



Análise da expressão de *IL-6* e *IL-8* em células do leite de vacas sadias e com mastite¹

Marta Fonseca Martins Guimarães², Isabela Fonseca³, Daisyléa de Souza Paiva⁴, Gustavo Resende Antunes⁴, Gertrude Averil Baker Thompson⁵

¹Financiado pela FAPEMIG

²Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora (MG). E-mail: mmartins@cnppl.embrapa.br

³Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. E-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

⁴Alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica - UFJF. E-mail: daisyufjf@gmail.com, guto1982@gmail.com

⁵Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal. E-mail: gat1@mail.icav.up.pt

Resumo: Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite, foi realizada a caracterização da expressão dos genes *IL-6* e *IL-8* em células presentes no leite de vacas mestiças com e sem mastite clínica por meio da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real. Foram avaliados 34 animais, sendo 17 com mastite e 17 sem mastite. O RNA total foi extraído a partir de células presentes no leite e usado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA. Não houve diferença estatística entre os grupos de animais ($P>0,05$) para os genes alvos deste estudo, mas foi possível observar uma tendência dos animais com mastite expressarem menos *IL-6* e *IL-8* que os animais sem a infecção. Deste modo, mais estudos são necessários para melhor entendimento da fisiologia e patogênese da mastite em animais mestiços, já que não há estudos desta natureza.

Palavras-chave: expressão gênica, gado mestiço, PCR em Tempo Real

Analysis of *IL-6* and *IL-8* expression on milk cells from healthy and mastitis cows

Abstract: In order to understand the immune response mechanisms associated with mastitis resistance/susceptibility phenotype, the characterization of *IL-6* and *IL-8* gene expression in milk cells from mestizo cows with and without clinical mastitis using Real Time PCR technique was performed. Thirty four animals were evaluated, where 17 presented clinical mastitis and 17 did not. Total RNA was extracted from milk cells and used as template to cDNA's first strand synthesis. There were not significant statistical differences between the different cluster ($P>0,05$) for the genes studied. However *IL-6* and *IL-8* expression showed a trend to be lower in mastitis cows in comparison to healthy animals. Thus, more studies have to be conducted for a better understanding of the physiology and pathogenesis of mastitis in mestizo cattle, since there is not this type of studies using this breed.

Keywords: gene expression, mestizo cattle, Real Time PCR

Introdução

A mastite bovina é a doença de maior incidência nos rebanhos bovinos no mundo, mesmo naqueles rebanhos que adotam programas de controle. As conseqüências mais sérias são as consideráveis perdas econômicas acarretadas pela diminuição da qualidade e da quantidade do leite, o aumento nos custos de tratamento e dos serviços veterinários, e nos casos clínicos, no descarte de toda a produção de leite do animal ou até mesmo na morte do mesmo (Schutz, 1993).

A mastite é uma doença complexa definida pela inflamação da glândula mamária que se desenvolve como resposta a patógenos que penetram no tecido da glândula mamária através do canal do teto e se multiplicam dentro de suas cisternas (Oviedo-Boयो et al., 2006). A resposta inflamatória pode ser causada também por fatores químicos, físicos ou traumáticos. A mastite é considerada uma doença multifatorial, em que fatores de risco relacionados com o hospedeiro (condições fisiológicas e genéticas), o microrganismo causal e o ambiente contribuem para a ocorrência da doença (LeBlank et al., 2006).

Devido ao grande número de vias metabólicas, de moléculas e de células, atuando na característica de resistência, esta doença torna-se muito complexa, pois depende de componentes genéticos e também de fatores ambientais e fisiológicos. A maioria dos estudos sobre resistência à mastite focaliza o fenótipo de CCS (contagem de células somáticas) no leite e mastite clínica para inferir sobre o genótipo de resistência. Como a resposta de resistência é uma característica complexa, diversos genes podem estar envolvidos na determinação desta função.

A busca de maior produtividade dos bovinos sustenta-se, principalmente, na saúde animal, no melhoramento genético e na alimentação adequada. A adaptação dos animais frente à diversidade de ambientes vem sendo buscada por programas de cruzamentos de raças diferentes ou de subespécies diferentes (*Bos taurus* e *Bos indicus*), na obtenção de um equilíbrio entre a produção e a adaptabilidade, cujos componentes são relacionados negativamente (Conceição Jr., 1997). Neste sentido, a identificação dos genes responsáveis por conferir resistência à mastite e o seu posterior emprego em programas de melhoramento genético constitui abordagem efetiva para o incremento genético da resistência a esta doença, com aumento de produtividade e competitividade da pecuária leiteira. Os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos, por isso o objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil de expressão dos genes *IL-6* (Interleucina 6) e *IL-8* (Interleucina 8) em células presentes no leite de vacas mestiças livres da infecção na glândula mamária e com mastite. Este estudo pode contribuir para um melhor entendimento da fisiologia e patogenicidade desta doença, visando à seleção de genes candidatos que possam ser incorporados em programas de melhoramento genético.

