

IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA IMMUNE EM TECIDO DE PELE DE BOVINO INFESTADO COM CARRAPATOS (*BOOPHILUS MICROPLUS*)

Vanessa de Almeida Belo¹; Robert Domingues²; Karla Julião Villani³; Marco Antônio Machado⁴

1-Estudante de Mestrado em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora; E-mail: vanessaabelo@yahoo.com.br

2-Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora

3-Estudante do Curso de Biomedicina da Universidade Presidente Antônio Carlos

4-Pesquisador da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora.

Palavras Chaves: Bovino, Carrapato, Tecido de Pele, RNA, cDNA, IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10 e TLR-2.

INTRODUÇÃO

Recentes estudos têm mostrado a importância de fatores genéticos ligados a resistência a carrapato em bovinos (Mattioli *et al.*, 2000) e que as citocinas têm um papel crítico na prevenção ou progressão de doenças (Konnai *et al.*, 2003). Estudos que analisam o seu padrão de expressão e dos genes que elas influenciam são críticos para a compreensão de resistência e desenvolvimento de vacinas contra muitos patógenos.

Estudos sugerem que a resistência a carrapatos esteja relacionada à resposta imune mediada por linfócitos Th1 e a susceptibilidade por linfócitos Th2. Portanto, o estudo de genes que codificam citocinas produzidas por estes linfócitos que determinam a imunidade celular ou humoral são importantes no entendimento dos mecanismos de resistência. Deste modo, o nível de expressão de IL-2 e TNF- α , relacionados à resposta do tipo Th1, assim como IL-4 e IL-10 que apresentam perfil Th2 em tecido de pele são importantes no entendimento dos mecanismos imunes que determinam a resistência ou susceptibilidade de um animal.

Outro aspecto importante nos estudos de resistência e susceptibilidade a doenças diz respeito aos mecanismos relacionados a imunidade inata. Esta constitui a primeira linha de defesa contra organismos invasores, reconhecendo-os e produzindo citocinas, que não apenas induzem inflamação, mas também ativam as células B e T. Os macrófagos são células efetoras da imunidade inata que reconhecem e respondem moléculas associadas a patógenos via TLRs (Doyle *et al.*, 2006).

Em vista da importância da resposta imune inata, estudos que analisam o padrão de expressão de TLRs tornam-se fundamentais, visto que estes são os responsáveis pelo reconhecimento dos

antígenos disparando vias de sinalização para produção de citocinas. Dentre os TLRs conhecidos, o TLR-2 reconhece produtos provenientes de fungos e protozoários, sendo o protozoário do gênero *Babesia* responsável por uma das principais enfermidades que acometem os bovinos denominada babesiose, na qual os carrapatos atuam como vetores. Desse modo, o estudo da expressão de TLR-2 pode ajudar a elucidar os mecanismos imunes relacionados à resistência a carrapatos.

Portanto, o presente estudo busca preliminarmente identificar a expressão dos genes mencionados acima visando aplicações em análises de expressão por PCR em Tempo Real.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de RNA total

A biópsia de pele do animal foi coletada após anestesia local, etiquetada, imersa em RNAlater e armazenada a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do RNA. Para proceder à extração, a amostra de tecido foi removida do RNAlater e o excesso de líquido drenado usando um fórceps. A seguir, foi separado aproximadamente 150 mg do tecido que foi rompido e homogeneizado utilizando o aparelho TissueRuptor (Qiagen) na presença de tampão de lise durante 15-90 segundos. Após o preparo da amostra, foi extraído RNA total utilizando RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit da Qiagen respeitando as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Gene Quant pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) a 260 nm e sua integridade verificada em gel de agarose 2% (v/v). Para verificar a presença de contaminação, principalmente por proteínas, observa-se a relação A_{260}/A_{280} , que deve estar entre 1.8 e 2.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix, seguindo as orientações do fabricante. O cDNA produzido foi quantificado e armazenado a -70°C até o momento da reação de PCR.

