



Expressão relativa dos genes *IFN-gama* e *IL-12* em células do leite de vacas mestiças saudáveis e com mastite clínica¹

Isabela Fonseca², Gustavo Resende Antunes³, Daisyléa de Souza Paiva³, Marcos Macedo Junqueira⁴, Gertrude Averil Baker Thompson⁵, Marta Fonseca Martins Guimarães⁴

¹Financiado pela FAPEMIG

²Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. E-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

³Alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica - UFJF. E-mail: guto1982@gmail.com, daisyufjf@gmail.com

⁴Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora (MG). E-mail: marcosmj@cnppl.embrapa.br, mmartins@cnppl.embrapa.br

⁵Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal. E-mail: gat1@mail.icav.up.pt

Resumo: A mastite bovina é a doença de maior incidência nos rebanhos bovinos no mundo, mesmo naqueles que adotam rigorosos programas de controle. Uma das opções mais promissora para a redução dos problemas causados por esta doença, além dos cuidados sanitários é a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos. Genes relacionados à resposta imune estão correlacionados à resposta à mastite e por isso, dentre estes genes, foram selecionados *IFN- γ* e *IL-12* como alvo deste trabalho. Dois grupos de animais foram selecionados com base na sua condição clínica. O grupo denominado hígido (grupo H) não apresentava sinais clínicos de mastite, ao contrário do grupo com mastite (grupo M). O RNA total das amostras de leite de cada grupo foi extraído e a primeira fita de cDNA sintetizada. A análise da expressão dos genes foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real. O gene *IFN- γ* foi menos expresso ($P < 0,05$) nos animais com mastite quando comparado com vacas hígdas, assim como também houve uma tendência de menor expressão do gene *IL-12* em animais com mastite, porém esta diferença não foi significativa ($P > 0,05$).

Palavras-chave: bovino, PCR em Tempo Real, resposta imune

Relative expression of *IFN-gama* and *IL-12* genes on milk cells from mestizo cows healthy and with clinical mastitis

Abstract: Bovine mastitis is the most incident cause of disease in cattle herds worldwide, even in those that have strict control programs. One of the most promising approaches to reduce problems caused by this disease, together with sanitary control measures, is the selection of resistant animals and incorporation of this trait into herds. Genes involved in the immune response are related with the response to mastitis. Thus, *IFN- γ* e *IL-12* genes were selected as target in this study. Two animal groups were picked based in its clinical condition. Healthy animals group (cluster H) with no clinical signs of mastitis, unlike mastitis group (cluster M). Total RNA was extracted from milk cells and the cDNA's first strand was synthesized. Gene expression analysis was done using Real-Time PCR technique. *IFN- γ* gene had the least expression ($P < 0,05$) in cluster M when compared to healthy animals. *IL-12* expression was lower in mastitis animals, but this difference was not significant ($P > 0,05$).

Keywords: bovine, immune response, Real Time PCR

Introdução

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro onde a utilização de animais mestiços, produtos do cruzamento de raças zebuínas com raças europeias, é prática bastante difundida no país. Cerca de 70% da produção de leite no Brasil provém de vacas mestiças Holandês-Zebu (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteZonadaMataAtlantica/racas1.html#vacasmesticas>). Na última década, aconteceram intensas transformações na cadeia produtiva do leite o que levou a reestruturação de todos os seus elos, possibilitando uma maior competitividade. Mas, apesar das estatísticas mostrarem uma constante evolução da produção no país, ainda há vários gargalos que precisam ser equacionados para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor. Vários fatores, tais como clima, instalações, mão-de-obra, potencial zootécnico e genético, políticas públicas e saúde animal fazem com que a atividade de produção de leite seja bastante onerosa e com baixa produtividade. Dentre os problemas de saúde animal, as doenças infecto-contagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite a principal doença no aspecto econômico.

