



**Perfil de expressão dos genes *IL-1β* e *IL-12* em 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 e CNPq

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento - UFV, Viçosa, MG. 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@cnppl.embrapa.br, humberto@cnppl.embrapa.br, mmartins@cnppl.embrapa.br

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

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

Resumo: Na produção animal, dentre os problemas de sanidade, as doenças infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite uma das principais doenças. Uma das opções mais promissora para a redução dos problemas causados por esta doença, além dos cuidados sanitários, 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 e susceptibilidade a esta doença, foi realizada a quantificação da expressão relativa dos genes *IL-1β* e *IL-12* 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 8 vezes mais *IL-1β* e 22 vezes mais *IL-12* que no tempo 0 (P<0,001).

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

**Gene expression profile of *IL-1β* and *IL-12* on milk cells from Dairy Gyr cows infected with
*Streptococcus agalactiae***

Abstract: Among health problems in livestock production, infectious contagious diseases are those that stand out most being mastitis one of the main disease conditions. One of the most promising ways to reduce problems caused by infectious contagious diseases, besides sanitary control, is the selection of resistant animals, in order to incorporate this trait within the herd. 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 *IL-1β* and *IL-12* genes 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 8 times more *IL-1β* and 22 times more *IL-12* than at time 0 (P<0,001).

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

Introdução

As raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na composição da pecuária brasileira, representando cerca de 80% do rebanho bovino efetivo nacional. A raça Gir Leiteiro exerce



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



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).

Nos últimos anos a cadeia produtiva do leite tem passado por uma constante evolução, porém ainda há vários entraves que precisam ser resolvidos para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor. Fatores como clima, instalações, sanidade, mão de obra, potencial zootécnico e genético fazem com que a atividade de produção de leite seja onerosa e de baixa produtividade para produtores pouco tecnificados. Dentre os problemas de sanidade, as doenças infectocontagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite a principal doença em gado de leite, sobretudo relacionado ao aspecto econômico (Oviedo-Boyso et al., 2007). Como prejuízo para a atividade pode-se citar a redução da produtividade do rebanho e a baixa qualidade dos produtos lácteos, quando analisados os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos, aumento dos custos com a mão de obra, tratamento dos animais e descarte do leite. Além dos 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 por esta doença.

A rapidez e eficácia da resposta imune do hospedeiro contra o micro-organismo causador da mastite é um fator crucial para estabelecimento, persistência e gravidade da infecção (Bannerman et al., 2009). Na glândula mamária, células epiteliais e endoteliais desempenham funções importantes na defesa imediata contra infecções locais por meio da produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (Cates et al., 2009). Tendo esta premissa em vista, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão dos genes *IL-1 β* (interleucina 1 β) e *IL-12* (interleucina 12) em células presentes no leite de vacas da raça Gir Leiteiro infectadas com *Streptococcus agalactiae* antes da inoculação e 24 h após a inoculação do patógeno, para melhor compreensão dos mecanismos de resposta imune durante a mastite.

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, 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*.

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*. 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 dos genes *IL-1 β* , *IL-12* 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



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



determinou-se a eficiência de amplificação das amostras, já que na quantificação relativa é necessário que as eficiências de amplificação do alvo e do controle endógeno sejam próximas. 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 dos genes alvos e controles endógenos 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. Para todos os genes foram utilizados 100 nM de *primer* e 100 ng de cDNA por reação e 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 e foi verificado que no tempo 24 houve um aumento de expressão do gene *IL-1β* de 8 vezes em relação ao tempo 0 ($P < 0,001$), enquanto o gene *IL-12* apresentou uma expressão 22 vezes maior no tempo 24 em relação ao tempo 0 ($P < 0,001$).

A IL-1β é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e células epiteliais, sendo componente chave da resposta imune inata. Ela acelera a resposta inflamatória, regulando direta ou indiretamente as funções dos monócitos, neutrófilos e das citocinas produzidas por essas células (Lahouassa et al., 2007). Na glândula mamária, ela é responsável pelo recrutamento de neutrófilos durante a fase de infecção, pois quando os macrófagos reconhecem a bactéria invasora, eles liberam IL-1β, estimulando a atividade bactericida de neutrófilos e também produzindo prostaglandinas e leucotrienos, os quais aumentam a reação inflamatória no local. (Oviedo-Boyso et al., 2007). Já a IL-12, mediadora entre a imunidade inata e adquirida, é uma citocina produzida por linfócitos T e células dendríticas. Esta proteína regula a diferenciação de linfócitos T e atua como adjuvante endógeno recrutando neutrófilos, que ao chegar ao sítio de infecção fagocitam as bactérias invasoras e liberam, dentre outros compostos, peptídeos antibacterianos (Oviedo-Boyso et al., 2007). Devido às funções desempenhadas por estas duas citocinas (IL-1β e IL-12), era esperado o aumento no nível de expressão desses genes no tempo 24 em relação ao tempo 0, corroborando dados da literatura.

Conclusão

Foi possível verificar diferença no perfil de expressão dos genes *IL-1β* e *IL-12* entre 0 h e 24 h após a inoculação de *S. agalactiae*, sendo ambos mais expressos no tempo de 24 h. 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

- BANNERMAN, D.D.; RINALDI, M.; VINYARD, B.T. et al. Effects of intramammary infusion of cis-urocanic acid on mastitis-associated inflammation and tissue injury in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, n.70, p.373-382, 2009.
- CATES, E.A.; CONNOR, E.E.; MOSSER, D.M. et al. Functional characterization of bovine TIRAP and MyD88 in mediating bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial NF-κB activation and apoptosis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.32, p.477-490, 2009.
- 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.
- LAHOUSSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P. et al. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Cytokine**, v. 38, p. 12-21, 2007.
- OVIDEO-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, 2007.