

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

PERFIS DE EXPRESSÕES DO GENE β - DEFENSINA EM DIFERENTES TECIDOS BIOLÓGICOS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE.

Cintia Luana Pinheiro SANTOS*¹, Rafaelle Casseb GUIMARÃES², Alexandre do
Rosário CASSEB², Elizabeth Machado BARBOSA³, Ednaldo da Silva FILHO²

*autor para correspondência: luanasantos6972@gmail.com

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Belém, Brasil

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém-PA, Brasil

³Universidade Federal do Amapá, Mazagão, AP, Brasil

Abstract: Defensins are innate immune-effecting molecules and have antimicrobial immunoprotective activity against bacteria, fungi and virus. The aim of this study was understand the gene expression levels of the peptide in the defense of the innate immune system in biological filters of Nelore cattle. RNA extractions from blood, esophagus, lung and liver samples were performed using the Trizol reagent specified by the manufacturer. For gene quantification, an RT-qPCR technique was performed with the following reagent: Quantitative RT-qPCR Kit from SYBR® One-step green. All discussions were conducted on the CFX-96™ Real-Time Cycler in duplicate. The Ct values of the endogenous gene GAPDH were performed in a descriptive statistic, and the values of Δ Ct were used, being submitted to the ANOVA test and their means compared by the Tukey's test ($P < 0.05$). Comparisons of Ct values across all data demonstrated consistent levels of GAPDH expression ($21.39 + 1.72$). Values of between Ct have the following meanings: $p < 0.05$, lower exposure values were found in the lungs, esophagus and sisally above, the liver being the most expressive tissue. Thus, an expression of β -Defensin has been introduced in four different instances and may be related to the presence of microorganisms or toxic substances.

Palavras-chave: Cattle, DEFB1, Immunity, RNA, RT-PCR

Introdução

Os animais de produção são diariamente expostos a diversos microrganismos que os atacam, sendo necessária a ação de mecanismos de defesa. Assim, faz-se presente a primeira linha de defesa, o sistema imune inato. Produzidas por

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

leucócitos e células epiteliais, as defensinas são peptídeos catiônicos antimicrobianos (AMPs), que agem diretamente contra bactérias, vírus envelopados e fungos (BAGNICKA, E. et al., 2010). Logo, o estudo dos níveis de expressão da Defensina do sistema imune inato em bovinos contribuirá futuramente como ferramenta na seleção de animais resistentes a diferentes patógenos. O presente trabalho objetivou avaliar os perfis de expressão gênica da Defensina em células mononucleadas do sangue, do pulmão, do esôfago e do fígado de bovinos.

Material e Métodos

Este estudo foi submetido e consentido pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), número 033/2013 (CEUA) – 23084.008277/2013-26 (UFRA).

As amostras de sangue, esôfago, pulmão e fígado foram coletadas de cinco animais adultos da raça Nelore do matadouro pertencente à Cooperativa da Indústria e Pecuária do Pará (Socipe), no município de Belém. Após a coleta as amostras foram armazenadas à temperatura de -20 °C até a extração de DNA. As amostras de sangue foram coletadas assepticamente em tubos coletores de 5 mL contendo anticoagulante (EDTA), por meio de punção a vácuo do vaso jugular. Foram coletadas das amostras de tecidos apenas 2 mg, em seguida foram congeladas em gelo seco e armazenadas no laboratório para extração de RNA total.

A extração do RNA foi realizada através do reagente Trizol (Life Technologies, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração do RNA total, realizou-se a quantificação usando espectrofotômetro Epoch™ multi-volume (BioTek, USA).

Para quantificação da expressão do RNA foi utilizado o SYBR® Green Quantitative RT-PCR Kit One step (Life Technologies, USA) e dois pares de primers que amplificam respectivamente, um fragmento de 101 pares de bases (pb) do gene β -Defensina 1 (DEFB1) de *Bos taurus* e um fragmento de 124 pb de um gene de

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

expressão constitutiva como controle, o GAPDH (Forward: 5'-CATACGAATGGAGGCATCTGT-3' e Reverse: 5'-TACCACGACCTGCAGCATT-3'), (Forward: 5'-AGAAGACTGTGGATGGCCC-3' e Reverse: 5'-CCGTTGAGCTCAGGGATGA-3'). As reações foram realizadas no Termociclador CFX-96™ Real-Time System sob as seguintes condições de temperatura, o programa de ciclagem de cada gene inclui a ativação da enzima a 43 °C por 30 minutos, 94 °C por 2 minutos, em seguida 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de pareamento dos primers com temperatura de 60 °C para DEFB1 e GAPDH, respectivamente. As RT-PCR das amostras foram realizadas em duplicata. Para os valores de Ct do GAPDH foi realizada uma estatística descritiva. Adiante, foram determinados os valores de ΔCt (Ct DEFB1 – Ct GAPDH) para a realização do teste ANOVA paramétrico, seguido do teste Tukey com nível de significância de 0,05 para comparação das médias entre os órgãos. Todas as análises foram realizadas no programa SAS 8.0 (SAS Institute, Inc. 2000).

Resultados e Discussão

Foram descritos os valores de Ct para o GAPDH entre todos os tecidos analisados, para determinar se o gene era adequado á manutenção da transcrição da DEFB1. Foram constatados níveis consistentes da expressão do GAPDH entre todos os tecidos (média \pm desvio padrão = 21,39+1,72), com exceção do esôfago (média \pm desvio padrão = 22,47+5,81) na (Tabela 1).

