



Expressão relativa do gene *IL-17* em células do leite de vacas Gir infectadas com *Streptococcus agalactiae*¹

Isabela Fonseca², Isabella Silvestre Barreto Pinto³, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito⁴, Marcos Brandão Dias Ferreira⁵, Humberto de Mello Brandão⁴, Simone Eliza Facioni Guimarães⁶, Marta Fonseca Martins⁴

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pela EMBRAPA/AGROFUTRO, FAPEMIG e CNPq

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento - UFV. e-mail: isabela.f.fonseca@ufv.br

³Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. e-mail: isabellajf@gmail.com

⁴Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: mavpaiva@cnp.gl.embrapa.br, humberto@cnp.gl.embrapa.br, mmartins@cnp.gl.embrapa.br

⁵Fazenda Experimental Getúlio Vargas, Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba, EPAMIG. e-mail: brandao@epamig.uberaba.com.br

⁶Professora do Departamento de Zootecnia - UFV, Viçosa, MG. email: sfacioni@ufv.br

Resumo: A mastite é a doença de maior incidência nos rebanhos bovinos no mundo, mesmo naqueles que adotam rigorosos programas de controle. Uma das opções mais promissora 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. Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite, foi realizada a caracterização da expressão do gene *IL-17* 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 10 h após a inoculação (tempo 10). 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 10 os animais expressaram 10 vezes mais *IL-17* que no tempo 0 ($P < 0,001$).

Palavras-chave: glândula mamária, mastite, qPCR, resistência, resposta imune

Relative expression of *IL-17* gene on milk cells from Dairy Gyr cows infected with *Streptococcus agalactiae*

Abstract: The mastitis is the most incident cause of disease in cattle herds worldwide, even in those that have strict control programs. One of the most promising approaches to reduce problems caused by this disease, together with sanitary control measures and management, is the selection of resistant animals and incorporation of this trait into herds. In order to understand the immune response mechanisms associated with mastitis resistance/susceptibility phenotype, the characterization of *IL-17* gene expression 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 10 hours after the inoculation (time 10). Analysis of gene expression it was done using Real Time PCR and the comparison of gene expression level indicated that at time 10 the animals expressed 10 times more *IL-17* than at time 0 ($P < 0,001$).

Keywords: immune response, mammary gland, mastitis, qPCR, resistance

Introdução

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro na qual as raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância, 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, além de ser eficiente na produção de leite a baixo custo (Ferreira et al., 2007).

Na última década, aconteceram intensas transformações na cadeia produtiva do leite o que levou a reestruturação de todos os seus elos, possibilitando uma maior competitividade. Mas, apesar das estatísticas mostrarem uma constante evolução da produção no país, ainda há vários gargalos que precisam ser equacionados para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor.

1

Fatores como clima, instalações, mão de obra, potencial zootécnico e genético, políticas públicas e saúde animal fazem com que a atividade de produção de leite seja bastante onerosa e de baixa produtividade para muitos produtores. Dentre os problemas de saúde animal, as doenças infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite a principal doença no aspecto econômico (Oviedo-Boyso et al., 2007). Como prejuízo para a atividade pode-se citar a redução da produtividade, o aumento dos custos com a mão de obra, tratamento dos animais e descarte do leite do rebanho, além da baixa qualidade dos produtos lácteos, quando analisados os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos. Associado aos cuidados sanitários, a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos tem se mostrado uma forma promissora para redução dos problemas causados pela mastite.

Esta doença caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária, causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas, ou mais frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos, cuja rapidez e eficácia da resposta imune do hospedeiro contra o patógeno constituem fator crucial para o estabelecimento, a persistência e a gravidade da infecção. Devido ao grande número de vias metabólicas, moléculas e células atuando na característica de resistência, esta doença torna-se muito complexa, pois depende de componentes genéticos e também de fatores ambientais e fisiológicos. Diversos genes podem estar envolvidos na determinação desta função, portanto o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão do gene *IL-17* (interleucina 17) em células presentes no leite de vacas da raça Gir Leiteiro infectadas com *Streptococcus agalactiae*, um dos principais patógenos causadores da mastite, antes da inoculação e 10 h após a inoculação do patógeno, para melhor compreensão dos mecanismos de resposta imune.

Material e Métodos

Foram selecionadas 17 vacas Gir Leiteiro provenientes da Fazenda Experimental Getúlio Vargas da EPAMIG, localizada no município de Uberaba (MG). Para a seleção dos animais, 105 vacas passaram por uma triagem de exames microbiológicos, histórico de mastite nos últimos cinco anos, ordem de parto e contagem de células somática. O exame microbiológico foi repetido por três vezes e as 17 vacas selecionadas para o experimento apresentaram resultado negativo para *S. agalactiae*.