Uma das formas que tem se mostrado mais promissora para redução dos problemas causados pelas doenças infecto-contagiosas, além dos cuidados sanitários, é a seleção de animais resistentes às doenças e a incorporação desta característica aos rebanhos. No caso da mastite, já que é difícil a produção de vacinas efetivas devido a uma grande variedade de microrganismos causadores desta condição e ao próprio caráter multifatorial da doença (Detilleux et al., 1994). Além disso, a atual tendência de conscientização do consumidor quanto à qualidade e procedência do alimento e a busca pela redução do uso de antibióticos nos animais aumentam a importância da resistência do rebanho às enfermidades.

A seleção de animais mais resistentes baseada no conhecimento do perfil genético dos animais possibilita a redução de aplicações de medicamentos, com conseqüente redução nos níveis de contaminação dos produtos e do meio ambiente. Desta forma, é importante identificar e caracterizar a expressão gênica em animais hígidos e com mastite para posterior utilização destas informações na busca de genes que possam ser testados e validados como marcadores para tais condições fisiológicas. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão de genes presentes no leite de bovinos mestiços hígidos e com mastite. Para tanto, foi investigada a expressão dos genes *IFN- γ* (Interferon gama) e *IL-12* (Interleucina 12) em células do leite de vacas mestiças saudáveis e com mastite clínica para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune dos animais acometidos com mastite em resposta à infecção.

Material e Métodos

Dois grupos de animais mestiços provenientes do Campo Experimental Santa Mônica da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Valença (RJ) foram selecionados com base nos sinais clínicos dos animais e o teste da caneca. Um grupo com 17 animais que não apresentava sinais clínicos de mastite (animais hígidos - H) e eram negativos para o teste da caneca, e o outro grupo, também com 17 animais, que apresentavam sinais clínicos de mastite, e eram positivos para o teste da caneca (grupo com mastite - M). Em cada uma das vacas foram coletadas quatro amostras de 50 mL de leite em tubos esterilizados, os quais foram transportados em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora (MG).

O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante com algumas modificações para adaptar o protocolo ao tipo de amostra (leite), também recomendadas pelo fabricante. As amostras de leite foram incubadas por um período de 24 horas à temperatura de 2 a 8°C para isolamento dos leucócitos. Após este período, uma camada superior de creme formada foi descartada e o leite homogeneizado a 37°C com agitação. Em seguida as amostras foram centrifugadas para separação das células somáticas. O pelete foi ressuscitado em PBS 1X (2,7 mM Cloreto de Potássio, 1,8 mM Fosfato de Potássio, 137 mM Cloreto de Sódio, 10,1 mM Fosfato de Sódio) e centrifugado novamente. Após duas ou mais lavagens com PBS 1X, o pelete foi ressuscitado em tampão RLT fornecido no kit. O lisado formado foi armazenado a -80°C até o uso. Os passos posteriores para extração do RNA total foram feitos conforme recomendação do kit. O RNA total isolado foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, DE, EUA), verificado sua qualidade em gel de agarose e armazenado a -80°C até o uso.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O cDNA produzido foi armazenado a -20°C até o momento da reação de PCR em Tempo Real. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes foram desenhados usando o programa *Primer Express* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas do banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene desidrogenase 3-fosfato gliceraldeído (*GAPDH*) foi utilizado como referência endógena e após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*.

Antes da quantificação em tempo real, as reações de PCR foram otimizadas para todos os genes. Para tanto, foram testadas três quantidades de cDNA (100, 200 e 400 ng/reação) e três diluições de *primer* (200, 400 e 600 nM). Depois de estabelecidas as melhores condições de amplificação, efetuou-se a validação do experimento por meio da determinação da eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno, em que as diluições seriadas de cDNA foram plotadas contra seus respectivos Ct (*cycle threshold*) para cálculo da eficiência de PCR, já que na quantificação relativa é necessário que a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno sejam aproximadamente iguais.

Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no *ABI 7300 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), sendo cada amostra amplificada separadamente para cada gene. Os dados obtidos durante a reação de PCR em

Tempo Real, gerados pelo equipamento *ABI 7300 Real-Time PCR*, foram analisados pelo programa REST[®] 2008 versão 2.0.7, disponível em <http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html> que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

A eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno foram bem próximos, como pode ser observado na Tabela 1 e, na curva de dissociação, não foram observados picos referentes à dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos para nenhum gene. Também na Tabela 1 observa-se a quantidade de cDNA (ng/reação) e *primer* (nM) otimizada para cada gene. O coeficiente de variação das duplicatas dos Ct de cada amostra não ultrapassou 5%, porém, grande variação foi observada em relação às médias obtidas entre as amostras de cada grupo (dados não mostrados).

