



**Perfil de expressão do gene *TLR-2* em células do leite de vacas Gir infectadas com *Streptococcus agalactiae*<sup>1</sup>**

Isabela Fonseca<sup>2</sup>, Daisyléa de Souza Paiva<sup>3</sup>, Marcos Brandão Dias Ferreira<sup>4</sup>, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito<sup>5</sup>, Humberto de Mello Brandão<sup>5</sup>, Simone Eliza Facioni Guimarães<sup>6</sup>, Marta Fonseca Martins Guimarães<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pela FAPEMIG, Embrapa/Agrofuturo/Banco Mundial e CNPq

<sup>2</sup> Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG, Doutoranda em Genética e Melhoramento - Universidade Federal de Viçosa (UFV). e-mail: isabela\_fonseca@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Graduanda do curso de Farmácia e Bioquímica - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: daisyufjf@gmail.com

<sup>4</sup> Fazenda Experimental Getúlio Vargas, Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba, EPAMIG. e-mail: brandao@epamiguberaba.com.br

<sup>5</sup> Embrapa Gado de Leite. e-mail: mavpaiva@cnpqgl.embrapa.br, humberto@cnpqgl.embrapa.br, mmartins@cnpqgl.embrapa.br

<sup>6</sup> Departamento de Zootecnia - UFV. e-mail: sfacioni@ufv.br

**Resumo:** Dentre os problemas sanitários na produção animal, as doenças infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite uma das principais doenças em gado de leite. Uma das opções mais promissoras para a redução dos problemas causados por esta doença, além dos cuidados sanitários e de manejo, é a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos. Desta forma, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo resistência/susceptibilidade a esta doença, foi realizada a quantificação da expressão relativa do gene *TLR-2* em células do leite de vacas da raça Gir Leiteiro infectadas com *Streptococcus agalactiae*, um dos principais patógenos causadores da mastite. O RNA total foi extraído de células presentes no leite de 17 animais. O leite foi coletado imediatamente antes da inoculação do patógeno (tempo 0) e 24 h após a inoculação (tempo 24). A análise de expressão gênica foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real e as comparações do nível de expressão gênica indicaram que no tempo 24 os animais expressaram 4,8 vezes mais *TLR-2* que no tempo 0 ( $p < 0,001$ ).

**Palavras-chave:** mastite, resistência, resposta imune, qPCR

**Expression profile of *TLR-2* gene on milk cells from Dairy Gyr cows infected with *Streptococcus agalactiae***

**Abstract:** Among health problems in livestock production, infectious contagious diseases are those that most distinctive, and the mastitis is of major diseases in dairy cattle. One of the most promising options for reducing the problems caused by this disease, in addition to health care and management, is the selection of resistant animals and the incorporation of this feature in droves. Thus, in order to better understand the immune response mechanisms associated with mastitis resistance/susceptibility to this disease, it was done the relative expression quantification of the *TLR-2* gene on milk cells from Dairy Gyr cows infected with *Streptococcus agalactiae*, is one of the most important pathogens causing mastitis. Total RNA was extracted from cells presents on milk of 17 animals. Milk was collected immediately before the inoculation of pathogen (time 0) and 24 hours after the inoculation (time 24). Analysis of gene expression it was done using Real Time PCR and the comparison of gene expression level indicated that at time 24 the animals expressed 4,8 times more *TLR-2* than at time 0 ( $p < 0,001$ ).

**Keywords:** mastitis, immune response, resistance, qPCR

**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 infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite a principal doença no aspecto econômico. A mastite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada por alterações metabólicas e fisiológicas,



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda



traumas, ou mais frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos (Oviedo-Boyso et al., 2006).

As raças zebuínas e seus cruzamentos tem 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 e vem crescendo em importância no Brasil e em países da América Latina, África e Ásia, por ser amplamente utilizada nos cruzamentos, principalmente com a raça Holandesa, por incorporar rusticidade e produtividade além de ser eficiente na produção de leite a baixo custo (Ferreira et al., 2007; Vercesi Filho et al., 2007).

Uma das opções mais promissoras para a redução dos problemas causados pela mastite, além dos cuidados sanitários e de manejo, é a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos. Por isso, 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. Os receptores *Toll-like* (TLR) são importantes na detecção de moléculas de patógenos invasores e na indução do mecanismo de defesa do hospedeiro, além disso um estudo anterior mostrou que houve aumento na expressão de *TLR-2* (*Toll-like receptor 2*) em vacas com mastite (Goldammer et al. 2004). Tendo esta premissa em vista, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão do gene *TLR-2* em células presentes no leite de bovinos da raça Gir Leiteiro infectados com *Streptococcus agalactiae* antes da inoculação e 24 h após a inoculação do patógeno.