PCR dos genes IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10 e TLR-2, GAPDH, 18SrRNA e β -actina

Os primers utilizados neste estudo foram sintetizados pela empresa Prodímol Biotecnologia.

Tabela 1 – Sequências dos primers forward e reverse de cada gene e suas respectivas referências.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
IL-2	F	GGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAA	Leutenegger et al., 2000
	R	GCACTTCCTCTAGAAGTTTGAGTTCTT	
IFN-gama	F	TGGATACATCAAGCAAGACATGTT	Leutenegger et al., 2000
	R	ACGTCATTCATCACTTTCATGAGTTC	
TNF-alfa	F	TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGT	Leutenegger et al., 2000
	R	CCATGAGGGCATTGGCATAAC	
IL-10	F	CCAAGCCTTGTCGGAAATGA	Moussay et al., 2006
	R	GTTACACGTGCTCCTTGATGTCA	
IL-4	F	CATGCATGGAGCTGCCTGTA	Waldvogel et al. 2000
	R	AATTCCAACCCTGCAGAAGGT	
TLR-2	F	GGCAACAGAGACCTGCAGAG	Doyle et al., 2006
	R	ACTTTCATCGGTGAATTCGAC	
GAPDH	F	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	Leutenegger et al., 2000
	R	CCCTCCACGATGCCAAAGT	
β -actina	F	AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT	Robinson et al., 2007
	R	ATCCAACCGACTGCTGTCA	
18S rRNA	F	GTAACCCGTTGAACCCCAT	Robinson et al., 2007
18S rRNA	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

Para estudos de expressão são utilizados genes constitutivos para normalização das amostras. Tais genes devem ter expressão em todos os tecidos e em todas as fases do desenvolvimento e não devem ser afetados pelo tratamento experimental. O genes mais utilizados para esta finalidade são genes da β -actina, gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase (GAPDH) e 18SrRNA (Ginzinger *et al.*,2002) sendo estes, também avaliados neste estudo.

Foram testadas 4 quantidades de cDNA para cada gene, sendo elas: 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400ng. Para as reações de PCR foram utilizados 200 nM de primer, 1X de tampão PCR, 0,2 nM de dNTPs e 0,03 U/uL de Taq DNA polimerase totalizando um volume final de 25uL. A condição de ciclagem foi: desnaturação inicial a 95° Cpor 3 min seguida de 40 ciclos (95°C por 10 seg e 55°C por 45 seg) realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems.

A corrida eletroforética dos produtos de PCR foram feitas em gel de Poliacrilamida 8% para os genes IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10, GAPDH, 18SrRNA e β -actina e em gel de Agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para o gene TLR2.

RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO

Todos os genes estudados foram expressos na pele de bovino infestado com carrapato, embora o gene IL-10 tenha apresentado uma amplificação muito fraca (Figura 1). Estudo de Wikel *et* (1997) demonstrou que a alimentação do carrapato induz a produção de citocinas em hospedeiros

infestados. Outros trabalhos têm demonstrado que o carrapato parece modular a resposta imune do hospedeiro induzindo preferencialmente resposta mediada por linfócitos TH2 com produção de citocinas IL-4 e IL-10 (Nakata *et al.*, 2006; Wikel e Chaidez, 2001; Scholer e Wikel, 2001). Em nosso estudo não é possível fazer tal avaliação comparativa pois a PCR dos genes apresentam eficiências diferentes e produtos de PCR inespecíficos.

