

Análises *in silico* revelam deleção na região promotora do gene *PRLR* em população da raça Gir: um possível papel na tolerância ao estresse térmico

Julianna Marie Torres^{1*}, Pablo Henrique Ferreira¹, Emily Alves Rodrigues Almeida¹, Josimara Rocha Pereira¹, Marta Fonseca Martins², João Claudio Panetto², Marco Antonio Machado², Marcos Vinícius², Ana Fabrícia Braga Magalhães¹, Lucas Lima Verardo¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite (EMBRAPA), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente: julianna.torres@ufvjm.edu.br

Resumo: Estratégias em busca de explorar características como a tolerância ao estresse térmico para raças menos adaptadas ganham um espaço cada vez maior dentro da produção animal. Em se considerando o estresse térmico, o gene receptor da prolactina (*PRLR*) necessita ser mais estudado, uma vez que diferentes mutações neste gene, também conhecido como *slick hair*, estão relacionadas à maior tolerância em animais *Bos taurus* adaptados. Assim, objetivou-se, com este estudo, analisar *in silico* a região à montante do gene *PRLR* em busca de variantes (inserções e deleções) na raça Gir com possíveis efeitos na ligação de fatores de transcrição (FT) associados ao estresse térmico. Para isso, dados de ressequenciamento de 13 animais da raça Gir foram utilizados para identificar tais variantes, sendo selecionadas apenas aquelas na região à montante do gene *PRLR*. Como resultado, observou-se uma nova deleção de 10 pb na sua região promotora. As sequências desta região (original e mutante) foram utilizadas para buscar sítios de ligação de fatores de transcrição (FT), tendo sido observado que a sequência contendo a deleção apresentou ligação do FT *KLF4* no local. Assim, como o *PRLR*, este FT pode estar relacionado à resposta ao calor, e desta forma, podem atuar juntos na tolerância ao estresse térmico em bovinos, sendo necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para confirmar sua possível ação na tolerância ao estresse térmico em bovinos da raça Gir.

Palavras-chave: ANÁLISES FUNCIONAIS, BOVINOCULTURA, GENÔMICA, INDEL.

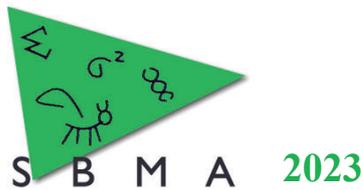
***In silico* analyses reveals a deletion in the *PRLR* promoter gene of the Gir breed population: a possible role in thermal tolerance stress**

Abstract: Strategies that explore traits like thermal stress resistance for less adapted breeds are gradually gaining ground in animal production. Considering the thermal stress, the prolactin receptor gene (*PRLR*) needs to undergo further studies due to mutations in this gene, also known as *slick hair* and has been shown to be related to a higher thermal tolerance in adapted *Bos taurus* animals. Thus, the aim of this study was to analyze *in silico* the upstream region of *PRLR* gene, looking for variants (insertions and deletions) in the Gir breed with possible effects on the binding of transcription factors (TF) associated with heat stress. Therefore, resequencing data from 13 animals of Gir breed were used to identify those variants. Only those in the upstream regions of *PRLR* gene were selected. As a result, a new deletion of 10bp in its promoter region was observed. The sequences of this region (original and mutant) were used to search for transcription factor binding sites. It was observed that the sequence with a deletion included a binding site for *KLF4* TF. Like *PRLR*, this TF can be related to thermal response, and thus, they could possibly play a role together in thermal resistance in cattle. Overall, *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to confirm their possible action in the thermal tolerance of Gir breed population.

Keywords: CATTLE FARMING, FUNCTIONAL ANALYSIS, GENOMICS, INDEL.

Introdução

Os produtores de bovinos com propriedades localizadas em regiões tropicais buscam ferramentas que melhorem a produção, enquanto tentam reduzir os efeitos dos climas quentes e, ou úmidos sobre os animais. Entre as possíveis alternativas para mitigar este efeito está o cruzamento entre raças zebuínas e europeias, o qual objetiva melhorar os índices produtivos e reprodutivos, tanto em raças leiteiras quanto de corte. Considerando as raças leiteiras, o cruzamento mais utilizado é o envolvendo as raças Gir e Holandesa, produzindo um animal mais tolerante ao clima tropical e com melhores performances reprodutivas e



produtivas. Esse cruzamento, inclusive, inspirou a formação da raça sintética Girolando (Silva et al., 2022), que vem ganhando cada vez mais espaço entre os produtores justamente pela sua boa produção aliada a rusticidade. Um fator crucial na capacidade de tolerância e rusticidade destes animais pode ser explicado pela sua habilidade em tolerar o estresse térmico por calor.

Neste sentido, o gene do receptor da prolactina (*PRLR*) apresenta um grande potencial de estudo por ser associado a resistência ao estresse térmico (Hansen, 2020). Além disso, esse gene contém as mutações chamadas *slick-hair* que promovem a tolerância ao estresse térmico em animais *Bos taurus* adaptados (Florez Murillo et al. 2021), porém mais informações sobre possíveis variantes em uma raça zebuína como o Gir ainda precisam ser exploradas. Assim, objetivou-se analisar *in silico* a região a montante do gene *PRLR* em busca de variantes na raça Gir com possíveis efeitos na ligação de fatores de transcrição (FT) associados ao estresse térmico por calor.

