



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

www.ufpel.edu.br/nupeec



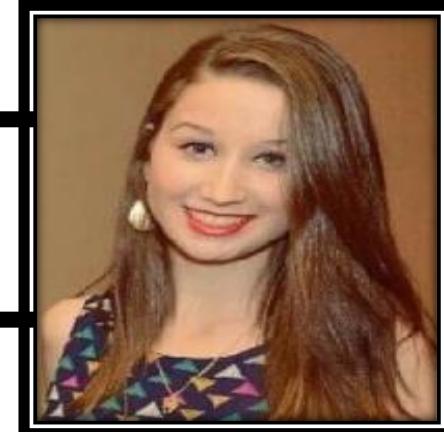
**Perfil da expressão gênica em vacas leiteiras
com hipocalcemia clínica**

SEMINARISTAS



Kauani Borges Cardoso
Graduanda em Zootecnia

Milena Bugoni
Graduanda em Zootecnia



ARTIGO



Fator de Impacto: 2.749



J. Dairy Sci. 97:247–258

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7049>

© American Dairy Science Association®, 2014.

Microarray-based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever

K. Sasaki,*†‡ N. Yamagishi,*†¹ K. Kizaki,*† K. Sasaki,‡ B. Devkota,†§ and K. Hashizume*†

*United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan

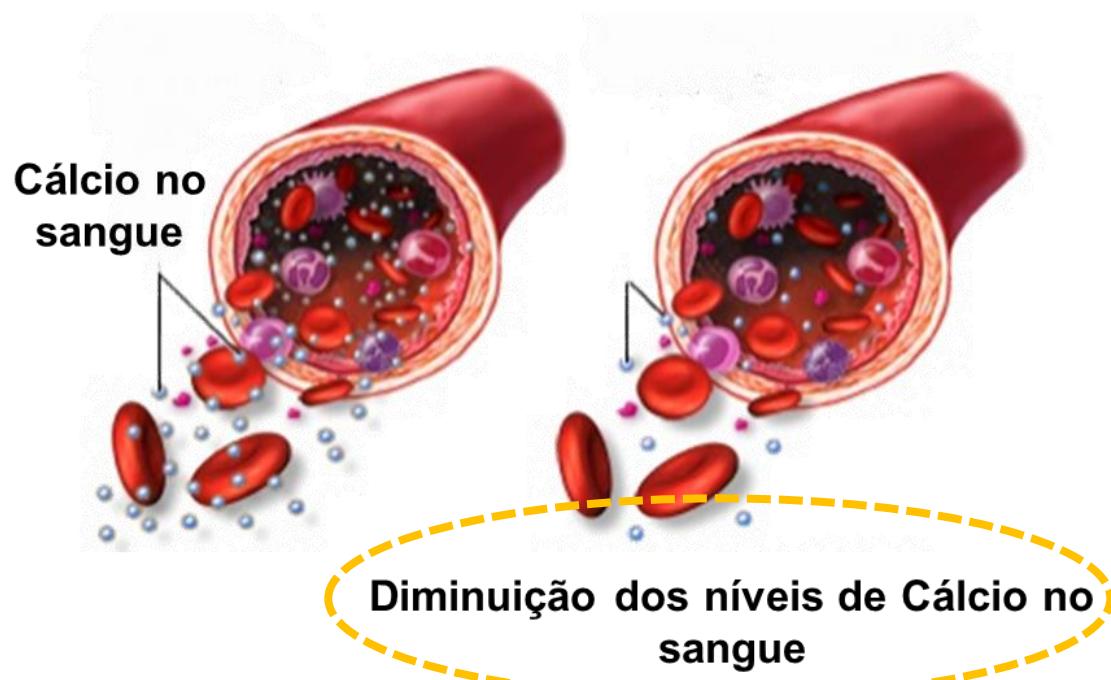
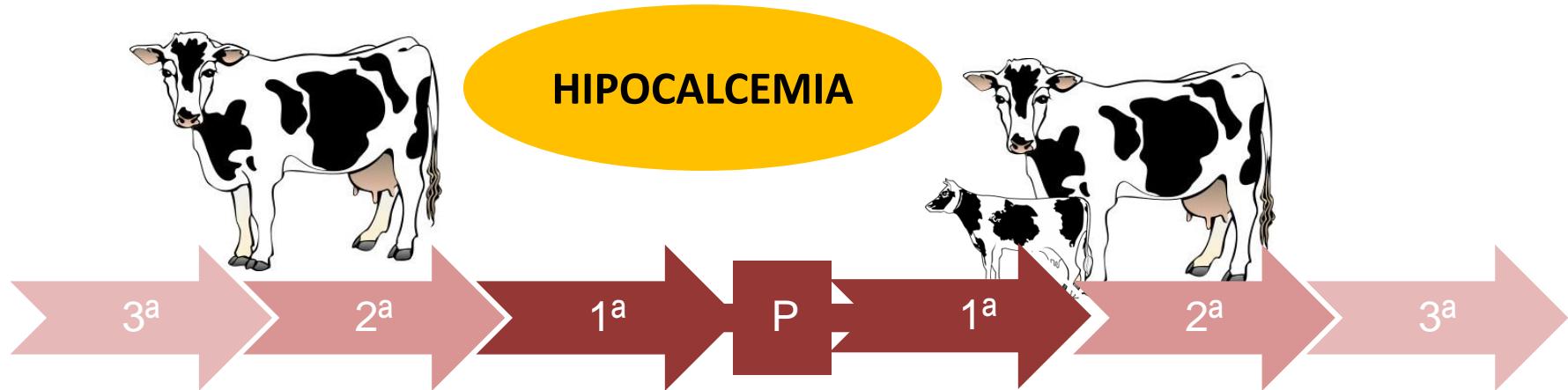
†Cooperative Department of Veterinary Medicine, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

