



Polimorfismos na região 3'UTR do gene *SLC11A1* em rebanhos leiteiros Holandês e Girolando

[Polymorphisms within the 3'UTR region of *SLC11A1* gene in Holstein and Girolando dairy herds]

"Artigo Científico/Scientific Article"

Wellison Jarles Silva **Diniz**^{1*}, Luciana Florêncio **Vilaça**², Tatiana Ferreira **Melo**¹,
Júlio César Vieira **Oliveira**³, Sebastião Inocêncio **Guido**³, Kleber Régis **Santoro**¹

¹Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns-PE, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

³Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife-PE, Brasil.

*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: wjarles09@gmail.com

Resumo

O gene *SLC11A1* desempenha importante papel na modulação da resposta imune adaptativa e tem sido associado à resistência a doenças causadas por patógenos intracelulares. Este estudo avaliou a frequência de polimorfismos na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *SLC11A1* em rebanhos leiteiros Holandês e Girolando. Para tal, análises de polimorfismos de conformação de fita simples mediante reação em cadeia da polimerase (PCR-SSCP) foram realizadas em amostras de DNA oriundas de 161 amostras de sangue (Holandês n = 56; Girolando n=105). Três padrões de SSCP foram identificados, correspondentes aos genótipos: GT13/GT13, GT13/GT14 e GT13/GT15. O genótipo heterozigoto GT13/GT14 foi mais frequente no rebanho Girolando (47,62%), enquanto o rebanho Holandês apresentou maior frequência do genótipo homozigoto GT13/GT13 (51,79%), predito a partir da literatura como resistente a patógenos intracelulares. Foram identificadas diferenças na frequência dos polimorfismos na região 3'UTR do gene *SLC11A1*, para as quais os animais Girolando apresentaram maior variabilidade. Esses resultados contribuem para entender a diversidade genética nas raças avaliadas e no direcionamento de novos trabalhos a fim de determinar a contribuição desses polimorfismos em fenótipos complexos.

Palavras-Chave: bovinos leiteiros, *nramp1*, PCR-SSCP, polimorfismos genéticos.

Abstract

SLC11A1 gene plays an important role in the adaptative immune response modulation and has been associated with resistance to intracellular pathogens disease. This study evaluated the frequency of polymorphisms within the 3' untranslated region (3'UTR) of *SLC11A1* gene in Holstein and Girolando dairy herds. To this end, polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analyses were carried out on DNA samples from 161 blood samples (Holstein n = 56; Girolando n = 105). Three SSCP patterns were identified, corresponding to the genotypes: GT13/GT13, GT13/GT14, and GT13/GT15. GT13/GT14 heterozygous genotype was more frequent in the Girolando herd (47.62%), while the Holstein herd presented a higher frequency of the GT13/GT13 homozygous genotype (51.79%) predicted from the literature as resistant to intracellular pathogens. Differences in the frequency of polymorphisms within the 3'UTR region of *SLC11A1* gene were identified. Girolando animals presented greater variability than Holstein ones. The results contribute to understanding the genetic diversity in the evaluated breeds and provide new insights to determine the contribution of these polymorphisms in complex phenotypes.

Key-words: dairy cattle, *nramp1*, PCR-SSCP, genetic variability.

Introdução

A susceptibilidade e/ou resistência a doenças é uma característica genética complexa, influenciada e, muitas vezes, determinada pelo genoma do animal, com interações entre fatores fisiológicos e ambientais. Além disso, pela diversidade de patógenos e dos diferentes mecanismos de ação e da interação com o hospedeiro, a compreensão dos mecanismos de resistência são de difícil identificação (Adams e Templeton, 1998).

Diante desse caráter multifatorial, a identificação de animais geneticamente resistentes apresenta-se como uma importante estratégia no controle de doenças infecciosas (Baqir et al., 2016). Para tal, ferramentas de biologia molecular têm permitido identificar genes candidatos, dentre esses o *Solute Carrier Family 11 member A1 (SLC11A1)*. Componente de uma família de proteínas transmembranas, transportadoras de metais divalentes (González et al., 2006) o gene *SLC11A1* localiza-se no cromossomo dois bovino (BTA 2), codifica uma proteína integral com 12 domínios transmembrana e peso de 60 KDa, sendo expresso predominantemente em macrófagos e células retículoendoteliais (Feng et al., 1996).

