



Genômica funcional na glândula mamária de vacas Gir Leiteiras (*Bos indicus*) empregando *microarrays* revela genes candidatos associados com a resistência à mastite¹

Adilson Ferreira da Mota², Maria Aparecida V. P. Brito², Marco Antonio Machado², Guilherme Nunes de Souza², Carla Christine Lange², Raquel Varella Serapião³

¹ Projeto financiado conjuntamente pela Embrapa e FAPEMIG (EDT 2292/03) e Bolsa de Produtividade em Pesquisa do CNPq

² Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora – MG. e-mail contato: amota@cnppl.embrapa.br

³ Pesquisador da PESAGRO/RIO – Embrapa Gado de Leite – Barão de Juparanã – RJ

Resumo: Membranas de *microarrays* contendo 9.600 genes expressos em bovinos foram empregadas para revelar genes possivelmente relacionados à resistência à mastite em vacas da raça Gir Leiteira (*Bos indicus*). Vacas secas e vazias foram selecionadas para desafio com infusão de 1.500 UFC de *Staphylococcus aureus* 284 em um dos quartos de sua glândula mamária involuída. Aproximadamente 72 horas após o desafio, cada vaca foi abatida e foram retiradas amostras de tecido do parênquima do quarto mamário infectado e do não infectado. Para cada uma das oito amostras, separadamente, foi retirado o RNA total, sendo a seguir marcado e hibridizado contra os *microarrays*. Os resultados discriminaram 177 genes que apresentaram diferença ($P < 0,001$) nos níveis de expressão em função da infecção bacteriana. Dentre estes, são apresentados os 5 genes com aumento significativo ($P < 0,001$) de, ao menos, 1,5 vezes no nível de expressão em função do desafio, e 5 genes com redução ($P < 0,001$) da expressão nas mesmas condições. Os genes identificados são candidatos a explicar o processo interativo entre patógeno e hospedeiro, caracterizando – geneticamente – a resistência do organismo contra a mastite.

Palavras-chave: expressão gênica, genética molecular, bovinos

Functional genomics reveals candidate genes associated with resistance to mastitis in *Bos indicus* cattle using microarrays

Abstract: A custom microarray with 9,600 genes expressed in the bovine mammary gland was used to reveal genes related to mastitis resistance. Brazilian Dairy Gir cows (*Bos indicus*) non-pregnant undergoing mammary gland involution were selected and mammary tissues were collected after an experimental challenge. Approximately 72 hours prior to slaughter, each cow received an intra-mammary infusion in the left rear quarter of 1,500 UFC of *Staphylococcus aureus* 284. Eight total RNA samples were extracted from challenged and control mammary quarters, radio labeled and hybridized against the microarrays. Results discriminated 177 genes that presented significant changes ($P < 0.001$) in gene expression levels. Five genes are presented and were down-regulated ($P < 0.001$) while other 5 were up-regulated ($P < 0.001$) with differences in expression levels higher than 1.5-fold. Those genes were identified as candidates that characterize gene expression changes associated to resistance to mastitis.

Keywords: bovine, gene expression, molecular genetics

Introdução

A mastite representa os mais altos prejuízos econômicos de saúde animal aos produtores de leite e é uma doença que apresenta baixa herdabilidade, portanto os ganhos genéticos em estudos de genética quantitativa são reduzidos. Ainda, a mastite só é observada nas fêmeas, sendo os machos selecionados indiretamente. Mediante estudos de genômica animal, com a identificação e posterior comprovação dos genes e genótipos relacionados à resistência à mastite, tanto machos, quanto fêmeas, a qualquer idade, mesmo através do sêmen e dos embriões, podem ser avaliados através do genoma, identificando animais resistentes, com benefícios na redução dos níveis de mastite e dos custos de tratamento, resíduos e riscos alimentares. Na técnica de *microarray*, ao invés de alterar os genes, buscando as alterações no fenótipo dos indivíduos e a explicação das funções dos genes alterados, o que ocorre é a alteração dos fenótipos e, posteriormente, a verificação na alteração na expressão dos genes que estão relacionados ao evento. Como existem milhares de genes no organismo que atuam de forma específica e interativa em razão da



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*



ocorrência da mastite bovina, o presente estudo visou empregar membranas de *microarray* para identificar genes candidatos que apresentaram alterações nos níveis de expressão em função da doença.

Material e Métodos

Tecidos mamários de fêmeas da raça Gir Leiteira (*Bos indicus*) foram coletados na Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, Brasil conforme descrito em Da Mota et al. (2004). Quatro vacas não-gestantes, e com involução da glândula mamária foram selecionadas para coleta de tecidos após o abate. Aproximadamente 72 horas antes do abate, cada vaca recebeu infusão intra-mamária no quarto posterior esquerdo de solução contendo *Staphylococcus aureus* 284, de acordo com Erskine et al. (2004). A aplicação da solução contendo 1.500 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) serviu de desafio do animal para a infecção que levou à ocorrência da mastite. A bactéria foi multiplicada a partir de um caso clínico de mastite de acordo com os protocolos utilizados por Schukken et al. (1999). As amostras eram de parênquima da glândula mamária de 1g do quarto infectado e 1g de um quarto controle, não-infectado. Os explantes foram cortados em cubos de 5mm³ e imediatamente submersos em 1.000µl de RNALater.