‡Iwate Veterinary Hospital, Iwate-machi, Iwate 028-4307, Japan

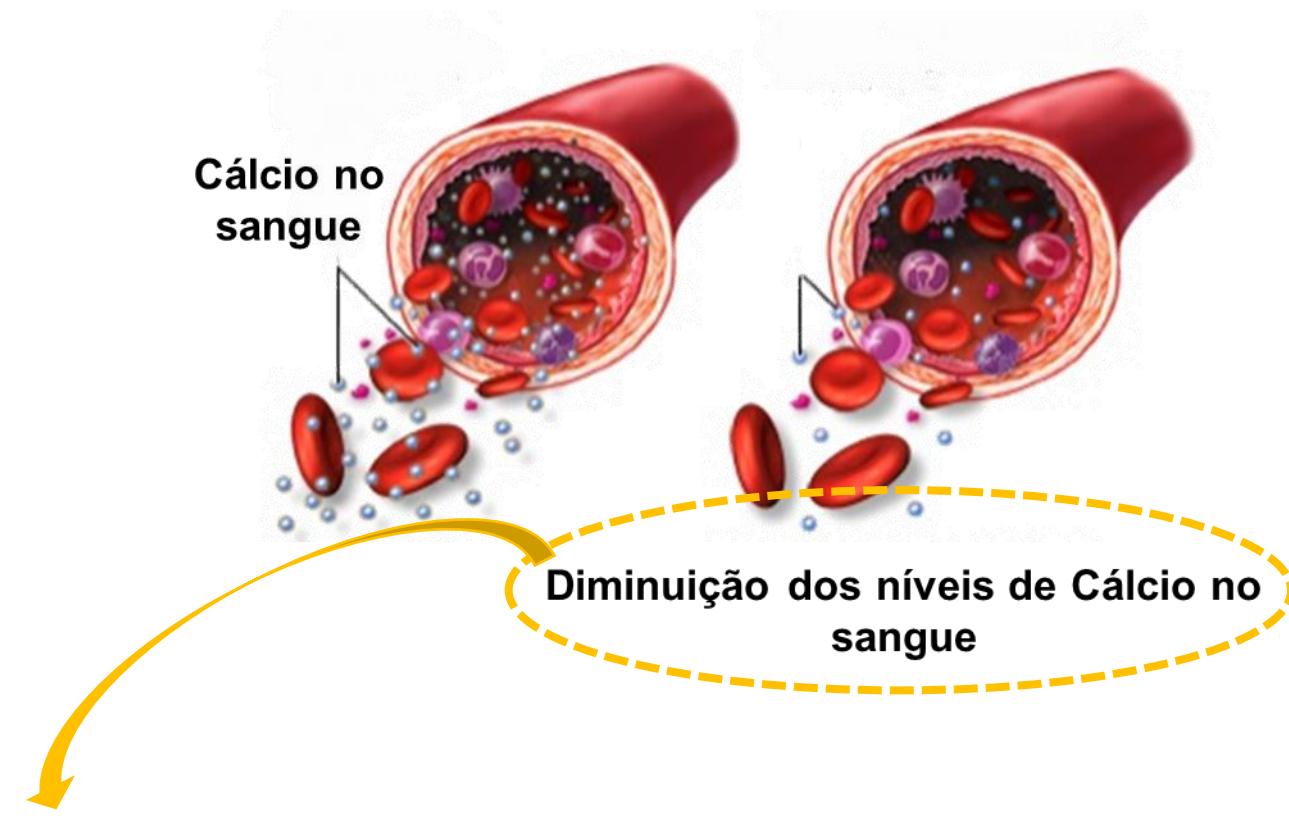
§Biotechnology Center, Agriculture and Forestry University, Chitwan, Nepal