Material e Métodos

Foram utilizados dados de resequenciamento de 13 animais da raça Gir. O sequenciamento, mapeamento e identificação das variantes foram realizados de acordo com o preconizado no projeto 1000Bulls, sendo obtido um total de 375.802.569,5 *reads*, com 99,75% de mapeamento e cobertura de 15,77 X. Inserções e deleções foram identificadas de acordo com a montagem atualizada do genoma bovino (ARS-UCD1.2). Uma vez identificadas, as variantes foram classificadas de acordo com sua posição e selecionadas apenas aquelas na região à montante do gene *PRLR* usando a ferramenta Ensembl Variant Effect Predictor (VEP, version 84).

Dentre as variantes identificadas, uma nova deleção de 10 pb foi observada a aproximadamente 739 pb de distância do início de transcrição do gene *PRLR*, mais especificamente, na isoforma (*XM_005221579.4*). Assim, sua sequência à montante (3000kb) foi obtida no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281422>), para a obtenção de dois arquivos FASTA, sendo um com a sequência original do bovino e outra com a deleção. Estas sequências foram utilizadas como entrada no programa TFM-explorer para buscar por sítios de ligação de fatores de transcrição (SLFT) usando matrizes de peso do banco de dados de vertebrados JASPAR.

Resultados e Discussão

Foi observado que a sequência contendo a deleção apresentou um novo sítio de ligação do FT *KLF4* no local (Figura 1). Assim como o *PRLR*, este FT está relacionado com a resposta ao estresse térmico por calor em camundongos e em ensaios celulares (Liu et al., 2006). Além disso, o gene *KLF4* codifica a proteína Kruppel-like fator 4, e apresenta funções diversas, sendo expressa em tecidos como coração, pulmões, cérebro, rins e músculo esquelético (Liu et al., 2006). Entre as funções deste gene, observa-se uma relação com o crescimento celular, sendo identificado nas células-tronco do folículo piloso em camundongos (Li et al., 2012). Uma vez que o gene *PRLR* atua na regulação do crescimento do folículo piloso (Littlejohn et al., 2014) e o *KLF4* como um regulador do crescimento celular, é possível que esses dois genes atuem juntos para influenciar, não somente o crescimento folicular, mas também na regulação do estresse térmico.

WT 5' – GGGCAGCGGTGGTGGTGGGGGGGGGGGGGGGTGGGCAG – 3'



MT 5' – GGGCAGCGGTGGTGGGGGGGGGTGGGCAG – 3'

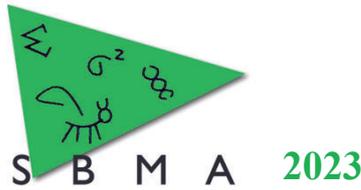


Figura 1. Região promotora do gene *PRLR* em bovinos (WT) e a região com a deleção observada na população da raça Gir (MT). As bases em caixa vermelha mostram o sítio de deleção da variante em amarelo. As bases em azul correspondem ao sítio de ligação para o fator de transcrição *KLF4* (balão azul).

Conclusão

Neste estudo observamos que uma nova deleção identificada na região promotora do gene *PRLR* da raça Gir apresentou um novo sítio de ligação do fator de transcrição *KLF4*. Uma vez que estes compartilham ações biológicas relacionadas ao estresse térmico, sugere-se que a deleção identificada neste estudo possa ser utilizada em futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para confirmar sua possível ação na resistência ao estresse térmico em bovinos da raça Gir.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (processo APQ-01834 -18) pelo apoio financeiro.

Literatura citada

Flórez Murillo J.M., Landaeta-Hernández A.J., Kim E.S., Bostrom J.R., Larson, S. A., Pérez O'Brien A. M., Montero-Urdaneta M.A., Garcia J.F., & Sonstegard T.S. 2021. Three novel nonsense mutations of prolactin receptor found in heat-tolerant *Bos taurus* breeds of the Caribbean Basin. **Animal Genetics**, 52(1), 132-134.

Hansen P. J. 2020. Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. In **Theriogenology** Vol. 154, pp. 190–202. Elsevier Inc.

Li J., Zheng H., Wang J., Yu F., Morris R. J., Wang T. C., Huang S., & Ai W. 2012. Expression of kruppel-like factor *KLF4* in mouse hair follicle stem cells contributes to cutaneous wound healing. **PLoS ONE**, 7(6).

Littlejohn M. D., Henty K. M., Tiplady K., Johnson T., Harland C., Lopdell T., Sherlock R. G., Li W., Lukefahr S. D., Shanks B. C., Garrick D. J., Snell R. G., Spelman R. J., & Davis S. R. 2014. Functionally reciprocal mutations of the prolactin signaling pathway define hairy and slick cattle. **Nature Communications**, 5.

Liu Y., Wang J., Yi Y., Zhang H., Liu J., Liu M., Yuan C., Tang D., Benjamin I. J., & Xiao X. 2006. Induction of *KLF4* in response to heat stress. In **Cell Stress & Chaperones** (Vol. 11, Issue 4). Cell Stress Society International.

Silva M.V.G.B., Ferreira Junior E., Panetto J. C. C., Paiva L.C., Machado M.A., Faza D.R.L.R., Dos Santos Daltro D., Negri R., Kluska S., Martins M.F., & Borges C. A. V. 2022. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando - avaliação genética/genômica de fêmeas**. (1ª Edição). Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite.