

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Análise de genes diferencialmente expressos em resposta à infecção por *Streptococcus agalactiae*^{1,2}

Bianca de Oliveira Carvalho^{3,4}, Hyago Passe Pereira⁵, Jéssica Capelli do Nascimento^{3,6}, Otto Samuel Gonçalves Seiberlick³, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁷, Wanessa Araújo Carvalho⁸, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva⁸, Marco Antonio Machado^{8,9}, Marta Fonseca Martins^{8,9,10}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq e da Fapemig

²Parte da dissertação do segundo autor do PPGCBio/UFJF

³Bolsista do Programa de Iniciação Científica CNPq/ Embrapa. e-mail: biancscarvalho@gmail.com

⁴Graduando em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF

⁵Biólogo. Doutorando do PPGCBio/UFJF. Bolsista Capes

⁶Graduando em Farmácia – Faculdade de Ciências Médias e da Saúde/JF

⁷Analista Embrapa Gado de Leite

⁸Pesquisador(a) Embrapa Gado de Leite

⁹Bolsista de produtividade – CNPq

¹⁰Orientadora – e-mail: marta.martins@embrapa.br

Resumo: As doenças infectocontagiosas estão entre os problemas que mais acarretam prejuízos econômicos na pecuária brasileira e mundial, sendo a mastite a principal enfermidade acometida aos bovinos. A mastite pode ser definida como uma inflamação da glândula mamária que é causada, mais frequentemente, por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos. Podendo culminar na redução da quantidade e no comprometimento da qualidade do leite, podendo levar até a perda total da potencialidade secretora da glândula mamaria do animal infectado ou mesmo a sua morte. Estudos relacionados aos mecanismos de resposta e resistência de animais à mastite foram realizados a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e resposta a patógenos. Em estudos anteriores, foram investigados fatores de transcrição relacionados a genes diferencialmente expressos no tecido mamário durante processos biológicos, e associados à resposta imunológica inata e inflamatória em quartos mamários inoculados com *Streptococcus agalactiae*. Sendo assim, dando continuidade a esses estudos, este trabalho teve como objetivo a validação do perfil de expressão gênica dos genes CD14, STAT3 e NFKBIA em amostras de úberes extracorpóreos inoculados com *S. agalactiae*. Análises de PCR em Tempo Real demonstraram que os genes CD14, STAT3 e NFKBIA estavam *up-regulated*, confirmando os resultados encontrados anteriormente por RNASeq.

Palavras-chave: CD14, NFKBIA, PCR em tempo real, Resposta inflamatória, STAT3

Analysis of Differentially Expressed Genes in Response to *Streptococcus agalactiae* Infection

Abstract: Infectious diseases are characterized as problems that most cause economic losses in Brazilian livestock, and mastitis is the main disease affecting cattle. Mastitis can be defined as an inflammation of the mammary gland which is most often caused by pathogenic environmental or contagious microorganisms. It can culminate in the reduction in quantity and in the compromise of the quality of the milk produced, and may even lead to a total loss of the secretory potentiality of the mammary gland of the infected animal or even to its death. In addition to the sanitary and environmental structure of the herd's location, studies related to genetic resistance and susceptibility of the animals to mastitis were carried out in order to stimulate great progress and development of innovative solutions for fast and accurate selection of cattle from its genetic value. In previous studies, transcription factors related to differentially expressed genes in the mammary tissue during biological processes associated with innate and inflammatory immune response in mammary quarters inoculated with *Streptococcus agalactiae* were investigated. Among the found genes, some presented great prominence such as CD14, STAT3 and NFKBIA. Based on this information, it was possible to confirm the high regulation of these genes in response to *Streptococcus agalactiae* infection through the analysis of gene expression and efficiency by Real Time PCR technique.

