



Perfil da expressão dos genes *IL-4* e *IFN-γ* em células do leite de vacas da raça Gir Leiteiro saudáveis e com mastite clínica¹.

Isabela Fonseca², Priscila Vendramini Silva³, Simone E. F. Guimarães⁴, Paulo Sávio Lopes⁴, Carla Christine Lange⁵, Marta F. M. Guimarães⁵

¹ Financiado pela CAPES, FAPEMIG, CNPq e FINEP

² Bolsista da FAPEMIG. e-mail: isabelasri@hotmail.com

³ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento – UFV. Bolsista da CAPES. e-mail ; priscilavendra@yahoo.com.br

⁴ Departamento de Zootecnia – UFV. e-mail: sfacioni@ufv.br

⁵ Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. e-mail: mmartins@cnpgl.embrapa.br

Resumo: Na produção animal, dentre os problemas de sanidade, as doenças infecto-contagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite uma das principais doenças. Uma das opções mais promissoras 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. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão dos genes *IL-4* e *IFN-γ* em células do leite de vacas saudáveis e com mastite clínica. Para tanto, foi extraído RNA total de células presentes no leite de dois grupos de animais da raça Gir, um grupo livre de infecção e outro com mastite clínica. A análise de expressão dos genes *IL-4* e *IFN-γ* foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real. Apesar de não significativo ($P>0,05$), as vacas com mastite expressaram 8,27 vezes menos *IL-4* e 2,29 vezes mais *IFN-γ* que as vacas sadias. A *IL-4* possui ação antagonônica ao *IFN-γ* e sua principal função é estimular a resposta imune humoral, já o *IFN-γ* estimula a produção de linfócitos Th_1 , estimulando assim a resposta imune celular. Os resultados sugerem que estes animais estejam desenvolvendo preferencialmente resposta imune mediada por células, porém mais estudos são necessários para que o perfil de expressão gênica em animais da raça Gir seja melhor caracterizado e compreendido, já que não há estudos desta natureza em zebuínos.

Palavras-chave: citocina, expressão gênica, resposta imune, RT-PCR

Gene expression profile of *IL-4* and *IFN-γ* on milk cells from Dairy Gyr cows healthy and with clinical mastitis

Abstract: Among health problems in livestock production, infectious contagious diseases are those that stand out most being mastitis one of the main disease conditions. One of the most promising ways to reduce problems caused by infectious contagious diseases, besides sanitary control, is the selection of resistant animals, in order to incorporate this trait within the herd. Therefore, the objective of the present work was to characterize the genetic expression of *IL-4* and *IFN-γ* on milk cells from cows with and without clinical mastitis. Thus, the total RNA was extracted from milk cells and analyzed through real-time quantitative PCR technique. Despite no statistically different ($P>0.05$), the *IL-4* gene had the lowest expression in mastitis animals (8.27 times) and higher expression of *IFN-γ* when compared to healthy cows (2.29 times). The *IL-4* acts as an antagonist to *IFN-γ* and one of its main functions is stimulate humoral immune response, already the *IFN-γ* stimulated Th_1 lymphokine production, thus stimulating the cellular immune response. These results suggest that these animals are developing preferential immune response mediated by cells, but further studies are necessary to a better characterizing and understanding of gene expression profile in Dairy Gyr animals, since there are not enough studies with Zebu cattle.

Keywords: cytokine, gene expression, immune response, RT-PCR

Introdução

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro, porém ainda há vários entraves que precisam ser resolvidos para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor. Dentre os problemas de sanidade, as doenças infecto-contagiosas são as que mais se destacam, sendo que a mastite é a principal doença no aspecto econômico. Como prejuízo para a atividade pode-se citar a redução da produtividade e a baixa qualidade dos produtos lácteos, quando

analisados os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos, aumento dos custos com a mão-de-obra, tratamento dos animais e descarte do leite.

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, já que dificilmente serão produzidas vacinas efetivas devido a grande variedade de microrganismos causadores de mastite (Detilleux et al., 1994). Estudos com a finalidade de melhor compreender os processos biológicos envolvidos na determinação das respostas de resistência às doenças são fundamentais na resolução de problemas e desenvolvimento de soluções tecnológicas.

As raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na composição da pecuária brasileira, representando cerca de 80% do rebanho bovino efetivo nacional. A raça Gir Leiteiro exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, além de ser eficiente na produção de leite a baixo custo (Ferreira et al., 2007).

A resposta de resistência à mastite é uma característica complexa e os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos. A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina anti-inflamatória, expressa em linfócitos com função antagonista ao interferon-gama (IFN- γ), estimulando a diferenciação de LTh₀ em LTh₂. A proteína IFN- γ é produzida pelas células CD4⁺/CD8⁺ e células *natural killer* (NK) em resposta à presença de estímulo mitogênico e antigênico. Ela aumenta a capacidade fagocitária de neutrófilos recrutados para a glândula mamária (Nonnecke et al., 2003). Por isso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão dos genes *IL-4* e *IFN- γ* em células do leite de vacas da raça Gir Leiteiro saudáveis e com mastite clínica.