Polimorfismos na região não traduzida da extremidade 3' (3'UTR - Untranslated Region) do gene *SLC11A1* têm sido associados ao fenótipo de resistência/susceptibilidade (R/S) a patógenos intracelulares em virtude da variação no número de repetições dos dinucleotídeos GT no microssatélite (GT)_n, havendo substituição do nucleotídeo T→G na posição 1782 pb (Horín et al., 1999; Gonzalez et al. 2006). Em bovinos, há relatos da atuação deste gene na R/S a *Brucella abortus* (Adams e Templeton, 1998; Paixão et al., 2006), a mastite (Joo et al., 2003; Hu et al., 2009) e a tuberculose (Baqir et al., 2016). Além disso, em virtude do seu caráter pleiotrópico, o gene *SLC11A1* tem sido associado a características de produção, tais como qualidade, composição e produção de leite. Piras et al. (2011) verificaram que polimorfismos da 3'-UTR do gene *SLC11A1* afetam a contagem de células somáticas, produção de leite, proteína e gordura em caprinos. No entanto, Zhang et al. (2009) não observaram associações significativas entre os polimorfismos detectados no gene, escores de células somáticas e produção de leite em bovinos da raça Holandesa.

O gene *SLC11A1* é candidato à resistência a doenças, apresentando também efeito sobre características produtivas e de composição do leite

(Ables et al., 2002). Além disso, sabe-se que muitos destes alelos são estáveis e generalizados na população *Bos taurus* (Coussens et al., 2004), com significativas diferenças quando comparados a *B. indicus* (Paixão et al., 2006). Embora as raças Holandesa e Girolando sejam importantes no cenário produtivo nacional, são escassas as informações referentes aos polimorfismos nesses rebanhos. Logo, a caracterização genética dos rebanhos possibilita a identificação de marcadores genéticos que podem ser utilizados em processos de seleção assistida e melhoramento genético, potencializando a identificação de animais superiores. Portanto, o estudo avaliou a frequência de polimorfismos na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *SLC11A1* em rebanhos leiteiros Holandês e Girolando.

Material e Métodos

Foram utilizados 161 animais pertencentes ao Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA, dos quais 56 eram da raça Holandesa e 105 da raça Girolando (5/8 Holandês-Gir), oriundos de rebanhos independentes em São Bento do Una e Arcoverde (agreste meridional pernambucano), respectivamente. Foram coletadas amostras de sangue (4,0 mL) através de punção da jugular externa por meio do vacutainer com anticoagulante (EDTA), onde as amostras foram acondicionadas imediatamente em recipiente contendo gelo e posteriormente armazenadas sob refrigeração a -20 °C.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE, por meio do Kit de extração AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen®), segundo as recomendações da empresa. A integridade do material extraído foi avaliado em gel de agarose a 1%, corado com SYBR GREEN® (Invitrogen®), visualizada em luz ultravioleta e fotodocumentado (Gel Logic 112®, Kodak®).

Os iniciadores específicos (primers) para a amplificação da 3'UTR do gene *SLC11A1* bovino foram baseados em Paixão et al. (2006), a saber: Forward: 5'-AAGGCAGCAAGACAGACAGG-3' e Reverse: 5'-ATGGAAGTACAGTTGGCTG-3'. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,1 unidades de taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 50 ng de DNA. Submetidos aos seguintes parâmetros de PCR: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido

de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 segundos), anelamento (58,6 °C por 40 segundos), extensão (72 °C por 30 segundos) e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A identificação dos padrões de SSCP foi realizada através do uso de alíquotas de 5 µL do produto da PCR misturadas a 5 µL de solução desnaturante (95% de formamida, 4,9% de EDTA 25 mM e 0,1% de gel loading) desnaturados a 94 °C por 5 minutos e resfriado em gelo. O DNA desnaturado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida:bisacrilamida (29:1) 8% a 100 Volts, por 1:30 horas. Para observação dos padrões de migração o gel foi imerso em uma solução corante (SYBR GREEN® [1,63X] (Invitrogen®) diluído em Tris Borato EDTA [1X]) e mantido sob ausência de luz durante 25 minutos. Para a visualização do gel foi utilizada luz ultravioleta, seguida de fotodocumentação (Gel Logic 112®, Kodak®).