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA BASEADA EM MICROARRANJO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO EM VACAS LEITEIRAS COM HIPOCALCEMIA INDUZIDA E ESPONTÂNEA

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO



Aumento na
demanda de Ca

associado

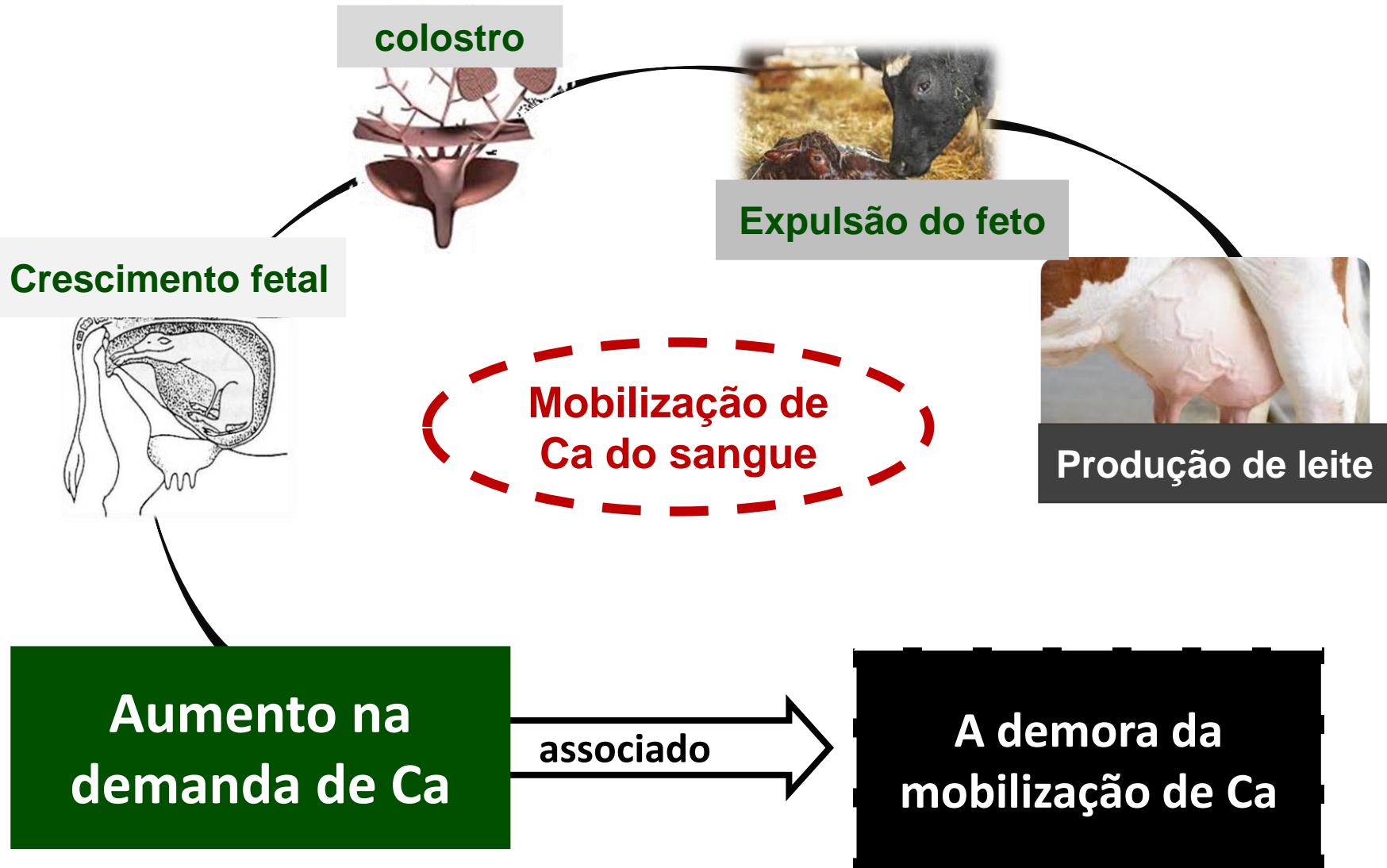
A demora da
mobilização de Ca

PERGUNTAS



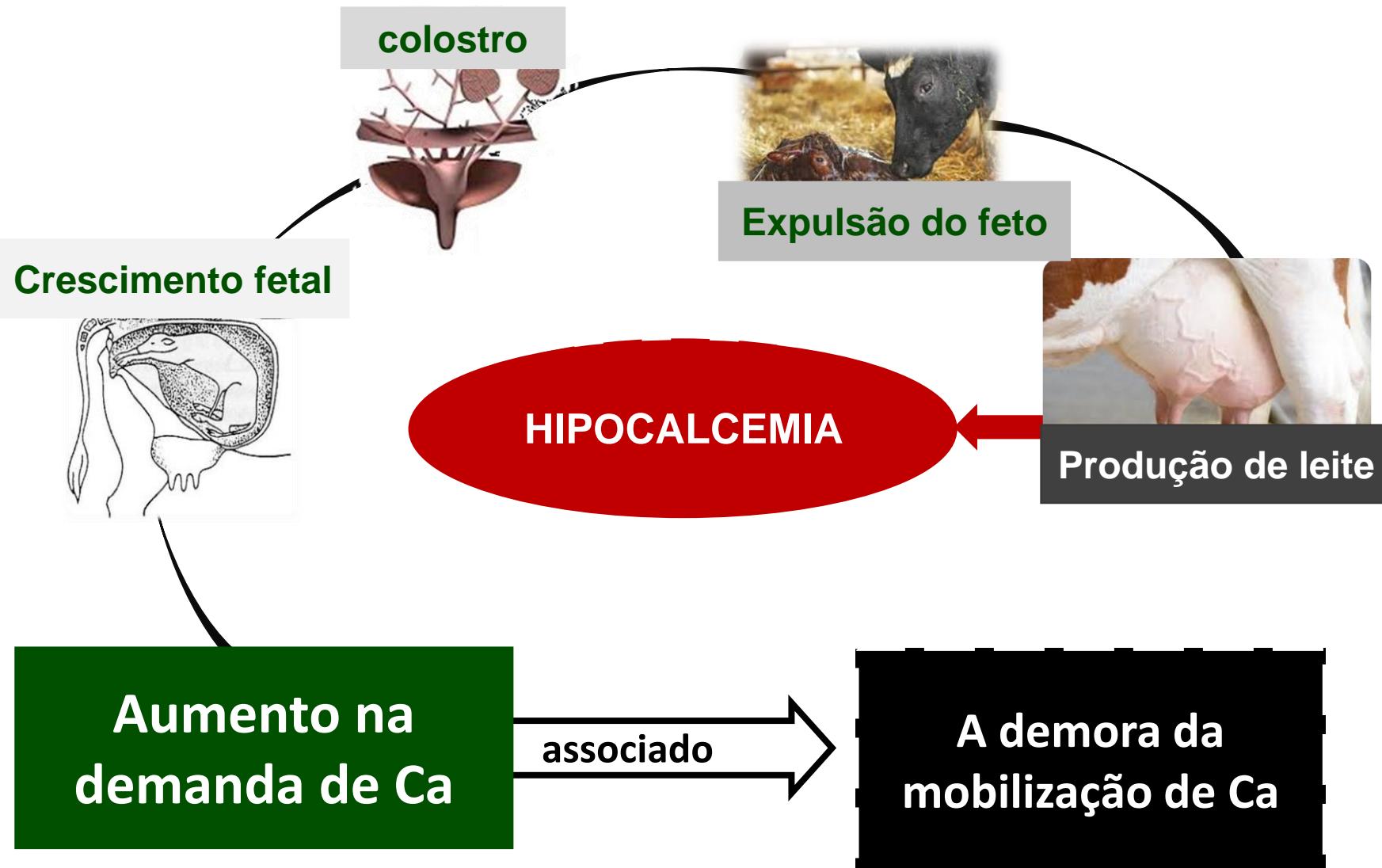
**Quais os fatores que aumentam a demanda
de Ca nesse período?**

