

# **EFEITO DO POLIMORFISMO NO PROMOTOR DO GENE DA PARAOXONASE 1 (PON1) SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO, SAÚDE E PRODUÇÃO LEITEIRA DE VACAS DA RAÇA HOLANDÊS**

**PEDRO AUGUSTO SILVA SILVEIRA<sup>1</sup>; WALTER RONALD BUTLER<sup>2</sup>; CARLOS CASTILHOS BARROS<sup>3</sup>; MARCIO NUNES CORRÊA<sup>3</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – pedrosilveira3@hotmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade de Cornell – wrb2@cornell.edu*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com*

## **1. INTRODUÇÃO**

A Paraoxonase1 (PON1) é uma proteína sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, possuindo atividade de hidrolase (CERON et al., 2014). Durante processos inflamatórios que causam dano ao fígado a PON1 atua como um indicador da função hepática, auxiliando no diagnóstico precoce de diversas doenças (CERON et al., 2014). 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). Também a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais da PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). 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).

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 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). Vacas com baixos níveis de PON1 no periparto apresentaram maior ocorrência de metrite e laminite 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). A PON1 é transferida para o folículo dominante em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013) e estudos em humanos indicam que está relacionada a qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008)

Em um trabalho recente, nossa equipe encontrou sete SNPs na região do promotor do gene da PON1 em vacas leiteiras, sendo que cinco deles apresentaram correlação com a proteína na circulação (SILVEIRA et al., 2015). O SNP -221 (A/G) parece ocorrer numa região de ligação de fatores de transcrição ligados à resposta de fase aguda, sendo o alelo A associado a maiores níveis de PON1 na circulação. Porém, ainda não há relatos da interação da PON1 e de polimorfismos genéticos ligados a esta proteína com a fertilidade em vacas leiteiras. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do SNP -221 (A/G) sobre parâmetros reprodutivos, ocorrência de doenças e produção leiteira de vacas da raça holandês.

## **2. METODOLOGIA**

Foram utilizadas 85 vacas da raça holandês acompanhadas desde o parto até 210 dias em lactação (DEL). Estas vacas foram submetidas a um protocolo OvSynch-IATF quando estavam com 55 DEL, sendo repetido o protocolo nas vacas diagnosticadas como não prenhes aos 30 e 60 dias após a IA. Foram coletadas amostras de leite duas vezes por semana para determinação da ovulação. Foram avaliados os dias do parto até a primeira ovulação (DTO), o número de inseminações até a confirmação da prenhez (AI), o intervalo parto-concepção (CCI) e a produção de leite nos primeiros 60 dias.

Para identificação do SNP, o DNA foi extraído do sangue para a realização da genotipagem através de ARMS-PCR contendo quatro primers. Dois destes primers anelavam-se na parte externa do produto do PCR, formando uma banda de 700 pb, os outros dois primers internos anelavam-se formando bandas de 500 pb (alelo A) ou 200 pb (alelo G) através de anelamento específico (Figura 1). Após a eletroforese, foi possível realizar a genotipagem de alguns dos animais que foram confirmadas através de sequenciamento dos produtos.

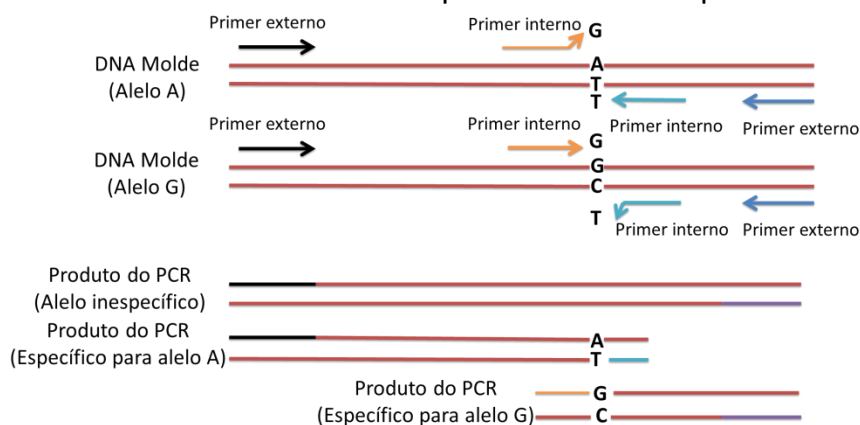


Figura 1. Ilustração de ARMS-PCR para genotipagem do SNP *PON1-221(A / G)*.

Os dados foram comparados através do procedimento GLM do SAS. Utilizou-se a análise de curva de sobrevivência para avaliar o DTO e o CCI e através do teste de Chi-Quadrado a ocorrência de doenças (retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso, cetose, distúrbios locomotores e hipocalcemia).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da genotipagem foram identificadas 57 vacas (67%) AA, 20 vacas (23,6%) AG e 8 vacas (9,4%) GG. Através da curva de sobrevivência foi possível observar que as vacas AG ovularam aproximadamente 9 dias antes em comparação com as vacas AA e GG ( $P=0,02$ ). Porém, esta antecipação na ovulação pós-parto não se refletiu em melhores taxas de prenhes ( $P>0,05$ ). Além disto, não houve diferença entre os genótipos quanto à produção de leite, assim como a ocorrência de doenças foi semelhante para os três genótipos ( $P>0,05$ ) (Tabela 1).