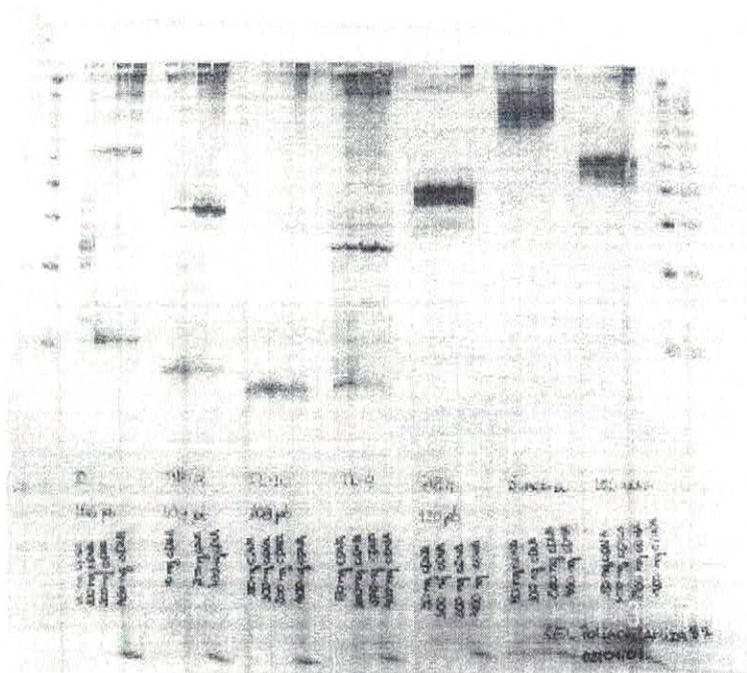


Figura 1 Gel de Poliacrilamida 8% para os genes IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10, GAPDH, 18SrRNA e β -actina.

O gene IL-2 apresentou produtos de PCR inespecíficos, sendo verificado produto de PCR referente ao gene (banda de 165 pb) em todas as quantidades de cDNA testadas, no entanto, foi observado uma amplificação menor em 50 ng de cDNA, uma vez que a intensidade da banda foi menor. Esta observação é válida, também, para o gene TNF- α , que apresentou uma amplificação menor em 50 ng e 100ng de cDNA. A PCR para o gene TNF- α apresentou uma especificidade maior quando comparado ao gene IL-2, porém podem ser verificados produtos inespecíficos. A presença destes em análises de expressão por PCR em tempo real utilizando corantes inespecíficos pode superestimar os resultados de expressão.

O gene IL-10 apresentou bandas muito fracas em todas as quantidades de cDNA testadas. Foi observado uma possível banda bem definida para o gene IL-4. Os controles endógenos GAPDH, 18SrRNA e β -actina apresentaram bandas muito fortes, este resultado é esperado, uma vez que estes são constitutivos, sendo expressos em todas as células (FIGURA 1).

Para o gene TLR2 foi observado uma única banda (600 pb) referente ao gene, sendo a PCR para este gene utilizando as condições mencionadas acima específica. Não houve produto de amplificação utilizando 50 ng de cDNA (FIGURA 2).

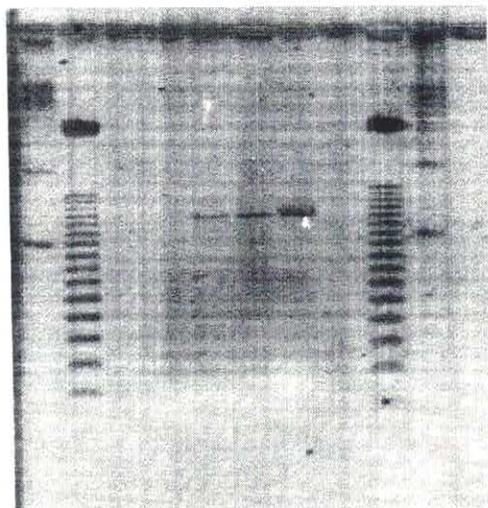


Figura 2 Gel de Agarose 1,5% para o gene TLR2

CONCLUSÃO

Embora o trabalho esteja na sua fase preliminar, este foi importante para demonstrar a expressão de vários genes de citocinas envolvidas nos mecanismos imunológicos locais do hospedeiro. Estudos que avaliem o perfil de expressão por PCR em Tempo Real podem ajudar a esclarecer aspectos da modulação da resposta imune pelo carrapato, sendo imprescindível a otimização da PCR visando aumento da eficiência e especificidade da reação a fim de obter repetibilidade e confiabilidade dos resultados.