Material e Métodos

Foram utilizadas seis vacas PO da raça Gir Leiteiro (*Bos indicus*) provenientes de uma fazenda comercial localizada em São Pedro dos Ferros (MG). Os animais foram divididos em dois grupos com três animais cada: um grupo livre de infecção (S) e outro composto por vacas com mastite clínica (M). Para cada uma das vacas foram coletados 150 mL de leite em tubos estéreis e todos os animais passaram por exame clínico do úbere e teste da caneca antes da coleta das amostras. As amostras de leite das vacas com mastite foram coletadas imediatamente após o aparecimento dos sinais clínicos e antes do tratamento com medicamentos, portanto não houve infecção artificial das vacas em questão, além disso as amostras foram submetidas à exames microbiológicos no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite.

O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante. A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o *Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen) e as concentrações médias do cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria e então o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na reação de PCR em Tempo Real. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o kit *SYBR Green® PCR Master Mix* (BioRad), 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 seqüências obtidas do banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Como referência endógena foi utilizado o gene desidrogenase 3-fosfato gliceraldeído (*GAPDH*) 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 (10, 100 e 200 ng/ μ L) e três diluições de *primer* (100, 200 e 400 nM). Após a determinação das melhores condições para a reação de PCR, foi construída uma curva padrão para cada gene, 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 Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems), sendo cada amostra amplificada separadamente. Os dados obtidos durante a reação de PCR em Tempo Real, gerados pelo equipamento, foram analisados pelo programa REST[®] (Pfaffl et al., 2002), disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification> 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 aproximadamente iguais (dados não mostrados) e, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes aos dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos para nenhum gene alvo e nem para o controle endógeno.

Para o gene *IL-4* e *IFN- γ* foram utilizados 400 nM de *primer* e 200 ng/ μ L de cDNA, já para o controle endógeno foram utilizados 100 ng/ μ L de cDNA e 400 nM de *primer*.

O exame microbiológico do leite coletado indicou que uma das vacas Gir Leiteiro teve a infecção causada por *Klebsiela pneumoniae*, porém, para as demais, não foi possível fazer o isolamento da cultura, pois eram vários os agentes causadores. 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 (com e sem mastite), como pode ser observado na Tabela 1.

Apesar de não significativo ($P > 0,05$), as vacas com mastite expressaram 8,27 vezes menos *IL-4* que as vacas sadias. A *IL-4* possui ação antagonista ao *IFN- γ* e sua principal função é regular as respostas imunes mediadas pela IgE, além de estimular a diferenciação de linfócitos Th_0 em Th_2 , ou seja, estimular a resposta imune humoral. Por outro lado, houve uma tendência do gene *IFN- γ* se expressar 2,29 vezes mais em animais com mastite em comparação aos animais hígidos ($P > 0,05$). O *IFN- γ* está associado à conversão de linfócitos Th_0 em linfócitos Th_1 , ativação de macrófagos e neutrófilos, além de potencializar a ação do fator de necrose tumoral (*TNF- α*). Portanto, esta citocina está relacionada ao perfil de resposta imunológica Th_1 , ou seja, resposta imunológica do tipo celular. Além disso, a deficiência de *IFN- γ* está associada à maior susceptibilidade a infecções por microrganismos intracelulares. Apesar da diferença de expressão não significativa, os resultados sugerem que os animais com mastite estejam desenvolvendo preferencialmente resposta imune mediada por células.

Estes resultados podem ser devido ao fato de que a resposta imunológica pode diferir de acordo com o tipo de bactéria e com o hospedeiro, já que existe muita variação individual. Segundo Lahouassa et al. (2007) as respostas diferenciadas dos hospedeiros implicam em vias de ativação alternativas ou em diferentes níveis de transdução de sinais, refletindo o que é observado *in vivo*.

Mais estudos são necessários para que o perfil de expressão gênica em animais com mastite, principalmente da raça Gir Leiteiro, seja melhor caracterizado e compreendido, já que não há estudos desta natureza em zebuínos, não sendo possível realizar nenhum tipo de comparação destes resultados com os de outros autores. Além disso, o Gir Leiteiro tem grande importância não só como raça pura e material genético selecionado para produção leiteira nas condições tropicais do Brasil, mas também tem sido muito utilizada em cruzamentos com raças de clima temperado, com a finalidade de combinar a alta produção do gado europeu com a adaptabilidade das raças zebuínas ao estresse térmico, doenças, baixa qualidade dos alimentos e manejo inadequado (Martinez et al., 1988).

Conclusões

A mastite é uma doença multifatorial e influenciada por muitos genes, portanto mais estudos são necessários para que o perfil de expressão gênica em animais da raça Gir seja melhor caracterizado e compreendido, já que não há estudos desta natureza em zebuínos. Estes estudos podem ajudar a entender como ocorrem as reações imunológicas em resposta à mastite, e que afeta de maneira significativa a qualidade e a produção de leite.

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.

FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; LEDIC, I.L. et al. Características reprodutivas de touros da raça Gir. *Revista Gir Leiteiro*, n.7, p.30-38, 2007.

LAHOUSSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P. et al. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, v.38, p.12-21, 2007.

MARTINEZ, M.L.; LEE, A.J.; LIN, C.Y. Age and Zebu-Holstein additive and heterotic effects on lactation performance and reproduction in Brazil. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.800-808, 1988.

NONNECKE, B.J.; KIMURA, K.; GOFF, J.P. et al. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows, *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2359-2368, 2003.

PFÄFFL, 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.