A determinação alélica foi realizada mediante adoção da metodologia proposta por Paixão et al., (2006), a qual é realizada por comparação, utilizando como referência uma amostra controle de homocigotos e de tamanhos conhecidos (175 pb, 177 pb) e de heterocigotos (175 pb e 177 pb, ou 175 pb e 179 pb).

A variabilidade genética foi avaliada pela frequência genotípica, equilíbrio de Hardy-Weinberg e índice de diversidade padrão, tanto dentro como entre rebanhos. A avaliação da estrutura genética populacional entre e dentro dos rebanhos foi realizada por meio da análise molecular de variância (AMOVA), assim como foi feito o teste exato de diferenciação da amostra e de diferenciação entre todos os pares de amostras baseado na frequência genotípica (Raymond e Rousset, 1995). Todas as análises foram feitas utilizando o software Arlequin versão 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer, 2010).

Resultados e Discussão

A análise de polimorfismo de conformação de fita simples (Single Strand Conformation Polymorphism - SSCP) é um método de triagem de mutações por meio do qual é possível verificar mudanças no padrão de mobilidade eletroforética de fitas simples de ácidos nucleicos sob condições não-desnaturantes (Hirata et al., 2006) em função de inserções e deleções que promovem mudanças no tamanho dos fragmentos amplificados (Paixão et al., 2006). Mediante essa abordagem, foram identificados três padrões de SSCP. O padrão 1 consistiu de uma banda com 175 pb. Os padrões 2

e 3 consistiram de duas bandas, sendo 175/177 pb e 175/179 pb, respectivamente. De acordo com Paixão et al. (2006), estes alelos são classificados baseados no número de repetições dos dinucleotídeos GT na região 3'UTR, formando os seguintes genótipos: GT13/GT13 (175 pb), GT14/GT14 (177 pb), GT13/GT14 (175/177 pb) e GT13/GT15 (175/179 pb), sendo apenas os homocigotos (GT13/GT13) considerados resistentes a patógenos intracelulares, tais como tuberculose e brucelose.

No presente estudo foram identificados os genótipos GT13/GT13, GT13/GT14, GT13/GT15 (Figura 1). Observou-se alta frequência dos genótipos heterocigotos (64,59%, 104/161) na população total. Destaca-se a maior porcentagem dos genótipos GT13/GT14 com 41,61% (67/161) e (GT13/GT13) 35,40% (57/161).

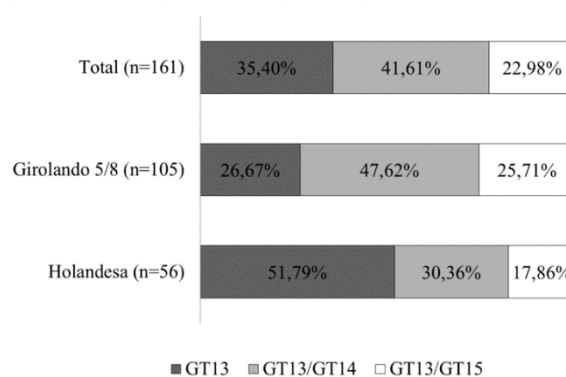


Figura 1. Frequência dos genótipos da região 3'UTR do gene *SLC11A1* em bovinos leiteiros Holandês e Girolando.

