



Quantificação de mRNA de genes relacionados a resposta imune em abomaso de bovinos infectados com endoparasitos *Haemonchus* spp¹

Adriana Mércia Guaratini Ibelli², Liliane Cristina Nakata, Rogério Andréo, Márcia Cristina de Sena Oliveira³, Luiz Lehmann Coutinho⁴, Luciana Correia de Almeida Regitano³

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, financiada pela EMBRAPA

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução – UFSCar/São Carlos. Bolsista da CAPES. e-mail: adriana.ibelli@gmail.com

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Pecuária do Sudeste, São Carlos. e-mail: luciana@cnpq.embrapa.br

⁴Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Resumo: No sudeste brasileiro os endoparasitos que causam maiores perdas na produção de bovinos são do gênero *Haemonchus* spp e *Cooperia* spp. Esses são responsáveis por uma série de alterações tanto na imunidade inata quanto adquirida do hospedeiro. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar a diferença na abundância de RNA mensageiro de genes relacionados à resposta imune no abomaso de bovinos submetidos a 1^a infecção com *Haemonchus* spp. Foi obtido RNA total de dois grupos de cinco bezerros da raça Nelore, um grupo desafio infectado com *Haemonchus* spp e um grupo controle, sem infecção. A quantificação dos genes foi feita pela técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o gene constitutivo RPL-19, como controle e SYBR Green, como corante. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa computacional REST (*Relative Expression Software Tool*). Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) de abundância de mRNA para os genes de interleucinas (IL-2, IL-8 e IL-13), lisozima, proteína de atração de monócitos (MCP-1) e pepsinogênio entre os grupos tratamento e controle analisados. Pode-se concluir que para o tecido analisado, assim como para o tempo de infecção e número de indivíduos por grupo não houve alteração na abundância de transcritos destes genes relacionados à resposta imune.

Palavras-chave: citocinas, endoparasitas, expressão gênica, *Haemonchus* spp, Nelore, PCR em tempo real

mRNA quantification of immune response related genes in abomasum of bovine infected with *Haemonchus* spp parasites

Abstract: In the Brazilian southeast, endoparasites that causes greater losses in the bovine production are from *Haemonchus* spp and *Cooperia* spp genus. They are responsible for several responses, in innate as well as in acquired immunity of the host. The objective of this work was to verify the difference in messenger RNA abundance of genes related with immune response in the abomasum of bovine submitted to first infection with *Haemonchus* spp. Total RNA was obtained from two groups of five calves of the Nelore breed, a challenge group infected with *Haemonchus* spp and a control group, without infection. Quantification of the genes was carried by the real time reverse transcriptase polymerase chain reaction technique, using the constitutive gene RPL-19, as control and SYBR Green as dye. Results were analyzed by the software REST (*Relative Expression Software Tool*). No significant differences ($P > 0,05$) of mRNA abundance for the interleukin genes (IL-2, IL-8 and IL-13), lysozyme, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and pepsinogen were observed between the challenge and control groups analyzed. It can be concluded that for the analyzed tissue, as well as for the infection time and number of individuals per group there was no change on transcript abundance of these genes related to the immune response.

Keywords: cytokine, endoparasite, gene expression, *Haemonchus* spp, Nelore, real time PCR

Introdução

A pecuária brasileira apresenta grande impacto para o setor agrícola nacional, possuindo o maior rebanho bovino comercial do mundo. Em contrapartida, sabe-se que a produtividade é baixa e que as doenças causadas por endoparasitoses do gênero *Haemonchus* são um dos principais limitantes, causando sintomas como diarreia, edemas e hemorragias. Isto faz com que haja redução na produção de leite, carne, morte de animais, bem como, gasto excessivo com a utilização de anti-helmínticos, que nem

sempre são eficazes (Araújo, 1998). Atualmente, novos métodos têm sido desenvolvidos auxiliando na investigação destas doenças. O estudo do sistema imune do hospedeiro, aliado à utilização de ferramentas genéticas e moleculares é uma das alternativas mais eficazes, que permite o entendimento das infecções e dos mecanismos de resistência e suscetibilidade (Sonstergard, 2001). Sabendo dos impactos causados pelas endoparasitoses na produção animal e também da importância do conhecimento do sistema imune do hospedeiro para auxiliar no controle destas doenças, o objetivo deste trabalho foi verificar a abundância de RNA mensageiro de genes relacionados ao sistema imune em resposta à primeira infecção com parasitos do gênero *Haemonchus* spp.

Material e Métodos

Foram utilizados dez bezerros da raça Nelore, provenientes da EMBRAPA – Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (São Carlos – SP), de forma que estes animais foram separados em um grupo controle e um grupo desafio experimental. Os cinco bezerros pertencentes ao grupo desafio experimental, após a desmama, foram infectados artificialmente com cerca de 15.000 larvas, em estágio L3, de *Haemonchus* spp, de cepa proveniente da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. No sétimo dia após a infecção dos animais do grupo desafio experimental foi realizado o sacrifício dos dez bezerros. Foram coletadas amostras de abomaso armazenadas em freezer – 80 °C. A extração de RNA total dos tecidos foi feita utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. A concentração de RNA das amostras foi avaliada por espectrofotometria. O grau de pureza do RNA foi estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve ser igual ou superior a 1,8. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de RNA total utilizando o *Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Foram escolhidos genes (Tabela 1) relacionados com a resistência e suscetibilidade do hospedeiro ao parasito para realização de RT-PCR quantitativa dos abomasos coletados. As análises foram feitas em equipamento “*LightCycler PCRSystem*”, no Laboratório de Biotecnologia Animal (USP/ESALQ, Piracicaba, SP) e o corante utilizado foi o SYBR Green. As reações de qPCR em tempo real foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,8 a 1,0 µL de cada *primer* (2,5 pmol/µL), 0,8 a 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µL Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/µL), 0,25 µL de soro bovino fetal (20 mg/mL), 0,04 µL de SYBR Green, 2 µL de tampão 1X (50mM de KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0), 0,5 µL de Dimetil Sulfóxido e água ultra-pura para biologia molecular para completar o volume de 19 µL. Em cada capilar foi adicionado 19 µL desta mistura e 1 µL de cDNA das amostras. As condições das reações de PCR estão descritas na Tabela 1. Para análise dos resultados obtidos foi escolhido o método de quantificação relativa. Para isto foi utilizado o *software* REST (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl, 2002).