Keywords: CD14, Inflammatory response, NFKBIA, Real-time PCR, STAT3

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Introdução

A pecuária leiteira representa uma das mais importantes atividades econômicas do Brasil, com a produção, segundo dados da Embrapa, de 35,1 bilhões de litros de leite em 2017 (Embrapa, 2018.). Porém, para manter a estabilidade e a competitividade do setor, a bovinocultura precisa enfrentar alguns obstáculos, como, por exemplo, o controle de doenças infectocontagiosas como a mastite (Fonseca et al., 2009). A mastite é uma resposta inflamatória da glândula mamária caracterizada por um influxo de células somáticas, composto principalmente por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, em resposta à infecção por patógenos. Dentre os patógenos causadores da mastite, o *Streptococcus agalactiae* é um dos principais e em bovinos, a única doença associada à infecção por este patógeno é a mastite. O estabelecimento e gravidade da infecção por esses agentes são definidos pela velocidade e eficácia da resposta imune do hospedeiro após contato e invasão tecidual. Essas questões, além de influenciarem diretamente na saúde e no bem-estar do animal, influenciam na composição, no tempo de vida de leite e derivados, na diminuição da síntese de proteínas importantes para a fabricação de queijo, e no aumento das proteínas do soro, que são indesejáveis para os laticínios (Lopes et al., 2013).

Sabendo disso e conhecendo as inúmeras vias biológicas relacionadas ao desenvolvimento da mastite e também à resposta imune do hospedeiro, estudos vêm sendo realizados com o intuito de definir quais os genes transcritos na glândula mamária que possam atuar na resposta imunológica. Em trabalhos anteriores, foi identificado um grupo de genes diferencialmente expressos (*up e down-regulated*) em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos utilizando a técnica de RNA-Seq (Sbardella et al, 2019; Weller et al, no prelo). Em outro estudo, foram realizadas análises *in silico* de genes diferencialmente expressos (*Up-regulated: LOC515333, FOS, STAT3, NFKBIA, CD14, CCL5, IL8, SAA3 e TLR2; Down-regulated: LOC526630, LOC515887, SCD, LPIN1, FABP4, APOC2, FABP3, DRAM1 e CD46*) com o intuito de estabelecer a relação com fatores de transcrição (STAT3, PPARG, EGR1 e NFKB1) e miRNAs mais relacionados com a resposta imune inata e inflamatória em quartos mamários inoculados com *S. agalactiae* (Pereira, 2019).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo a validação, utilizando a técnica de PCR em Tempo Real, da expressão gênica de três dos genes anteriormente encontrados, *CD14, NFKBIA e STAT3* em úberes extracorpóreos inoculado com *S. agalactiae*.

Material e Métodos

A partir dos resultados obtidos em trabalhos anteriores foi selecionado três genes *up-regulated* (*CD14, STAT3 e NFKBIA*) e um controle endógeno (*B-actina*) para validação de expressão gênica utilizando a técnica de PCR em Tempo Real. A sequência de *primers* foi definida por meio do programa *Primer Express® Software v.3.0 (Applied Biosystems)* a partir de sequências depositadas no GenBank. A PCR em Tempo Real foi realizada usando o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* para calcular a curva de eficiência e reação de amplificação dos genes alvos e endógeno (*CD14, STAT3, NFKBIA e B-actina*). Os dados obtidos durante a PCR em Tempo Real foram analisados com o auxílio dos programas *Excel® e REST® 2009* para normalização dos dados e eficiência da reação de amplificação.

Resultados e Discussão

A eficiência da reação foi calculada utilizando diferentes concentrações de cDNA e primer (Figura 1) e foi determinado que as concentrações ótimas para as reações eram 100 ng de cDNA e 100 µM de primer para todos os genes. Assim a diferença de expressão dos alvos (*CD14, STAT3 e NFKBIA*) foi calculada utilizando a fórmula $2^{\Delta C_t}$, entre os tratamentos inoculado e não inoculado por *S. agalactiae* na glândula mamária com o auxílio do software *REST® 2009* (Tabela 1). Os nossos resultados obtidos indicam que todos os genes alvos avaliados são *up-regulated* no momento da resposta inflamatória na glândula mamária, validando os resultados obtidos por Sbardella et al. (2019) e Weller et al. (no prelo) no qual, estes genes foram descritos como *up-regulated* no desafio de infecção intramamária em úberes extracorpóreos bovinos por *S. agalactiae*.