O RNA das amostras foi extraído e purificado em um procedimento de duas etapas: (i) extração utilizando RNeasy; (ii) utilização de uma coluna de digestão com *DNase I* para eliminar traços de DNA genômico contaminante. Para assegurar a integridade das amostras, após o tratamento com *DNase I*, o RNA total foi analisado em um equipamento Bioanalyzer Agilent. Amostras de RNA total que não apresentaram degradação aparente nos eletroferogramas correspondentes foram selecionadas para hibridização contra as membranas de *microarray*. Os experimentos foram iniciados com 2-3µg de RNA total. De maneira geral, para cada amostra de cada animal, houve duas extrações independentes de RNA total. Cada amostra de RNA, sendo proveniente de animais submetidos ou não aos desafios, foi submetida à transcrição reversa com incorporação de [α -³²P]dCTP e hibridizado à uma unidade de *microarray*. Foram empregadas duas membranas de *microarray* para cada amostra.

Após a revelação do sinal, as membranas foram submetidas às leituras dos sinais utilizando um equipamento PhosphorImager. As leituras de cada sinal dos *microarrays* foram submetidas a um pré-tratamento, com a checagem dos níveis de leitura médios, máximos e mínimos, e a seguir foram submetidos à normalização em função dos valores globais do total de genes presentes no *microarray*. Em seguida foi realizado teste estatístico com as repetições das membranas submetidas aos mesmos tratamentos para detectar a significância das diferenças. Foi possível constatar a consistência do sistema sem a observação de variações entre as leituras nas repetições. Ainda que o sistema tenha apresentado consistência entre as hibridizações realizadas com as réplicas das amostras, foi empregada a média entre as leituras das duas repetições para que a informação utilizada nas análises posteriores representasse as duas extrações, hibridizações e leituras independentes.

Os dados obtidos nas hibridizações, representando a leitura observada para cada gene em determinada membrana, foram normalizados considerando o conjunto global de todas as leituras observadas na respectiva membrana. Desta forma, os resultados das leituras entre as diferentes membranas podem ser comparados. A seguir, foi calculada a média e desvio-padrão das quatro leituras médias oriundas das amostras obtidas sem o desafio (controle) e a média das quatro leituras médias oriundas das amostras obtidas com o desafio. A comparação entre as médias foi utilizada como índice para ordenamento dos genes que apresentaram as maiores diferenças nas duas situações (com desafio e controle) e o desvio-padrão das diferenças entre as médias foi utilizado para o cálculo da significância da diferença.

Resultados e Discussão

Da lista original, contendo 9.600 genes, um conjunto de 177 genes apresentou diferenças altamente significantes ($p < 0,001$) nos níveis de expressão. A observação mais detalhada dos resultados possibilitou visualizar que dentre os genes que apresentaram diferenças significantes nos níveis de expressão nas duas situações, estavam presentes tanto aqueles que tiveram aumento da expressão gênica quando o animal havia sido submetido à infecção, quanto os que tiveram redução da sua expressão.

Uma segunda análise foi procedida para separar os genes que apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) de pelo menos 1,5 vezes na sua expressão, quando o animal havia sido submetido ao desafio. Essa análise identificou os 5 genes com maior aumento ou redução na sua expressão. O resultado da



identificação dos genes que apresentaram aumento ou redução significativa ($p < 0,001$) de ao menos 1,5 vezes na sua expressão quando o animal havia sido submetido ao desafio é apresentado na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 Relação dos 10 genes que apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) ou redução significativa ($p < 0,0001$) no nível de expressão gênica na comparação de amostras de glândula mamária submetida a desafio de infecção causada por *Staphylococcus aureus* 284.

Anotação tentativa	Nível de significância	Aumento/Redução na expressão gênica com a infecção
Hypothetical protein MGC8902 (LOC532585)	5,6673E-04	3,88
Hypothetical protein PP2447	3,2668E-03	3,80
Syntaxin 7	9,4214E-05	3,70
Cytoplasmic dynein heavy chain 1 (DHC1) (LOC514953)	1,9201E-03	3,31
Hypothetical protein MGC2941	7,9547E-04	2,64
Ethanolamine kinase-like protein EK12 (FLJ10761)	1,8242E-03	-3,63
Docking protein 1 (p62dok)	2,3708E-03	-3,59
AB015644 RNA binding protein	7,3716E-06	-3,44
Serine protease hepsin	3,8290E-03	-2,98
IkB kinase alpha	7,0037E-10	-2,91

Conclusões

A metodologia de *microarrays* é adequada para realização de um “screening” inicial destinado a identificar genes relacionados com a ocorrência da mastite. Os genes identificados representam as respostas dos genes do organismo do animal à sua ocorrência e estão implicados no processo interativo patógeno/hospedeiro. A realização de outros estudos com os genes selecionados nos experimentos com *microarray* permitirá comprovação de genes/genótipos relacionados à resistência contra a mastite.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Drs. Tad S. Sonstegard, Curt P. Van Tassel, Tony A. Capuco e Erin E. Connor, pesquisadores do ARS/USDA pelo fornecimento das membranas e execução das hibridizações. O primeiro autor agradece ao CNPq pelo fornecimento de Bolsa de Produtividade em Pesquisa e à FAPEMIG pelo apoio financeiro para a realização deste estudo (EDT 2292/03).

Literatura citada

- Da Mota, A. F.; Sonstegard, T. S.; Van Tassel, et al. Characterization of open reading frame expressed sequence tags generated from *Bos indicus* and *Bos taurus* mammary gland cDNA libraries. **Animal Genetics**, v.35(3), p.213-219, 2004.
- Erskine, R. J.; Eberhardt, R. J.; Scholze, R. W. et al. Experimentally induced *S. aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.80, p.406-412, 1997.
- Schukken, Y. H.; Leslie, K. E.; Barmum, D. A. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2393-2401, 1999.