### Material e Métodos

Foram utilizadas 17 vacas Gir Leiteiro provenientes da Fazenda Experimental Getúlio Vargas da EPAMIG, localizada no município de Uberaba (MG). Para selecionar os animais que iriam fazer parte do grupo experimental, 105 vacas passaram por uma triagem de exames microbiológicos e foram escolhidas com base nos critérios de histórico de mastite nos últimos cinco anos, ordem de parto e Contagem de Células Somática. O exame microbiológico foi repetido por três vezes e todas as vacas selecionadas para experimento apresentaram resultado negativo para *S. agalactiae* nos três exames microbiológicos. Além disso, os animais passaram por exame clínico do úbere e teste da caneca antes da coleta das amostras. Para cada uma das vacas foram coletados 200 mL de leite em tubos estéreis nos tempos 0 h e 24 h após a inoculação do patógeno. Para inoculação artificial utilizou-se uma cepa de *S. agalactiae* isolada de uma cultura pura do leite de uma vaca com mastite subclínica, pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Causadores de Mastite mantida na Embrapa Gado de Leite. Os exames microbiológicos e clínicos confirmaram que a sintomatologia apresentada pelos animais foi proveniente de infecção com *S. agalactiae*, além disso, após a coleta das amostras todos os animais foram tratados e tiveram a sua cura confirmada por exames clínicos e microbiológicos.

O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante e, a fim de remover qualquer contaminação com DNA genômico, foi realizada a digestão com DNase (*RNase-free DNase Set* – Qiagen). A qualidade das amostras de RNA foi avaliada pelo *Agilent Bioanalyzer 2100* (Agilente, Palo Alto, CA), sendo a média do índice de integridade do RNA (RIN) igual a cinco; e as concentrações foram determinadas por espectrofotometria usando o NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o *Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), sendo as concentrações médias do cDNA das amostras estimadas por espectrofotometria e então o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na reação de PCR em Tempo Real (qPCR).

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se o kit *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 do gene *TLR-2* e os dois controles endógenos (GAPDH e Ubiquitina) foram desenhados usando o programa *Primer Express* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas do banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 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 (100, 200 e 400 ng/reação) e quatro diluições de *primer* (50, 100, 200 e 400 nM). Depois de estabelecidas as



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda



melhores condições, efetuou-se a validação do experimento por meio da determinação da eficiência de amplificação das amostras, já que na quantificação relativa é necessário que as eficiências 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 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os dados obtidos durante a reação de PCR em Tempo Real, gerados pelo equipamento ABI 7300 Real-Time PCR, foram analisados pelo programa REST© 2008 versão 2.0.7, disponível em <http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html> que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tempos.

### Resultados e Discussão

A eficiência de amplificação do gene alvo e dos controles endógenos foi de 0,8 a 1,0 e, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. Para o gene *TLR-2* foram utilizados 50 nM de *primer* e 100 ng de cDNA por reação, já para os controles endógenos foram utilizados 100 ng de cDNA por reação e 200 nM de *primer*. O coeficiente de variação das duplicatas dos Ct de cada amostra não ultrapassou 5%.

Foi feita a comparação do nível de expressão gênica dos animais nos diferentes horários de coleta do leite. No tempo 24 houve um aumento de expressão do gene *TLR-2* de 4,8 vezes em relação ao tempo 0 ( $p < 0,001$ ), de acordo com as análises feitas pelo programa REST© 2008.

A imunidade inata predomina na fase inicial da infecção e é mediada por macrófagos, neutrófilos, células *Natural Killer* e citocinas. Ela reconhece e responde a diferentes patógenos, mesmo se o organismo nunca tiver sido infectado por aquela espécie. Particularmente, as bactérias possuem diferentes estruturas de parede celular que são reconhecidas por receptores de membrana. Estas estruturas são de lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos (PGN) e ácido lipoteicoico (LTA), os quais constituem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Esses PAMPs são reconhecidos por receptores *Toll-like* (TLRs), que estão localizados nas membranas celulares e endossomais. A interação entre os PAMPs e TLRs de células do sistema imune induz a produção de citocinas e outros mediadores endógenos que são essenciais na proteção do organismo contra micro-organismos patogênicos. O TLR-2 é responsável pelo reconhecimento de LTA e PGN de bactérias gram-positivas (Hirschfeld et al., 2000; Takeuchi et al., 2000) e a bactéria *S. agalactiae*, causadora da mastite neste experimento, é uma bactéria gram-positiva, o que justifica o aumento da expressão deste gene e corrobora dados da literatura (Goldammer et al. 2004).

### Conclusão

Foi possível verificar diferença no perfil de expressão do gene *TLR-2* em relação ao fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite entre os animais considerados neste trabalho. Novos estudos deverão incluir outros genes envolvidos na resposta de resistência à mastite a fim de compreender melhor os mecanismos de resposta imune.

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG, CAPES e EMBRAPA/AGROFUTURO.

### Literatura citada

- 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.
- GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A. et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.174–185, 2004.
- HIRSCHFELD, M.; MA, Y.; WEIS, J.H. et al. Cuttingedge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. **The Journal of Immunology**, v.165, p.618–622, 2000.
- 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.
- TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **The Journal of Immunology**, v.165, p.5392–5396, 2000.
- VERCESI FILHO, A.E.; FARO, L.E.; PAZ, C.C.P. et al. Fatores que influenciam o preço do sêmen de touros da raça Gir Leiteiro. **Revista Gir Leiteiro**, n.7, p.78-81, 2007.