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

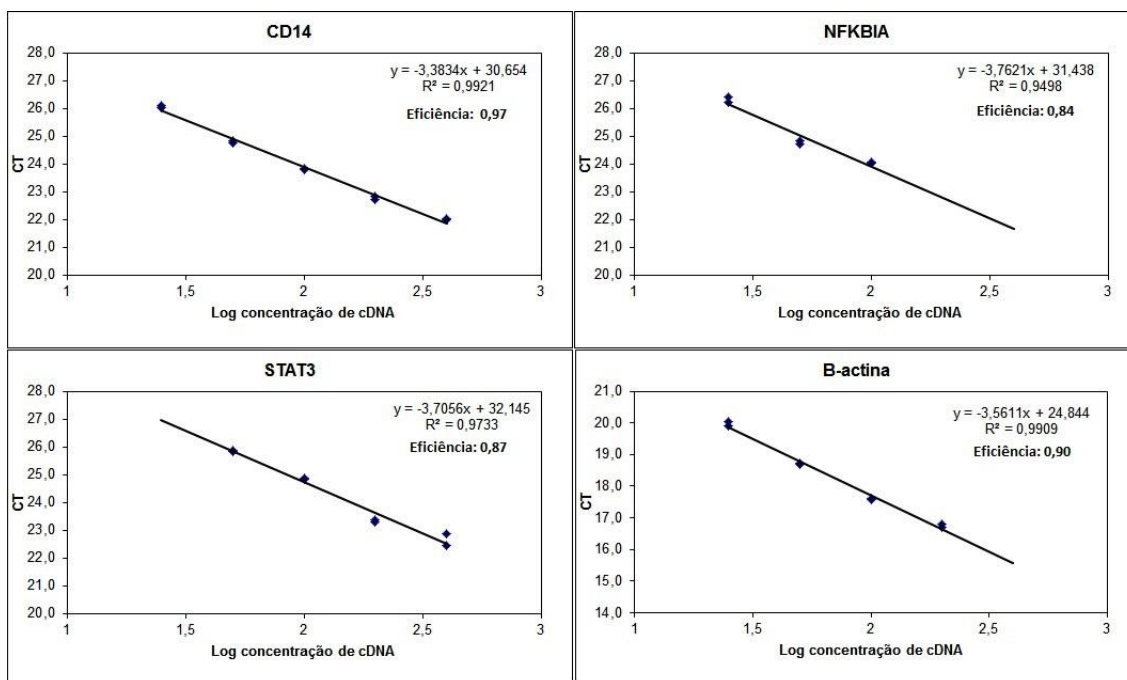


Figura 1. Curva de eficiência dos genes alvo e endógeno analisada por meio do software Excel[®].

Tabela 1. Expressão relativa dos genes alvo com relação ao gene de referência por meio do software REST[®] 2009.

Gene	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	Resultado
STAT3	2,339	0,588 - 8,122	0,168 - 44,218	UP
NFKBIA	2,010	0,729 - 5,831	0,214 - 11,590	UP
CD14	3,941	0,730 - 12,768	0,132 - 1.016,725	UP
B-ACTINA	1,000			

Conclusões

Os genes *CD14*, *STAT3* e *NFKBIA* são *up-regulated* na resposta imune e inflamatória em úberes extracorpóreos de bovinos inoculados com *S. agalactiae*, validando os resultados obtidos por RNASeq.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Fapemig pelo financiamento.

Referências

EMBRAPA. ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. Disponível em: < <https://bit.ly/2IW5t8M> >. Acesso em: 26 jun. 2019.

Pereira, H. P. Análises funcionais *in silico* de genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos, 2019, 65 f. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Pinto, I. S. B. Evaluation of perfused bovine udder for gene expression studies in dairy cows. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 1, p. gmr 16019637, 2017.

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Sbardella, A. P.; Weller, M. M. D. C. A.; Fonseca, I.; Stafuzza, N. B.; Bernardes, P. A.; E Silva, F. F.; da Silva, M. V. G. B.; Martins, M. F.; Munari, D. P. Ribonucleic acid sequencing differential gene expression analysis of isolated perfused bovine udders experimentally inoculated with *S. agalactiae*. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1761-1767, 2019.

Weller, M. M. D. C. A.; Fonseca, I.; Sbardella, A. P.; Pinto, I. S. B.; Viccini, L. F.; Brandão, H. M.; Gern, J. C.; Carvalho, W. A.; Guimarães, A. S.; Brito, M. A. V. P.; Munari, D. P.; Silva, M. V. G. B.; Martins, M.F. Transcriptome analyses in extracorporeal udders of cows in response to *S. agalactiae*, no prelo.