Tabela 1 Eficiência calculada e quantidade de cDNA e *primer* otimizada para cada gene

| Gene | Eficiência calculada* | Concentração de <i>primer</i> | Concentração de cDNA |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------|
| GAPDH | 0,7609 | 400 nM | 200 ng/reação |
| IL-12 | 0,7818 | 200 nM | 200 ng/reação |
| IFN γ | 0,7411 | 600 nM | 200 ng/reação |

*Eficiência calculada pelo programa REST[®] 2008

A expressão dos genes *IL-12* e *IFN- γ* foram avaliadas considerando os dois grupos de animais (H e M). O gene *IFN- γ* foi 2,85 vezes menos expresso no grupo M quando comparado com o grupo H ($P < 0,05$). E, apesar da diferença não significativa ($P > 0,05$), houve uma tendência do grupo H expressar 1,94 vezes mais *IL-12* em relação aos animais do grupo M. *IFN- γ* está associado à conversão de linfócitos Th₀ em linfócitos Th₁, além da ativação de macrófagos e neutrófilos, portanto esta citocina está relacionada ao perfil de resposta imunológica do tipo celular. Além disso, a deficiência de *IFN- γ* está associada à maior susceptibilidade às infecções por microrganismos intracelulares (Janeway et al., 2002), o que pode justificar o fato dos animais do grupo H terem expressado maior quantidade deste gene. Isso porque os animais do grupo M podem ter manifestado a doença justamente devido à deficiência na produção ou a produção tardia desta citocina. Já a *IL-12* induz a síntese de *IFN- γ* pelos linfócitos T e células *Natural Killer*, atuando como adjuvante endógeno, recrutando e ativando macrófagos por meio da indução do *IFN- γ* . Portanto, como era esperada, a expressão da *IL-12* seguiu o mesmo padrão da expressão do *IFN- γ* , apesar da diferença não significativa, tendendo expressar-se menos nos animais do grupo M. Como os dois genes considerados neste estudo estão relacionados com o perfil de resposta imunológica do tipo celular, pode ser que os animais com mastite (M) estejam desenvolvendo resposta imune do tipo humoral, o que pode acontecer dependendo do agente causador da mastite.

Apesar dos resultados deste trabalho, são necessários mais estudos para que se possa inferir sobre o perfil de expressão destes genes em animais mestiços, já que não existem outros trabalhos que comparem a expressão destes genes nestes animais. Como próxima etapa será analisado um número maior de animais e/ou outros genes, com maior controle do agente causador da mastite a fim de melhor definir a resposta de animais resistentes e susceptíveis, de modo que o mecanismo de resposta imune relacionado à mastite seja melhor compreendido e venha gerar estratégias mais eficientes de controle e erradicação.

Conclusão

Uma diferença significativa no perfil de expressão do gene *IFN- γ* foi verificada entre os dois grupos de animais estudados, sugerindo que possivelmente este gene desempenhe um papel importante nos mecanismos de resistência à mastite bovina. Porém é necessário que se realize um estudo com um maior número de animais de diferentes raças, incluindo outros genes a fim de confirmar estes resultados.

Literatura citada

DETILLEUX, J.C.; KOEHLER, K.J.; FREEMAN, A.E. et al. Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2640-2650, 1994.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sistemas de Produção**. Versão Eletrônica 1 ISSN 1678-314X. Juiz de Fora, MG, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteZonadaMataAtlantica/racas1.html#vacasmesticas>> Acesso em: 20 mar. 2009.

JANEWAY, C.A.; TAVERS, P.; WALPORT, M. et al. **Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença**. 5.ed. Artmed, Porto Alegre, 2002.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST[®]) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v.30, n.9 e36, 2002.