Os animais Holandeses apresentaram maior frequência (51,79%, 29/56) do genótipo predito como resistente a patógenos intracelulares (GT13/GT13), seguido do GT13/GT14 e GT13/GT15. Em relação aos animais Girolando, o genótipo heterocigoto GT13/GT14 foi mais frequente (47,62%, 50/105). Diferentemente dos resultados aqui obtidos, Zhang et al. (2009) observaram a prevalência do genótipo homocigoto GT14/GT14 em animais da raça Holandesa e a ausência do genótipo GT13/GT15. Avaliando a frequência de polimorfismos na região 3'UTR do gene *SLC11A1* em animais das raças Nelore, Guzará, Gir e Holandesa, Paixão et al. (2006) observaram que animais zebuínos apresentaram quatro genótipos e maior heterogeneidade genética quando comparados aos animais da raça Holandesa, os quais foram monomórficos (GT13/GT13).

Os resultados da estrutura populacional dos rebanhos a partir do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 1) demonstraram que o rebanho Holandês

está sob seleção. Os resultados da heterozigosidade, segundo Cruz (2008) permitem quantificar a diversidade genética e a fixação de alelos na população, além de poder estimar o grau de heterose. A partir da análise dos parâmetros de variabilidade genética para o gene *SLC11A1*, destaca-se que a heterozigosidade observada (H_o)

em ambas as raças foi superior a heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 1). Além disso, os animais Girolando apresentaram maior variabilidade que os Holandeses. Aqueles também apresentaram maior diversidade genética em relação aos animais Holandeses.

Tabela 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genótipos da região 3'UTR do gene *SLC11A1* em bovinos leiteiros Holandês e Girolando.

Grupo genético	Heterozigose		Índice de diversidade padrão
	H_o	H_e	
Girolando	0,7333**	0,5281	0,5281 ± 0,4901
Holandês	0,4821 ^{NS}	0,3965	0,3965 ± 0,4124

H_o : Heterozigosidade observada; H_e : Heterozigosidade esperada, NS: não significativo, ** Significativo a 1% ($p < 0,01$) para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A variabilidade genética observada neste estudo, assim como a relatada nos trabalhos citados pode ser resultado do processo de seleção a que estes animais estão submetidos (Paixão et al., 2006). A diversidade, ausência ou presença de um ou mais alelos e genótipos também foram relatadas por outros autores (Zhang et al., 2009; Pazzola et al., 2009; Hasenauer et al., 2013), os quais também não conseguiram identificar as causas da ausência de determinados genótipos. Entretanto, não há indícios de fixação dos alelos para nenhum dos rebanhos aqui estudados, dada a frequência em que eles foram encontrados.

Destaca-se que os animais Holandeses têm sofrido uma grande pressão de seleção para caracteres produtivos, a partir dos quais pode haver perda ou fixação de alelos (González et al., 2006). Também, nos animais Girolando, o processo de seleção ao qual têm sido submetidos poderia influenciar diretamente na maior ou menor frequência de determinados genótipos. Todavia, a maior frequência do genótipo predito na literatura como resistente não é sinônimo de que a raça Holandesa seja mais resistente que a Girolando, uma vez que não há estudos a campo sob as mesmas condições para a avaliação destes genótipos e associação com resistência a doenças (Paixão et al., 2006).

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou variação genética significativa ($p < 0,001$) entre e dentro dos rebanhos, com a maior parte dentro dos rebanhos (98,5%). Estes resultados são confirmados pelo teste exato de diferenciação entre amostras e pela diferenciação

entre todos os pares de amostras, com $p=0,00801$ e $p=0,00922$, respectivamente. A menor distância entre rebanhos pode ser causada pelo modo de uso dos animais Holandeses na formação dos animais Girolando, os quais podem compartilhar alelos em comum.

Conclusão

Foram identificadas diferenças na frequência dos polimorfismos na região 3'UTR do gene *SLC11A1* entre os rebanhos avaliados. O processo de seleção a que está submetido o rebanho Girolando pode ser um dos fatores que determina a maior variabilidade genética observada.

Embora o genótipo homozigoto (GT13/GT13) seja mais frequente no rebanho Holandês, são necessários estudos adicionais para verificar seu efeito na resistência a doenças. Os resultados obtidos contribuem para entender a diversidade genética nos rebanhos avaliados e no direcionamento de novos trabalhos a fim de determinar a contribuição desses polimorfismos em fenótipos complexos.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

Comitê de Ética

Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença nº 010/2009).