Material e Métodos

Foram utilizadas 34 vacas mestiças provenientes do Campo Experimental de Santa Mônica da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Valença (RJ). Os animais foram agrupados como hígdidos ou com mastite com base no exame clínico do úbere (palpação) e pelo teste da caneca, com 17 animais em cada grupo. Para cada uma das vacas foram coletadas quatro amostras de 50 mL de leite em tubos esterilizados, os quais foram transportados em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora (MG).

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 (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, DE, EUA), verificado a qualidade em gel de agarose e 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 dos genes *IL-6* e *IL-8* foi feita por meio da metodologia de PCR em Tempo Real usando o sistema de detecção *SYBR Green® PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 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>). 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 7300 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), 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.

Antes da quantificação da expressão gênica foram testadas as concentrações de *primer* e de cDNA que permitiram a melhor eficiência tanto para o gene alvo quanto para o 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. As reações de amplificações foram feitas em duplicatas para todos os genes em placas ópticas seladas com filme adesivo óptico. Os dados obtidos foram expressos na forma de valores de C_t (*cycle threshold*) e a quantificação relativa foi baseada no método descrito por Pfaffl et al. (2002). A análise de expressão foi realizada por meio do programa REST[®] 2008 versão 2.0.7, disponível em <http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html> que utiliza o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

As reações de amplificação do gene *IL-6* foram feitas com 600 nM de *primer* e 400 ng/reação de cDNA, para os genes *IL-8* e *GAPDH* foram 200 nM de *primer* e 200 ng/reação de cDNA. A eficiência de amplificação dos genes alvos 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 nenhum gene analisado. Os resultados de expressão relativa dos genes e as médias de C_t s podem ser observados na Tabela 1, sendo a taxa de expressão relativa normalizada pela referência endógena.

Tabela 1 - Número de animais (n), média dos Cts (AvgCt), expressão relativa para os genes *IL-6* e *IL-8* em cada grupo de animais e temperatura de dissociação (TD) para cada *primer*.

Gene	Grupo de animais	n	AvgCt	Expressão Relativa*	TD
<i>IL-6</i>	SM	17	39,43		
	CM	17	38,91	-1,9	75,4°C
<i>IL-8</i>	SM	17	27,86		
	CM	17	26,47	-1,1	76,7°C

SM = vaca sem mastite; CM = vaca com mastite

*Expressão relativa de cada gene no grupo CM em relação ao grupo SM

Apesar dos resultados não diferirem estatisticamente ($P > 0,05$), houve uma tendência dos animais com mastite expressarem 1,9 vezes menos *IL-6* que os animais com mastite, enquanto para a *IL-8* a diferença de expressão observada foi de 1,1 vezes. A *IL-6* é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, células endoteliais e linfócitos e está envolvida no choque séptico agudo durante a mastite causada por coliformes ou *Staphylococcus aureus*, facilitando a mudança de neutrófilos por monócitos na glândula mamária, que é necessária para a redução dos efeitos deletérios dos neutrófilos. Já a *IL-8* é uma quimocina produzida por monócitos, linfócito T, macrófagos e células endoteliais e epiteliais. Esta proteína induz a inflamação, media a *IL-1* (Interleucina 1) a induzir a migração dos neutrófilos para o tecido da glândula mamária, sendo um forte quimoatraente. Ela é bastante produzida na mastite causada por *Escherichia coli*, porém, nas causadas por *S. aureus* apresenta baixa concentração e também aumenta a capacidade fagocitária de neutrófilos recrutados para a glândula mamária (Oviedo-Boyso et al., 2006; Sordillo & Streicher, 2002). Estas duas citocinas estão relacionadas ao perfil de resposta imunológica do tipo celular, portanto é possível que na fase de infecção que os animais estavam no momento da coleta de leite e, dependendo do microrganismo causador da mastite, os animais infectados estavam desenvolvendo resposta imunológica preferencialmente do tipo humoral, e não do tipo celular. Porém, para que essa hipótese seja confirmada, será incluída no estudo a análise de expressão de citocinas típicas deste tipo de resposta, como por exemplo, a *IL-4* e *IL-10*.

Portanto, 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.

Conclusão

Não foi verificada diferença estatística na expressão dos genes *IL-6* e *IL-8* entre o grupo de vacas mestiças com e sem mastite clínica, sugerindo que, nestas condições, estes genes não seriam bons marcadores moleculares para a mastite. Portanto são necessários mais estudos para que se possa inferir sobre o perfil de expressão destes genes em animais mestiços, já que não existem outros trabalhos que comparam a expressão destes genes nestes animais.

Literatura citada

CONCEIÇÃO, J.R. **Estudo das relações entre resistência genética a carrapatos e características produtivas na espécie bovina**. 1997. 97f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

LEBLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F. et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1267-1279, 2006.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M. et al. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v.54, p.399-409, 2006.

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.

SCHUTZ, M.M. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2113-2129, 1993.

SORDILLO, L.M. & STREICHER, K.L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.2, p.135-146, 2002.