



Perfil de expressão do gene *TGF-β1* em vacas Gir infectadas com *Streptococcus agalactiae*¹

Isabela Fonseca², Willian Pascoa Pereira³, Jailton da Costa Carneiro⁴, 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

³Aluno de Graduação do Curso de Ciências Biológicas - CES-JF/ Juiz de Fora, MG. e-mail: willp_2@hotmail.com,

⁴Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: jailton@cnp.gl.embrapa.br, 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@epamiguberaba.com.br

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

Resumo^a: A mastite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos. Os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos para o fenótipo de resistência e susceptibilidade a esta doença. Portanto, por meio da técnica de PCR em tempo real, foi avaliado o perfil de expressão do gene *TGF-β1* em células presentes no leite de 17 vacas Gir infectadas artificialmente com uma estirpe de *Streptococcus agalactiae* nos tempos 0, 4, 9 e 24 horas após a inoculação do patógeno. As comparações do nível de expressão gênica indicaram que houve um aumento na expressão de *TGF-β1* em todos os tempos analisados em relação ao tempo 0, com diferença significativa ($P < 0,05$) nos contrastes 0 h vs 4 h e 0 h vs 24 h. A diferença no perfil de expressão deste gene sugere que possivelmente o *TGF-β1* desempenhe um papel importante nos mecanismos de resistência à mastite bovina.

Palavras-chave: mastite, PCR em tempo real, pecuária leiteira, resposta imune

Gene expression profile of *TGF-β1* in milk cells from Dairy Gyr cows infected with *Streptococcus agalactiae*

Abstract: Mastitis is characterized by an inflammatory response in the mammary gland often caused by environmental or contagious pathogenic microorganisms. The genes involved in immune response have been suggested as strong candidates for the resistance phenotype and susceptibility to this disease. Therefore, by means of real time PCR technique it was evaluated the profile for the expression of *TGF-β1* gene in milk cells of 17 Gyr cows artificially inoculated with a strain of *Streptococcus agalactiae* at 0, 4, 9 and 24 hours after inoculation. Comparisons of the level of gene expression indicated that there was an increased in expression of *TGF-β1* in all times analyzed in relation to time 0, with significant difference ($P < 0.05$) in contrasts 0 h vs 4 h and 0 h vs 24 h. The difference in the expression profile of this gene suggests that *TGF-β1* possibly plays an important role in the mechanisms of resistance to bovine mastitis.

Keywords: dairy farming, immune response, mastitis, real time PCR

Introdução

A mastite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada frequentemente por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos (Oviedo-Boyso et al., 2007), dentre estes a bactéria gram-positiva *Streptococcus agalactiae*. Esta doença causa grandes prejuízos econômicos na pecuária leiteira, pois reduz a produtividade do rebanho, diminui a qualidade dos produtos lácteos, quando analisados os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos, aumenta os custos com a mão de obra, com o tratamento dos animais e descarte do leite. Além disso, exerce grande preocupação quanto ao bem-estar animal (Contreras e Rodríguez, 2011).

No entanto, apesar de nos últimos anos uma grande variedade de perfis imunológicos e respostas associadas terem sido descritas após a infecção da glândula mamária com bactérias gram-positivas e gram-negativas, nenhum trabalho analisou o perfil de resposta em animais zebuínos quando infectados com *S. agalactiae*. Há indícios de que existam diferenças no perfil de resposta à mastite clínica entre animais Gir, Holandeses e mestiços, por isso, o estudo do perfil de resposta às diversas doenças em gado de leite deve ser feito nos diferentes grupos ou raças, para que estas respostas sejam comparadas, a fim de verificar as semelhanças e os diferentes mecanismos de resposta.

Estudos com bactérias gram-positivas descreveram um maior influxo de leucócitos na glândula mamária e a expressão de uma grande variedade de citocinas e mediadores inflamatórios (Alluwaimi et al., 2003; Bannerman et al., 2004). Por isso, os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos para resistência e susceptibilidade à mastite. A identificação de fatores que contribuem para a predisposição da glândula



mamária à mastite facilitará o desenvolvimento de novas estratégias de controle a esta doença (Bruno et al., 2010), como, por exemplo, a identificação de genes que possam ser utilizados como marcadores para resistência à mastite nos programas de melhoramento animal.

