



De 19 a 21
de Novembro de 2015

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES *IL-1 β* E *IL-10* EM ÚBERES EXTRACORPÓREOS EM RESPOSTA À *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Isabela Fonseca(1), Isabella S. B. Pinto(2), Juliana França Monteiro de Mendonça(3), Isabella Dutra Valverde(4); Humberto de Mello Brandão(5), Alessandro de Sá Guimarães(6), Wanessa de Araújo Carvalho(7), Lyderson Facio Viccini(8), Marta Fonseca Martins(9)

(1) Bolsista de Pós-Doutorado Júnior - CNPq; Laboratório de Genética Molecular; Embrapa Gado de Leite; E-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br; (2) Estudante de Doutorado em Genética e Biotecnologia; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: isabellasbp@gmail.com; (3) Estudante de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: julianafmm@yahoo.com.br; (4) Estudante de Graduação em Farmácia; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: isabella_argirita@hotmail.com; (5) Pesquisador; Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal; Embrapa Gado de Leite; E-mail: humberto.brandao@embrapa.br; (6) Pesquisador; Laboratório de Microbiologia do Leite; Embrapa Gado de Leite; E-mail: alessandro.guimaraes@embrapa.br; Pesquisadora; Embrapa Gado de Leite; E-mail: wanessa.carvalho@embrapa.br; (8) Professor; Departamento de Biologia; Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: lyderson.viccini@ufjf.edu.br; (9) Pesquisadora; Laboratório de Genética Molecular; Embrapa Gado de Leite; E-mail: marta.martins@embrapa.br.

RESUMO – Dentre as doenças infectocontagiosas na bovinocultura de leite, a mastite é a principal doença no aspecto econômico. Como impactos para a atividade podem ser citados a redução da produtividade e da qualidade dos produtos lácteos, o aumento dos custos com tratamento dos animais, o descarte do leite, além dos aspectos ligados a segurança do alimento. Estudos com a finalidade de melhor compreender os processos biológicos envolvidos na resposta à mastite são fundamentais no desenvolvimento de soluções tecnológicas. Deste modo, foi avaliado o perfil de expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-10* no tecido alveolar em resposta à inoculação de *Streptococcus agalactiae* por meio do modelo de glândula mamária extracorpórea de vacas Girolando. Foram utilizados quatro úberes, sendo dois tetos inoculados e dois tetos utilizados como controle para cada úbere. Os tecidos foram coletados antes da inoculação, 3 horas e 6 horas após a inoculação da bactéria. As comparações do nível de expressão gênica, avaliados por PCR em Tempo Real, indicaram que houve aumento da expressão do gene *IL-1 β* com o passar do tempo ($P < 0,001$ 3 horas após a inoculação e $P < 0,05$ 6 horas após a inoculação) e pico de expressão 3 horas após a inoculação para o gene *IL-10* e uma queda significativa no nível de expressão ($P < 0,05$) no tempo 6 em relação ao tempo 3 após a inoculação. A diferença no perfil de expressão destes genes sugere que eles possivelmente desempenham funções importantes nos mecanismos de resposta à mastite bovina em animais Girolando.

Palavras-chave: Expressão gênica. Glândula mamária perfundida. Resposta imune.

Introdução

Nos últimos anos o setor agropecuário foi o que mais cresceu no Brasil, em especial a cadeia produtiva do leite. Entre 2000 e 2013, a produção de leite mais que dobrou, mantendo-se continuamente crescente, ultrapassando a marca de 34 bilhões de litros em 2013 (FAO, 2015). No entanto, esta evolução na cadeia



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

produtiva do leite poderia ser ainda maior se houvesse maior controle das doenças infectocontagiosas no rebanho. Dentre estas doenças destaca-se a mastite, a principal do ponto de vista econômico. Como prejuízos podem ser citados a redução da produtividade e a baixa qualidade dos produtos lácteos, considerando os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos. Portanto, compreender melhor esta doença e buscar soluções é de extrema relevância para o país.

