



Expressão relativa da *IL-10* em células do leite de vacas holandesas saudáveis e com mastite clínica¹

Priscila Vendramini Silva², Isabela Fonseca³, Simone E. F. Guimarães⁴, Marta F. M. Guimarães⁵, Nicola Vergara Lopes Serão⁶, Marcos Soares Lopes⁷

¹ Financiado pela CAPES, FAPEMIG, CNPq e FINEP

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento – UFV. Bolsista da CAPES. e-mail: priscilavendra@yahoo.com.br

³ Bolsista da FAPEMIG. E-mail: isabelasri@hotmail.com

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

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

⁶ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento – UFV. Bolsista da CAPES. e-mail: ninicorj@yahoo.com.br

⁷ Estudante de graduação em zootecnia – UFV. e-mail: marcosmsl@yahoo.com.br

Resumo: Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite, foi realizada a quantificação de expressão relativa do gene *IL-10* em células presentes no leite de fêmeas bovinas com e sem mastite clínica da raça Holandesa por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Foram avaliados seis animais, sendo três com mastite e três sem mastite, utilizando-se o gene GAPDH como controle endógeno. O RNA total foi extraído a partir de células presentes no leite e usado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA. Os animais com mastite expressaram 35,66 vezes mais *IL-10* que os animais sem a infecção ($p < 0,001$) sugerindo que esse gene pode ser indicado como marcador para a mastite, para tanto deverão ser buscados polimorfismos de nucleotídeos únicos em sua estrutura de DNA para melhor caracterizá-lo como marcador.

Palavras-chave: expressão gênica, PCR em tempo real, resposta imune

Relative expression of *IL-10* on milk cells from Holstein cows with and without clinical mastitis

Abstract: In order to understand the mechanisms of immune response on mastitis resistance/susceptibility phenotype, it was quantified the relative expression quantification of *IL-10* gene on milk cells from Holstein cows with and without clinical mastitis through quantitative real time PCR technique (qPCR). Six animals were evaluated, being three with clinical mastitis and three without it, using GAPDH as endogenous control. Total RNA was extracted from milk cells and used as template for first strand cDNA synthesis. Animals with mastitis expressed 35.66 times more *IL-10* than animals without infection ($p < 0001$), suggesting that this gene may be a candidate as marker for mastitis, therefore single nucleotide polymorphism should be searched in DNA structure to characterize it.

Keywords: gene expression, real time PCR, immune response

Introdução

A mastite é uma das principais doenças infecto-contagiosas que acometem os rebanhos bovinos refletindo na baixa produtividade e qualidade dos produtos lácteos, com aumento nos custos de tratamento dos animais e no descarte do leite, podendo resultar na morte do animal.

A mastite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas, ou mais frequentemente microorganismos patogênicos ambientais ou contagiosos (Oviedo-Boyso et al., 2006). Uma estratégia para redução da incidência da mastite além do controle sanitário é o estudo de genes candidatos envolvidos nos mecanismos de resposta imune. Nesse sentido, um dos principais candidatos seria o gene da *IL-10* (interleucina-10). A *IL-10* é uma interleucina anti-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados e linfócitos T helper 2 (LTh₂), responsáveis por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-2) pelos macrófagos (Belardelli, 1995).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil de expressão da *IL-10* em células presentes no leite de vacas livres da infecção na glândula mamária e com mastite para melhor entendimento da fisiologia e patogenicidade da mastite visando à seleção de genes candidatos que possam ser incorporados em programas de melhoramento genético.

Material e Métodos

Foram utilizadas seis vacas PO da raça Holandesa Preto e Branco – PB (*B. taurus*) provenientes da Fazenda São Bento, localizada no Distrito São Venâncio, Coimbra (MG). Os animais foram agrupados como saudáveis ou com mastite com base no exame clínico do úbere (palpação) e pelo teste da caneca, com três animais em cada grupo. Foram coletadas três amostras de 50 mL de leite em tubos esterilizados, para cada uma das vacas.

O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) segundo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria e sua integridade verificada em gel de agarose. A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A análise de expressão do gene *IL-10* foi feita por meio da metodologia de PCR em Tempo Real usando o sistema de detecção SYBR Green® PCR Master Mix (BioRad, Hercules, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O par de *primer* utilizado para avaliar a expressão gênica foi desenhado no usando o programa Primer Express (*Applied Biosystem*) a partir de seqüências obtidas do banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cada reação continha o PCR Master Mix, o cDNA usado como molde e o par de *primer* totalizando o volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada no *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e consistiu nos seguintes passos: 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Ao final da amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação para verificar a presença de produtos inespecíficos e/ou dímeros de *primers*. O gene desidrogenase 3-fosfato gliceraldeído (GAPDH) foi utilizado como referência endógena.

Após 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. Para isso, diluições de cDNA foram amplificadas em duplicatas para a obtenção da curva padrão e cálculo da eficiência para o par de *primer* por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$, onde E é a eficiência da reação. Os dados obtidos foram expressos na forma de valores de Ct (*cycle threshold*) e a quantificação relativa foi baseada no método descrito por Pfaffl et al. (2001). A análise de expressão foi realizada por meio do programa REST® (Pfaffl et al., 2002), disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification> que utiliza o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

Os exames microbiológicos indicaram que as três vacas holandesas que apresentaram mastite tinham como agente causador a bactéria *Streptococcus spp.*, facilitando a análise comparativa, pois há um indicativo de que uma mesma resposta imunológica foi ativada, reduzindo erros devido à variação individual.

As reações de amplificação do gene da *IL-10* foram feitas com 100 ng/µL de cDNA e 200 nM de *primer*. A eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno foram calculadas e consideradas equivalentes (dados não mostrados). Não foram observados picos de amplificação referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos para o gene alvo e para o controle endógeno.

Os resultados de expressão relativa foram normalizados pela referência endógena e as médias de Cts, desvios-padrão e CV do gene *IL-10* podem ser observados na Tabela 1. Os animais com mastite expressaram 35,66 vezes mais *IL-10* que os animais sem mastite ($p < 0,001$). A *IL-10* é uma citocina anti-inflamatória e estudos demonstraram que ela é capaz de inibir células *Natural Killer* (Barraal-Neto et al., 1995) e a síntese de *IL-1* e TNF- α por macrófagos. Os resultados apresentados estão de acordo com os apresentados por Riollot et al. (2001) em que animais com mastite crônica causada por *S. aureus* tiveram maior expressão de *IL-10* em células do leite que animais saudáveis.

Tabela 1 - Número de animais (n), média dos Cts (AvgCt) e expressão relativa para o gene da *IL-10* em cada grupo de animais.

Gene	Grupo de Animais	n	AvgCt	Expressão relativa
IL-10	SM	3	33,14	1,00
	CM	3	29,81	35,66

SM = vaca sem mastite; CM = vaca com mastite;

Conclusões

O gene da *IL-10* foi mais expresso em vacas com mastite sugerindo sua utilização como marcador ou indicador para mastite. Nesse sentido, deverão ser buscados polimorfismos de nucleotídeos únicos em sua estrutura de DNA para a melhor caracterizá-lo como marcador.

Novos estudos deverão incluir outros genes envolvidos na resposta de resistência à mastite em maior número de animais com controle do tempo de inoculação de cepas de bactérias específicas, a fim de compreender melhor os mecanismos de resposta imune.

Literatura citada

BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A; BRODSKY, C.; CARVALHO, E.M. e REED, S.B. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.17, p. 21-28, 1995.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.103, p.161-179, 1995.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.9 e45. 2001.

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.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-A GUIRRE, V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, v.54, p.399-409, 2006.