Portanto, por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), foi avaliado o perfil de expressão do gene *TGF-β1* em células presentes no leite de vacas Gir infectadas artificialmente com uma estirpe de *S. agalactiae* nos tempos 0, 4, 9 e 24 horas 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, 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* nestes três exames.

Para cada uma das 17 vacas foram coletados 200 mL de leite em tubos estéreis nos tempos 0 h, 4 h, 9 h e 24 h após a inoculação do patógeno. Para inoculação artificial utilizou-se uma estirpe de *S. agalactiae* isolada de uma cultura pura do leite de uma vaca com mastite subclínica, pertencente à Coleção de Micro-organismos da 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). O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e então foi estocado a -20°C até o uso na reação de 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 *TGF-β1* (*transforming growth factor β1*) e dos dois controles endógenos (RPLP0 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, 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 do gene alvo 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%. Observa-se na Figura 1 que, de forma geral, houve um aumento na expressão de *TGF-β1* em todos os tempos analisados em relação ao tempo 0, com diferença significativa ($P < 0,05$) nos contrastes 0 h vs 4 h e 0 h vs 24 h. No tempo 9 pode ser observada uma queda nos níveis de *TGF-β1*, o qual voltou a aumentar no tempo 24, fato que pode ser verificado pelo aumento de duas vezes na expressão deste gene ($P < 0,05$). Por essa razão houve *downregulation* entre os tempos 4 e 9 ($P < 0,05$) e não houve diferença significativa entre os tempos 0 e 9 ($P > 0,05$). Corroborando os resultados encontrados neste estudo, Chockalingam et al. (2005) verificaram aumento na expressão da proteína *TGF-β1* em leite de úberes infectados com *Escherichia coli*, enquanto Bannerman et al. (2005) verificaram o mesmo efeito quando a mastite foi induzida por *Pseudomonas aeruginosa*.

Embora a inflamação seja um componente essencial da resposta do hospedeiro à infecção intramamária, uma resposta inflamatória prolongada pode danificar o revestimento epitelial da glândula mamária e levar à redução permanente na produção de leite (Paape et al., 2003). Neste contexto, a participação de citocinas anti-inflamatórias, como os membros da família *TGF-β*, são de extrema importância para minimizar os efeitos das citocinas inflamatórias.

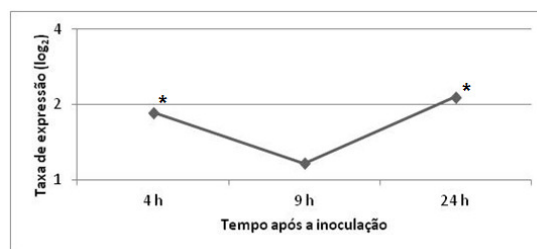


Figura 1. Expressão relativa do gene *TGF-β1* nos tempos 4, 9 e 24 horas após a inoculação do patógeno em relação ao tempo 0. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos 0 h vs 4 h e 0 h vs 24 h.

Conclusões

Foi possível verificar diferença no perfil de expressão do gene *TGF-β1* entre os tempos analisados após a inoculação de *S. agalactiae*, sugerindo que possivelmente este gene desempenhe um papel importante nos mecanismos de resistência à mastite bovina. Novos estudos deverão incluir outros genes envolvidos na resposta de resistência à mastite a fim de compreender melhor os mecanismos de resposta imune.

Literatura citada

- ALLUWAIMI, A.M.; LEUTENEGGER, C.M.; FARVER, T.B et al. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, p.105-111, 2003.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W. et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.463-472, 2004.
- BANNERMAN, D.D.; CHOCKALINGAM, A.; PAAPE, M.J. et al. The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. **Veterinary Immunol and Immunopathology**, v.107, p.201-15, 2005.
- BRUNO, D.R.; ROSSITTO, P.V.; BRUNO, R.G.S. et al. Differential levels of mRNA transcripts encoding immunologic mediators in mammary gland secretions from dairy cows with subclinical environmental Streptococci infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.138, p.15-24, 2010.
- CHOCKALINGAM, A., PAAPE, M.J., BANNERMAN, D.D. Increased milk levels of transforming growth factor- α , β 1, and β 2 during *Escherichia coli*-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1986-1993, 2005.
- 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, 2007.

^a Como citar este trabalho: AUTORES. Título do trabalho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012. (CD-ROM).