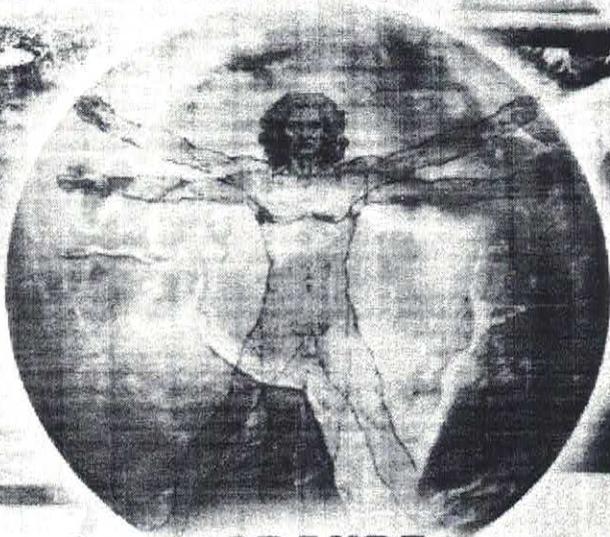
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOYLE, S.L. e O'NEIL L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical Pharmacology**, 2006.
- GINZINGER, D. G. Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR: An Emerging Technology Hits the Mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.
- KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. The Rapid Quantitative Analysis of Bovine Cytokine genes by Real-Time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 283–294, 2003.
- LEUTENEGGER, C. M.; ALLUWAIMI A. M.; SMITH, W. L.; PERANI, L. e CULLOR, J. S. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan

- polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 275-287, 2000.
- MATTIOLI, R. C.; PANDEY, V. S.; MURRAY, M; FITZPATRICK, J. L. Immunogenetic Influences on Tick Resistance in African Cattle with Particular Reference to Trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and Trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) Cattle. **Acta Tropica**, v. 75, p. 263–277, 2000.
- MOUSSAY E.; STAMM I.; TAUBERT A.; BALJER G. e MENGE C. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 367-382, 2006.
- NAKATA, L.G.; ZAROS, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; COUTINHO, L.C.A.; REGITANO, L.C. Quantitative analysis of bovine cytokine mRNA levels in response to tick infestation. In: 8th WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, C1530, 2006. Belo Horizonte , Anais..., p.136, 2006.
- ROBINSON T. L.; SUTHERLAND I.A. e SUTHERLAND J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 160-165, 2007.
- SCHOELER, G. B.; WIKEL, S.K. Modulation of hosts immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 95, p. 755-771, 2001.
- WALDVOGEL A.S.; HEDIGER-WEITHALER B.M.; EICHER R.; ZAKHER A.; ZARLENGA D.S.; GASBARRE L.C. e HEUSSLER V.T. Interferon-gama and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 201-212, 2000.
- WIKEL, S. K; ALARCON-CHAIDEZ, J. F. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 275-287, 2001.
- WIKEL, S.K. Tick host immunology: significance advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, v. 13, no.10, 1997.

XXX SEMANA DE BIOLOGIA

O MUNDO SE TORNOU PEQUENO PARA VOCÊ



MAS VOCÊ NÃO É GRANDE PARA O MUNDO

- > XIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA
- > V FEIRA MUNICIPAL DE CIÊNCIAS
- > II MOSTRA DE PALEOBIODIVERSIDADE
- > MINI-CURSOS

> CICLO DE PALESTRAS:

- BIOCORATIVEL
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CORREDORES ECOLÓGICOS
- AQUECIMENTO GLOBAL
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO ALTP
- PROTOCOLO DE KYOTO

INSCRIÇÕES: a partir de 01 de outubro
no DA de Biologia ICB - UFJF

ESPAÇOS: semanabio2007@gmail.com
Tel.: 35297442/35148895/35364606/39462812

APÓIC



ICB
Instituto de Ciências Biológicas
Município de Juiz de Fora

bio
E.C.O.L.A.

Ministério da Educação
Departamento de Políticas de Ensino Superior

REALIZAÇÃO:



71