INTRODUÇÃO



(BROZOS, et al., 2011; MARTINEZ, et al., 2012)

INTRODUÇÃO



(BROZOS, et al., 2011; MARTINEZ, et al., 2012)

INTRODUÇÃO



Hipocalcemia

Clínica

< 5,5 mg/dL

Subclínica

8,0 – 5,5 mg/dL

Níveis de Ca
no sangue

CLÍNICA



INTRODUÇÃO

Hipocalcemia

Clínica

< 5,5 mg/dL

Subclínica

8,0 – 5,5 mg/dL

Níveis de Ca
no sangue

CLÍNICA

Pode acometer 5% dos animais
de um rebanho de alta produção

Predispor a
ocorrência de outras
enfermidades



PERGUNTAS



**Quais enfermidades que ela está
relacionada?**

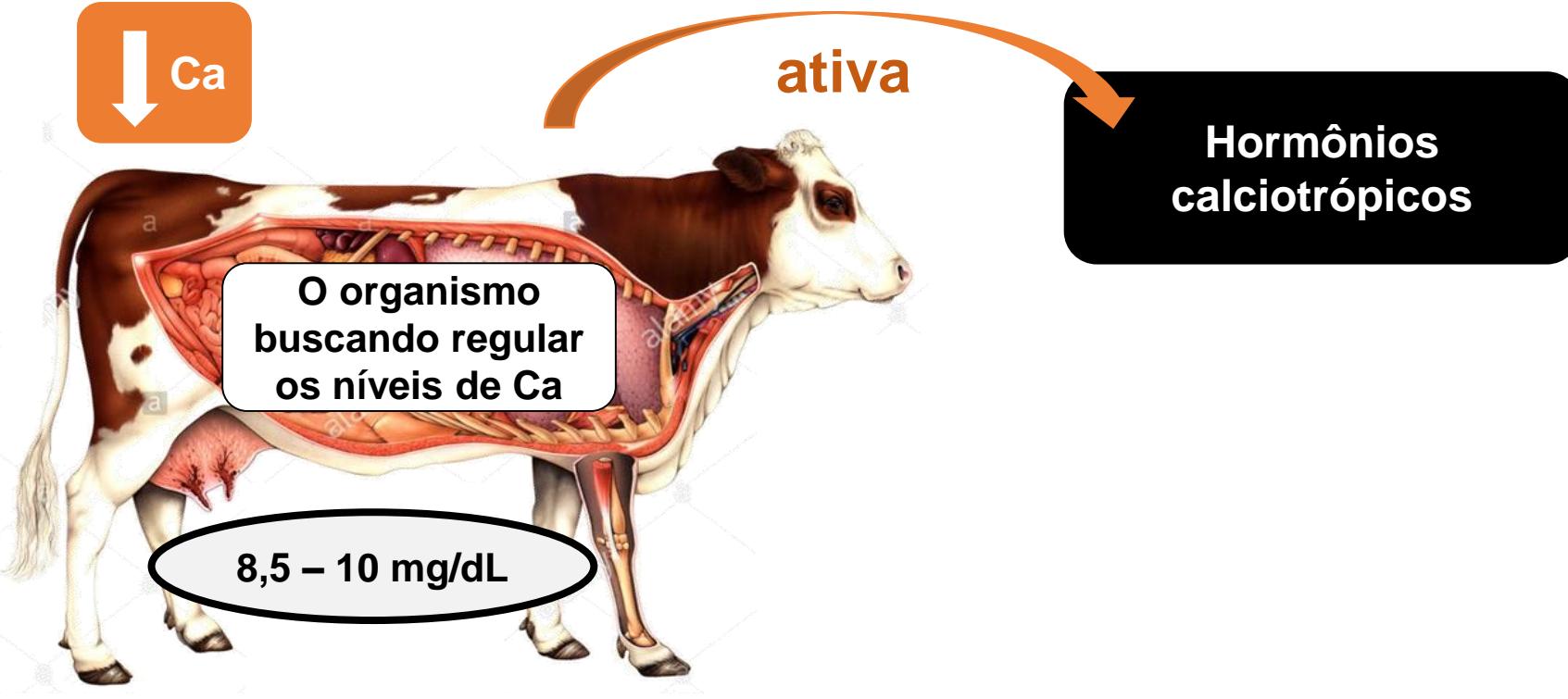
INTRODUÇÃO

Predispor a ocorrência