A mastite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos (Oviedo-Boyso et al., 2007). Durante esta inflamação ocorre um influxo de células somáticas compostas principalmente por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, na qual a rapidez e a eficácia da resposta imune do hospedeiro contra o patógeno invasor, afeta o estabelecimento, a persistência e a gravidade da infecção (Bannerman et al., 2009). A seleção de animais resistentes a esta doença e a incorporação desta característica aos rebanhos têm se mostrado uma alternativa promissora, pois existe uma grande variedade de micro-organismos causadores. No entanto, estudos indicam que a herdabilidade é baixa para a incidência da mastite clínica, o que dificulta a seleção direta para resistência. Neste sentido, estudos de expressão gênica e a identificação de genes relacionados com a resposta a esta infecção podem auxiliar na seleção de animais mais adaptados. Nos últimos anos trabalhos têm descrito perfis imunológicos e respostas associadas à mastite, contudo poucos descrevem estas respostas em animais criados em sistemas de produção e condições brasileiras, onde predominam animais mestiços criados a pasto. Além disso, muitos destes estudos são realizados com animais vivos, e por limitações éticas e práticas o uso de modelos extracorpóreos constitui uma alternativa para a realização deste tipo de experimento. Não há relatos do uso deste modelo em estudos genéticos, mas dados ainda não publicados mostram que essa pode ser uma excelente estratégia para estudos de expressão gênica.

Desse modo, foi avaliado o perfil de expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-10* por meio da técnica de PCR em Tempo Real em tecido alveolar coletado em úberes extracorpóreos nos tempos 0, 3 e 6 horas após a inoculação de *Streptococcus agalactiae*. A identificação de fatores que contribuem para a predisposição da glândula mamária à mastite facilitará o desenvolvimento de novas estratégias de controle a esta doença, como, por exemplo, a identificação de genes que possam ser utilizados futuramente como marcadores para resistência à mastite nos programas de melhoramento animal.

Material e Métodos

Antes do abate, quatro animais Girolando passaram por exame clínico do úbere e pelo teste da caneca, além disso amostras de leite foram coletadas em tubos estéreis para realização de testes microbiológicos. Os úberes coletados foram refrigerados a 8°C e transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite, onde foram fixadas em um suporte mimetizando a posição ortostática. O experimento foi montado como descrito por Kietzmann et al. (1993) e Ehinger e Kietzmann (2000a e b), no qual os quatro úberes foram perfundidos com solução Tyrode (NaCl 137,00



De 19 a 21
de Novembro de 2015

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

mM; KCl 2,70 mM; CaCl₂.2H₂O 1,36 mM; MgCl₂.6H₂O 0,50 mM; NaH₂PO₄.H₂O 0,36 mM; NaHCO₃ 11,90 mM; Glicose 5,50 mM). Dois tetos (AE e PE) foram inoculados com uma estirpe de *S. agalactiae* de acordo com Fonseca et al. (2015) numa concentração final de 100 CFU/mL, enquanto os outros tetos (AD e PD) foram inoculados com PBS 1X estéril e utilizados como controle. Para o estudo de expressão gênica, amostras de tecido alveolar foram coletadas dos quatro tetos de cada úbere, nos tempos 0, 3 e 6 horas após a montagem do sistema, totalizando 48 amostras.

O RNA total foi extraído utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo-se as recomendações do fabricante, quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® Technologies, Wilmington, DE, EUA) e a sua qualidade foi avaliada pelo índice RIN (RNA Integrity Number) após análise no Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). Em seguida a primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o cDNA produzido armazenado a -20°C até o momento da PCR em Tempo Real.

Foram comparadas as taxas de expressão dos genes *IL-1β* e *IL-10* nas amostras de tecidos coletadas a partir dos quatro úberes utilizados. As PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e após 40 ciclos de amplificação foi feita a curva de dissociação para assegurar que cada reação produziu um único fragmento. Os dados da PCR em Tempo Real obtidos foram analisados no programa REST® 2009, desenvolvido por M. Pfaffl (Technical University Munich) e Qiagen, disponível em <http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html> para comparação dos níveis de expressão dos genes entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

A eficiência de amplificação do gene alvo e controles endógenos variaram de 0,8 a 1,0 e, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos.