Agradecimentos

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) pela disponibilidade, acesso aos animais, coleta de amostras e dados. Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor e o financiamento do projeto (505912/2008-2).

Referências

- Ables, G.P.; Nishibori, M.; Kanemaki, M.; Watanabe, T. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. **Journal of Veterinary and Medical Science**, 64(11): 1081-83, 2002.
- Adams, L.G.; Templeton, J.W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, 17: 200-219, 1998.
- Baqir, M.; Bhushan, S.; Kumar, A.; Sonawane, A.; Singh, R.; Chauhan, A.; Yadav, R.; Prakash, O.; Renjith, R.; Baladhare, A.; Sharma, D. Association of polymorphisms in *SLC11A1* gene with bovine tuberculosis trait among Indian cattle. **Journal of Applied Animal Research**, 44(1): 380-383, 2016.
- Coussens, P.M.; Coussens, M.J.; Tooker, B.C.; Nobis, W. Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (NRAMP 1) gene and identification of a novel polymorphism. **DNA Sequence**, 15: 15-25, 2004.
- Cruz, C.D. **Programa Genes - diversidade genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.
- Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10(3): 564-567, 2010.
- Feng, J.; Li, Y.; Hashad, M.; Schurr, E.; Gros, P.; Adams, L.G.; Templeton, J.W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. **Genome Research**, 6(10): 956-964, 1996.
- González S, J.; Saldarriaga, O.A.; López-Herrera, A.; Bermúdez, N.R.; Zapata, W.; Ossa, J.E. Polymorphism in 1908STR1934 locus of the 3'UTR of the Nramp1 bovine gene in eight cattle breeds. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 19(1): 11-17, 2006.
- Hasenauer, F.C.; Caffaro, M.E.; Czibener, C.; Comerci, D.; Poli, M.A.; Rosseti, C.A. Genetic analysis of the 3' untranslated region of the bovine *SLC11A1* gene reveals novel polymorphisms. **Molecular Biology Reports**, 40(1): 545-552, 2013.
- Hirata, M.H.; Tavares, V.; Hirata, R.D.C. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Medicina**, 39(4): 522-34, 2006.
- Horín P.; Rychlík I.; Templeton, J.W.; Adams, L.G. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. **European Journal of Immunogenetics**, 26: 311-313, 1999.
- Hu, H.C.; Wang, H.M.; Li, J.B.; Wang, C.F.; Lai, S.J.; Li, Q.L.; Zhong, J.F. Genetic polymorphism of Nramp1 gene and correlation with mastitis in Holstein cattle. **Yi Chuan**, 31(1): 57-62, 2009.
- Joo, Y.S.; Moon, J.S.; Fox, L.K.; Suh, G.H.; Kwon, N.H.; Kim, S.H.; Park, Y.H. Comparison of natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) 1 expression between cows with high and low milk somatic cells counts. **Asian-Australian Journal Animal Science**, 16(12): 1830-1836, 2003.
- Paixão, T.A.; Ferreira, C.; Borges, A.M.; Oliveira, D.A.A.; Lage, A.P.; Santos, R.L. Frequency of bovine Nramp1 (*SLC11A1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 109: 37-42, 2006.
- Pazzola, M.; Dettori, M.L.; Atzeni, M.; Balia, F.; Vacca, G.M. Genetic diversity of NRAMP1 3'-UTR microsatellite in cattle breeds reared in Sardinia. **Italian Journal of Animal Science**, 8(2): 126-128, 2009.
- Piras, G. Pazzola, M.; Balia, F.; Pira, E.; Dettori, M.L.; Carcangiu, V.; Vacca, G.M. Polymorphism of caprine *SLC11A1* gene and relationships with hygienic characteristics of milk. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 76(3): 175-178, 2011.
- Raymond, M.; Rousset, F. Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, 86: 248-249, 1995.
- Zhang, C.; Wang, Y.; Chen, H.; Gu, C.W.; Fang, X.T. *SLC11A1* gene polymorphisms are not associated to somatic cell score and milk yield in Chinese Holstein. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 127(3-4): 389-392, 2009.