Tabela 1. Condição das reações de PCR para os sete genes analisados.

Genes	Concentração dos primers (pmol)	MgCl ₂ (mM)	Condições da Reação de PCR	
			Anelamento (°C/seg)	Extensão (°C /seg)
IL-2	2	3	57/ 7 seg	72/ 6 seg
IL-8	2,5	3	53/ 5seg	72/ 9 seg
IL-13	2,5	2,5	60/7 seg	72/9seg
Lisozima	2	2	60/ 7 seg	72/9seg
MCP-1	2,5	2,5	56/ 5 seg	72/ 12 seg
Pepsinogênio	2,5	2,5	60/ 7 seg	72/9seg
RPL-19	2,5	3,75	60/ 7 seg	72/ 16 seg

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostram que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na abundância de mRNA entre os grupos desafio experimental e controle, não sendo possível estabelecer quais são as principais citocinas que iniciam resposta imune à primeira infecção com parasitos do gênero

Haemonchus spp. Estes resultados não eram esperados, pois em estudos com outros parasitos de abomaso foi detectado aumento significativo no tamanho do abomaso (Gasbarre, 1997). Também, foi observado que no terceiro estágio larval, ou seja, no início da infecção, é detectada ampla proliferação de linfócitos (Gasbarre, 1997), que está diretamente relacionada com expressão de IL-2 e IL-13 (Janeway, 2007), a qual no presente trabalho apresentou probabilidade de aumento no grupo desafiado de 0,081. Assim, há principalmente duas explicações para estes resultados: uma, relacionada com a ampla variação entre indivíduos de ambos os grupos (Figura 1), pois apesar da raça Nelore ser considerada resistente, há variações genéticas individuais e outra, devido ao baixo número amostral. Desta maneira, mais dados ainda são necessários procurando obter um maior esclarecimento do padrão de resposta imune desses bovinos.

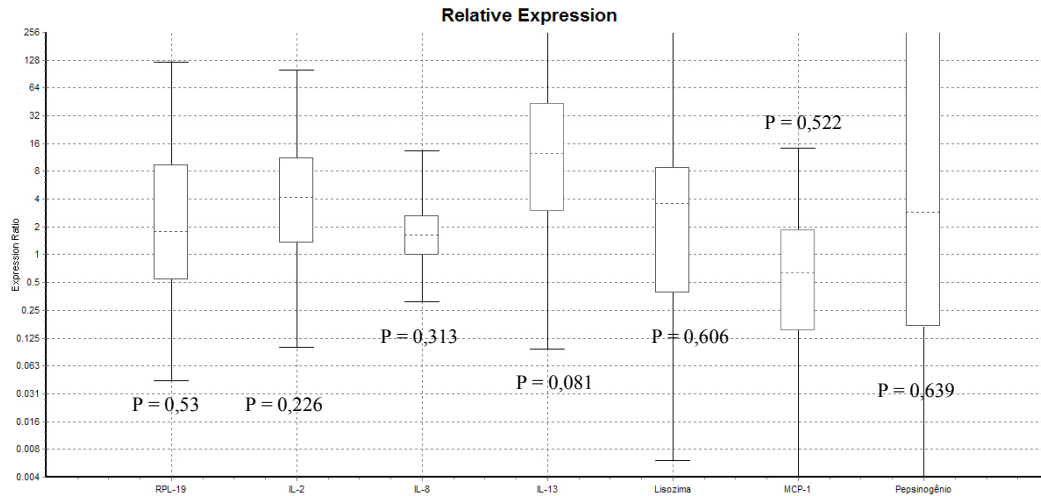


Figura 1. Razão obtida das abundâncias de mRNA nos abomasos dos grupos desafio experimental e controle e probabilidades associados ao teste de significância

Conclusões

Não foi possível detectar diferenças na abundância de mRNA para genes relacionados a resposta imune para o tecido analisado e no intervalo de tempo da infecção.

Agradecimentos

Os autores agradecem a EMBRAPA e CAPES pelo auxílio financeiro; à Dr^a Lilian Giotto Zaros, ao Dr. Ivo Bianchini, pesquisador da EMBRAPA Gado de Corte, pelo fornecimento da cepa de *Haemonchus* spp e aos pesquisadores da EMBRAPA Pecuária Sudeste, Dr. Rogério Taveira Barbosa e Dr. Rui Machado, pelo acompanhamento dos animais durante o experimento.

Literatura citada

- ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 117 – 122, 1998.
- GASBARRE, L.C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminante immune system. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 327 – 343, 1997.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6ed. Porto Alegre:Artmed, 2007. 848p.
- PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLÉ, 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, p. 1-10, 2002.
- SONSTEGARD, T.S.; GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 387 – 403, 2001.