR, H.; RYGLEWICZ, D. K. Paraoxonase 1 (PON1) gene -108C>T and p.Q192R polymorphisms and arylesterase activity of the enzyme in patients with dementia. **Folia Neuropathol**, v. 51, n. 2, p. 111-119, 2013.
- 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**, v. 90, p. 1740–1750, 2007.
- BOBIN-DUBIGEON, C.; BIRON, C.; VOLTEAU, C.; PIROTH, L.; BIRON, A.; PERRÉ, P.; BARD, J. M. Short Communication: Paraoxonase 1 (PON1) in French HIV-Infected Patients Under Antiretroviral Therapy: Relationship with the Metabolic Syndrome and Inflammation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 12, p. 1571-1574, 2013.
- ELSEROUGY, E. M.; EL-GAZZAR, I. I.; AHMED, M. M.; HABIB, D. F.; FIKRY, I. M. Study of anti-apolipoprotein A-I antibodies and paraoxonase 1 activity in systemic lupus erythematosus patients; correlation with disease activity and damage indices. **The Egyptian Rheumatologist**, v. 35, p. 207-215, 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**, v. 9, n. 1, p. 73-79, 2013.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Biología celular y molecular**. McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- LEVIEV, I.; RIGHETTI, A.; JAMES, R. W. Paraoxonase promoter polymorphism T (-107) C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. **J Mol Med**. v, 79, p. 457–463, 2001.
- LIPSHUTZ, R. J. FODOR, S. P., GINGERAS, T. R., LOCKHART, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nature genetics**, v. 21, p. 20-24, 1999.
- PINEDO, P. J.; GALVÃO, K. N.; SEABURY, C. M. Innate immune gene variation and differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows. **Theriogenology**, 2013.
- ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 98-104, 2009.
- SWALVE, H. H.; FLOREN, C.; WENSCH-DORENDORF, M.; SCHÖPKE, K.; PIJL, R.; WIMMERS, K.; BRENIG, B. A study based on records taken at time of hoof trimming reveals a strong association between the IQ motif-containing GTPase-

activating protein 1 (*IQGAP1*) gene and sole hemorrhage in Holstein cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 1, p. 507-519, 2014.

TARAVATI, A.; ARDESTANI, S. K.; ZIAEE, A. A.; GHORBANI, A.; SOROUSH, M. R.; FAGHIHZADEH, S.; KAZEMI, H.; REZAEI, A.; HOSEINI, H.; GHAZANFARI, T. Effects of paraoxonase 1 activity and gene polymorphisms on long-term pulmonary complications of sulfur mustard-exposed veterans. **International immunopharmacology**, v. 17, p. 974-979, 2013.

TOPTAS, B.; KURT, O.; AYDOGAN, H. Y.; YAYLIM, I.; ZEYBEK, U.; CAN, A.; AGACHAN, B.; UYAR, M.; OZYAVUZ, M. K.; ISBIR, T. Investigation of the common paraoxonase 1 variants with paraoxonase activity on bone fragility in Turkish patients. **Mol Biol Rep**, v. 40, p. 6519–6524, 2013.

YUAN, Z.; LI, J.; LI, J.; GAO, X.; XU, S. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 1, p. 7-12, 2013.

WATSON, James D. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5.ed Porto Alegre: Artmed, 2007.