Para cada uma das vacas foram coletados 200 mL de leite em tubos estéreis nos tempos 0 h e 10 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*. O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante e todas as amostras foram tratadas com DNase (*RNase-free DNase Set* - Qiagen). A qualidade das amostras de RNA foi avaliada no *Agilent Bioanalyzer 2100* (Agilente, Palo Alto, CA) 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) 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 *IL-17* e dos dois controles endógenos (*RPLPO* e *Ubiquitina*) foram desenhados utilizando-se o programa *Primer Express* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas no 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 e, depois de estabelecidas as melhores condições, determinou-se a eficiência de amplificação das amostras. Cada amostra foi feita em duplicata e amplificadas no *ABI 7300 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Os dados obtidos durante a reação de PCR em Tempo Real foram analisados pelo programa *REST®2009*, desenvolvido por M. Pfaffl (*Technical University Munich*) e Qiagen, disponível em <http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>, a fim de comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

A eficiência de amplificação do gene alvo (*IL-17*) e dos controles endógenos (RPLPO e Ubiquitina) variaram de 0,8 a 1,0 e, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. O coeficiente de variação das duplicatas dos Ct (*cycle threshold*) de cada amostra não ultrapassou 5% e as melhores condições de reação para o gene alvo foram 400 nM de *primer* e 100 ng de cDNA, enquanto para os controles endógenos foram utilizados 100 nM de *primer* e 100 ng de cDNA por reação. Foi feita a comparação do nível de expressão gênica dos animais nos diferentes horários de coleta do leite e foi verificado que no tempo 10 houve um aumento de expressão do gene *IL-17* de 10 vezes em relação ao tempo 0 ($P < 0,001$).

A *IL-17* é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células T ativadas e comumente associada a respostas alérgicas. Uma importante ação da *IL-17* nos locais de infecção é induzir células locais a secretarem citocinas e quimiocinas que atraem neutrófilos (Riollet et al., 2006), o que resulta no aumento de células somáticas presente no leite. A *IL-17* atua como um eficiente amplificador da resposta inflamatória aguda pelo sistema imune inato nos locais recém infectados, por isso a maior expressão de *IL-17* no tempo 10 era esperada. Riollet et al. (2006) sugeriram que a *IL-17* está relacionada ao recrutamento de neutrófilos na glândula mamária de bovinos quando esta apresenta infecção crônica causada por *Staphylococcus aureus*, micro-organismo gram-positivo causador de mastite assim como *S. agalactiae*, patógeno considerado neste trabalho. Diferentes padrões de resposta imune inata têm sido relatados após infecção intramamária por bactérias gram-positivas e gram-negativas, pois a capacidade do agente causador da mastite em estabelecer a infecção depende da habilidade do hospedeiro em responder a este micro-organismo invasor (Bannerman et al., 2004). Estes trabalhos demonstram a importância de se estudar a resposta imune na glândula mamária a diferentes agentes etiológicos, para o entendimento da patofisiologia da mastite a fim de gerar estratégias eficientes no controle desta doença.

Novos estudos deverão incluir outros genes envolvidos na resposta de resistência à mastite a fim de compreender melhor os mecanismos de resposta imune. Os resultados dessas pesquisas irão ajudar a entender como ocorrem as reações imunológicas e a fisiopatologia desta doença que afeta de maneira significativa a qualidade e a produção de leite nas propriedades, gerando estratégias mais eficientes no controle e erradicação da mastite. A seleção de animais mais resistentes com base no perfil genético possibilita a redução de aplicações de medicamentos, com conseqüente redução dos custos, dos níveis de contaminação dos produtos e do meio ambiente.

Conclusão

Uma diferença significativa no perfil de expressão do gene *IL-17* foi verificada nos diferentes tempos, sugerindo que este gene desempenhe função importante nos mecanismos de resposta à mastite bovina. A identificação e caracterização da expressão gênica em animais com mastite é fundamental para a busca de genes que possam ser testados e validados como marcadores para tais condições fisiológicas.

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

Literatura citada

- ALEMANHA. GENE QUANTIFICATION. **Rest.gene-quantification.info**. Freising-Weihenstephan, Alemanha, 2009. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>> Acesso em 14 mar. 2011.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.11, p.463-472, 2004.
- FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; LEDIC, I.L.; FERNANDES, L.O.; RIBEIRO, S.A. Características reprodutivas de touros da raça Gir. **Revista Gir Leiteiro**, n.7, p.30-38, 2007.
- OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v.54, p.399-409, 2007.
- RIOLLET, C.; MUTUEL, D.; DUONOR-CÉRUTTI, M.; RAINARD, P. Determination and Characterization of Bovine Interleukin-17 cDNA. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v.26, p.141-149, 2006.