Houve aumento da expressão do gene *IL-1β* ao longo do tempo nos tetos inoculados em relação aos tetos controles. Após 3 horas da inoculação o aumento da taxa de expressão foi de 2,9 vezes ($P < 0,001$); e 6 horas após a inoculação este aumento foi de 3,4 vezes ($P < 0,05$). Já para o gene *IL-10* foi verificado um pico de expressão 3 horas após a inoculação de *S. agalactiae* e uma redução significativa ($P < 0,05$) 6 horas após a inoculação em relação ao tempo 0, com diminuição de 6 vezes no nível de expressão.

Estes resultados estão de acordo com os achados de Strandberg et al. (2005), os quais demonstraram que o nível de expressão do gene *IL-1β* aumentou rapidamente dentro de 2 horas após a estimulação *in vitro* de células epiteliais mamárias com ácido lipoteicoico. E de acordo com Fonseca et al. (2015) que verificaram o mesmo perfil de expressão em vagas Gir Leiteiro infectadas artificialmente com *S. agalactiae*. Por ser uma componente chave na resposta imune inata, era esperado aumento na expressão desta citocina nas primeiras horas após a infecção, pois juntamente com outras citocinas, ela promove o aumento da permeabilidade vascular, favorecendo o recrutamento de leucócitos.



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir células *Natural Killer*. Os resultados encontrados aqui também corroboram os achados de Riollet et al. (2001) e Fonseca et al. (2009), onde animais da raça Holandesa com mastite crônica tiveram maior expressão de *IL-10* em células do leite quando comparados à animais saudáveis.

Conclusões

Foi possível verificar diferença no perfil de expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-10* entre os tempos analisados após a inoculação de *S. agalactiae* em úberes extracorpóreos de vacas Girolando. Isto sugere que possivelmente eles desempenham funções importantes nos mecanismos de resposta à mastite bovina.

Instituição de Fomento

Fapemig, CNPq e Embrapa.

Referências Bibliográficas

Bannerman, D.D.; Rinaldi, M.; Vinyard, B.T.; Laihia, J.; Leino, L. Effects of intramammary infusion of cis-urocanic acid on mastitis-associated inflammation and tissue injury in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 373-382, 2009.

Ehinger, A. M.; Kietzmann, M. Tissue distribution of oxacillin and ampicillin in the isolated perfused bovine udder. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 47, p. 157-168, 2000a.

Ehinger, A. M.; Kietzmann, M. Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 303-310, 2000b.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division**. Roma, 2015. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

Fonseca, I.; Cardoso, F.F.; Higa, R.H.; Giachetto, P.F.; Brandao, H.M.; Brito, M.A.V.P.; Ferreira, M.B.D.; Guimarães, S.E.F.; Martins, M.F. Gene expression profile in zebu dairy cows (*Bos taurus indicus*) with mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*. **Livestock Science**, v. 180, p. 47-57, 2015.

Fonseca, I.; Silva, P.V.; Lange, C.C.; Guimarães, M.F.M.; Weller, M.M.C.A.; Sousa, K.R.S.; Lopes, P.S.; Guimarães, J.D.; Guimarães, S.E.F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 776-781, 2009.

Kietzmann, M.; Loscher, W.; Arens, D.; Maass, P.; Lubach, D. The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 30, p. 75-84, 1993.



*De 19 a 21
de Novembro de 2015*

No Ouro Minas Palace Hotel
BELO HORIZONTE - MG

Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcón, J.J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E.; Bravo-Patinño, A.; Baizabal-Aguirre, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.

Riollet, C.; Rainard, P.; Poutrel, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

Strandberg, Y.; Gray C.; Vuocolo, T.; Donaldson, L.; Broadway, M.; Tellam, R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. **Cytokine**, v. 31, p. 72-86, 2005.