Silveira et al. (2015) encontraram distribuições genotípicas semelhantes para este SNP, sendo 64,3% para o genótipo AA, 30,9% para o genótipo AG e 4,8% para o genótipo GG. Neste mesmo estudo as vacas de genótipo AA apresentaram maior atividade sérica da PON1 entre os dias 21 pré-parto e 23 pós-parto. Alguns estudos anteriores (BIONAZ et al., 2007; SCHNEIDER et al.,

2013; KRAUSE et al., 2014) indicam que a menor atividade sérica da PON1 está relacionada a ocorrência de doenças pós-parto. Apesar disso, em nosso estudo não foi observada a relação dos genótipos relacionados aos menores níveis séricos de PON1 com a ocorrência de doenças.

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos avaliados para os genótipos *PON1*-221(A/G) através do procedimento GLM (SAS).

Parâmetros	Genótipos <i>PON1</i>				P	
	AA	AG	GG	Linear	AA vs AG e AG	
Vacas (%)	67 (57/85)	23,6 (20/85)	9,4 (8/85)	-	-	
Dias até a 1ª ovulação	32,3 ± 2,3	25,7 ± 3,4	33,5 ± 5,8	0,85	0,50	
Dias até a 1ª IA	69,7 ± 0,3	69,7 ± 0,4	70,3 ± 0,7	0,42	0,50	
Dias até a concepção	99,3 ± 6,3	100,8 ± 9,7	96,4 ± 16,5	0,87	0,95	
Nº de IA/concepção	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,6	0,56	0,64	
Taxa de prenhes na 1ª IA, % (n)	21 (12/57)	35 (7/20)	37,5 (3/8)	0,35	0,15	

O estresse oxidativo prejudica o crescimento oocitário e o desenvolvimento de embriões humanos (BROWNE et al., 2008). A *PON1*, ligada ao HDL e Apolipoproteína AI, desempenha um importante papel protetor sobre oócitos contra os processos oxidativos (BROWNE et al., 2008), passando da corrente sanguínea para o fluido folicular (SCHNEIDER et al., 2013). Neste sentido, vacas que ovularam até 44 dias pós-parto apresentaram uma tendência de maior atividade da *PON1* sérica (KRAUSE et al., 2014). Além disto, em um estudo recente realizado pela nossa equipe, a atividade da *PON1* aumentada *in vitro* durante a maturação oocitária melhorou o desenvolvimento embrionário durante um procedimento de fertilização *in vitro* (ALVARADO et al., 2015). Neste estudo, o genótipo *PON1*-221(AG) antecipou a ovulação pós-parto em comparação aos genótipos AA e GG. Apesar disto, não podemos atribuir este resultado aos níveis da enzima na circulação, pois neste estudo seus níveis não foram medidos. Estudos anteriores (SILVEIRA et al., 2015) indicam uma diferença em favor do genótipo AA.

#### 4. CONCLUSÕES

Desta forma, o polimorfismo na posição -221 do promotor do gene da *PON1* parece estar associado com a antecipação da ovulação pós-parto, embora o mecanismo pelo qual isto ocorra ainda necessite mais estudos.

#### 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**, v. 90, p. 1740–1750, 2007.

BOSSAERT, P., TREVISI, E., OPSOMER, G., BERTONI, G., DE VLIEGHER, S., & LEROY, J. L. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 222-225, 2012.

BROWNE, R. W., SHELLY, W. B., BLOOM, M. S., OCQUE, A. J., SANDLER, J. R., HUDDLESTON, H. G., FUJIMOTO, V. Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Hum Reprod**, v. 23, p. 1884–1894, 2008.

CERON, J. J., TECLES, F., TVARIJONAVICIUTE, A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 74-82. 2014.

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.

PEZZULO, A. A.; HORNICK, E. E.; RECTOR, M. V.; ESTIN, M.; REISSETTER, 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.

RINCÓN, J. A. A.; MADEIRA, E. M.; CAMPOS, F. T.; MION, B.; SILVA, J. F.; ABSALON-MEDINA, V. A.; BUTLER, W. R.; CORRÊA, M. N.; PEGORARO, L. M. C.; SCHNEIDER, A. Effect of Paraoxonase 1 (PON1) during oocyte maturation and subsequent development of IVP bovine embryos. Proceedings of 28th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 425, 2014.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, 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.

SCHNEIDER, A., ABSALON-MEDINA, V. A., ESPOSITO, G., CORRÊA, 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 in Domestic Animals**, 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. **The Veterinary Journal**, v. 205, p. 201-203, 2015.