Tabela 1: Expressão do gene GAPDH em diferentes tecidos de bovinos da raça Nelore pela técnica da PCR em tempo real (RT-PCR). Média e desvio-padrão dos valores de Ct

Tecidos	Média de Ct	Desvio Padrão	Valor Mínimo (Ct)	Valor Máximo (Ct)
Sangue	18,94	0,23	18,81	19,44
Pulmão	17,94	2,96	17,52	25,21
Esôfago	22,47	5,81	20,53	36,45
Fígado	21,59	0,69	20,16	22,14

Ct: Threshold cycle

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Os valores de ΔCt entre os tecidos apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) demonstrando que a DEFB1 se expressa de forma diferente entre os órgãos como observado por Mirabzadeh-Ardakani et al. (2015). Os menores valores de expressão foram observados nos tecidos de pulmão, esôfago e sangue respectivamente, sendo o fígado o tecido com maior expressão.

Os valores para tecidos com baixa expressão corroboram com os analisados por Mirabzadeh-Ardakani et al. (2015), com exceção do fígado que no presente estudo apresentou alta expressão. Segundo Ryan et al. (1998), essa alta expressão pode ser regulada por componentes bacterianos, tais como: lipopolissacarídeos (LPS), LPS livres ou por partículas inflamatórias ambientais. E de acordo com Alva-Murilo et al. (2012), a alta expressão no fígado também pode ser provocada devido à toxicidade alimentar. Os autores citados anteriormente, observaram que a DEFB1 no pulmão é regulada por diferentes partículas inflamatórias nos BAM (macrófagos alveolares bovino) em resposta a LPS. Os valores de expressão da DEFB1 nos tecidos estão demonstrados na (Figura 1).

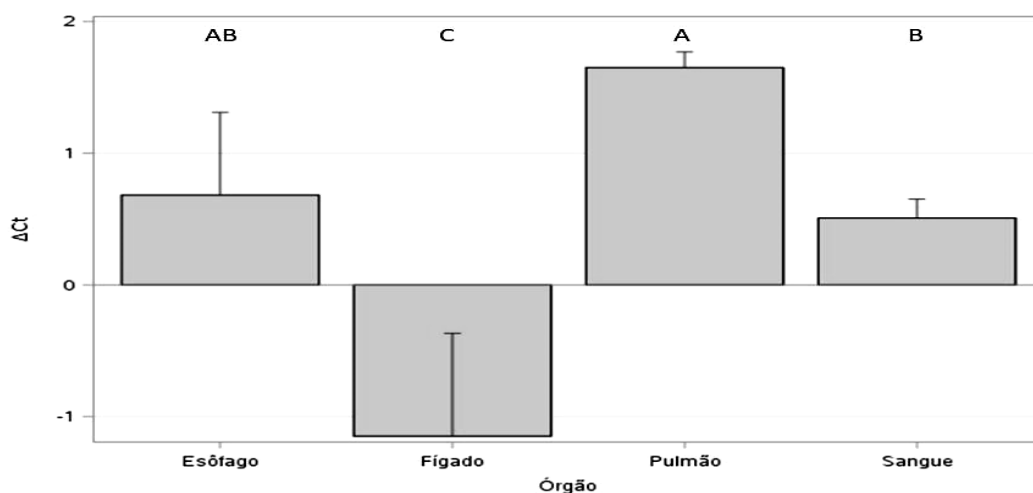


Figura 1. Gráfico demonstrativo de expressão da DEFB1 nos diferentes órgãos. Baixos valores de ΔCt representa aumento da expressão gênica.

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Conclusão

A expressão da DEFB1 nos quatro tecidos analisados foi diferente e essa distinção pode estar relacionada à presença de partículas microbiais ou de substâncias tóxicas.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através do PIBIC. E a Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, pela graça de estar desfrutando de um de seus melhores cursos, a Zootecnia.

Referências

- ALVA-MURILLO N., TÉLLEZ-PÉREZ A. D., SAGRERO-CISNEROS E, LÓPEZ-MEZA JE, OCHOA-ZARZOSA A. **Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells.** Cell Immunol 280(1): 108-12, 2012.
- BAGNICKA, E. et al. **Expression and polymorphism of defensins in farm animals.** Acta Biochimica Polonica, v.57, n.4, p.487-497, 2010.
- MIRABZADEH-ARDAKANI, A; SOLIE, J; GONZALEZ-CANO, P; SCHMUTZ, S. M; GRIEBEL P. J.; **Tissue and age-dependent expression of the bovine DEFB103 gene and protein.** Cell Tissue Research 363: 479- 490, 2015.
- RYAN L. K., RHODES J., BHAT M., DIAMOND G. **Expression of β -Defensin Genes in Bovine Alveolar Macrophages.** Infect Immun 66(2): 878–881, 1998.

Os autores listados abaixo concordam com a submissão e publicação do resumo expandido “PERFIS DE EXPRESSÕES DO GENE DEFENSINA EM DIFERENTES TECIDOS BIOLÓGICOS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE.”

Cintia Luana Pinheiro Santos; Rafaelle Casseb Guimarães; Alexandre do Rosário Casseb; Elizabeth Machado Barbosa; Ednaldo da Silva Filho.