de outras enfermidades

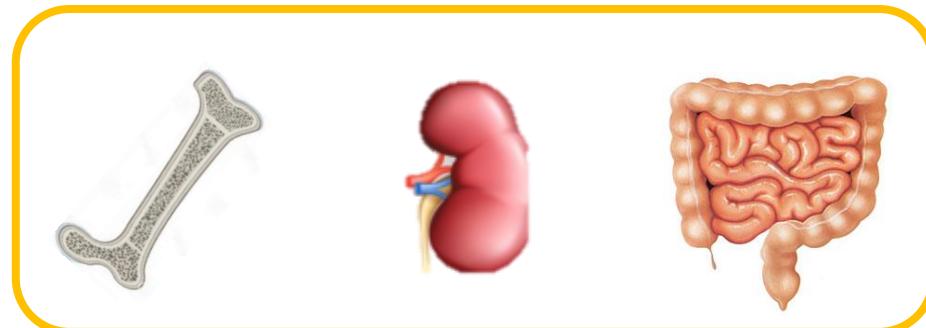
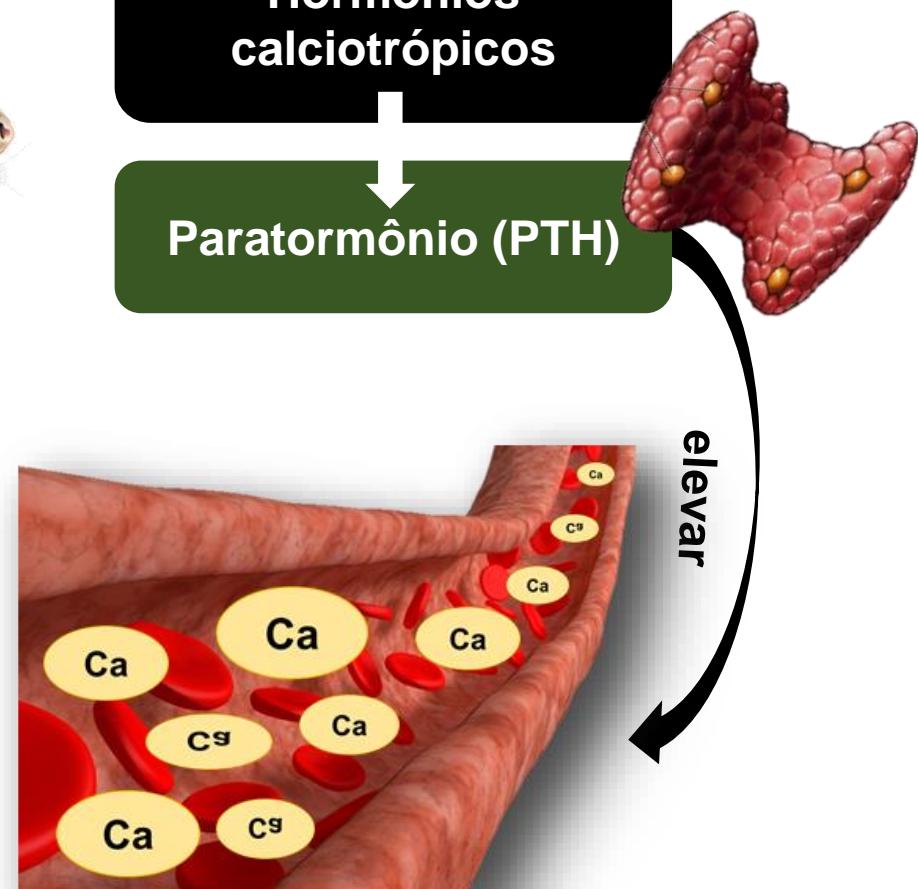
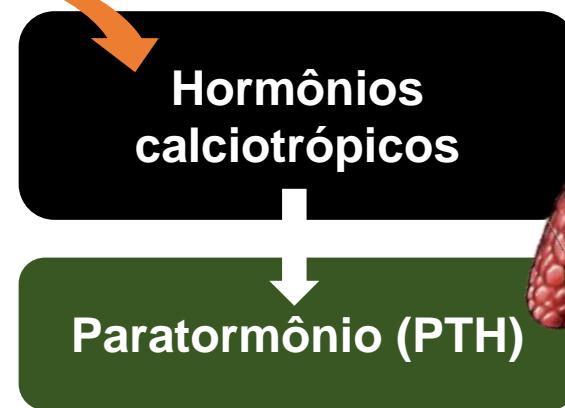
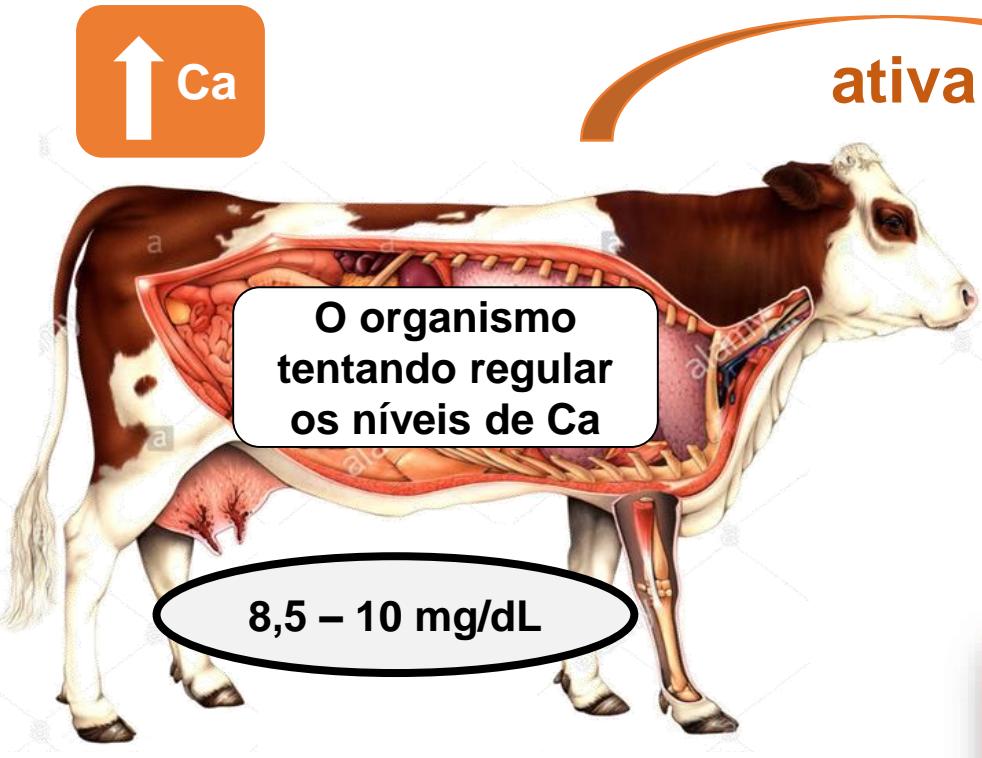
- Deslocamento de abomaso
- Retenção de placenta
- Metrite
- Retardo da involução uterina
- Mastite



INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO



(BROZOS et al., 2011)

INTRODUÇÃO



(BROZOS et al., 2011)

Processo de homeostase

Eficiente

INTRODUÇÃO



(BROZOS et al., 2011)

Processo de homeostase

Eficiente

(GOFF, 2014)

LENTO

72 horas
Decisivo para
a saúde e
produção da
vaca



INTRODUÇÃO

Processo de homeostase

Altamente eficiente

(GOFF, 2014)

72 horas

**Decisivo para
a saúde e
produção da
vaca**



**Quando o mecanismo não da
conta de suprir a demanda de Ca**

HIPOCALCEMIA

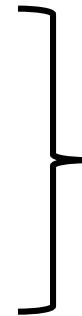
**Recrutamento de células
de defesa**

Processo de inflamatório

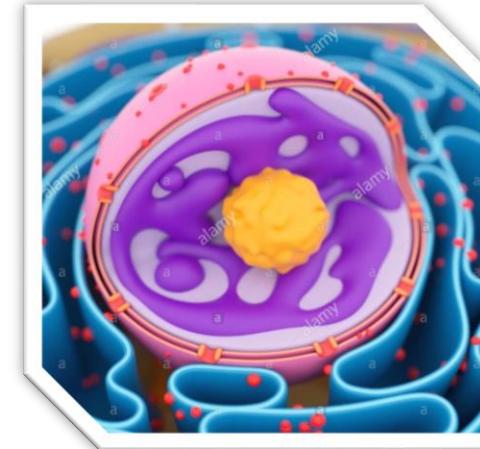


INTRODUÇÃO

Linfócitos
Monócitos
Macrófagos
Células *Natural Killer*



IMUNOLOGIA



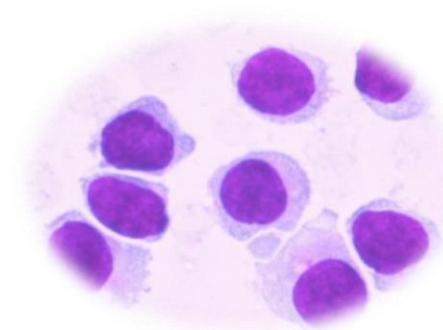
A expressão gênica
de leucócitos



Identificar biomarcadores
de patologia - estado
fisiológico



Células mononucleares do sangue



(Almeida et al., 2007; Newman et al., 2011; Ishida et al., 2013)

INTRODUÇÃO

Técnicas são utilizadas

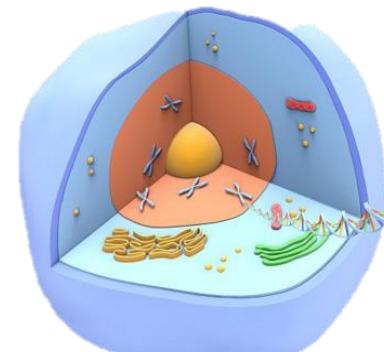
Vários tecidos (rim, fígado)

Biomarcadores da
hipocalcemia

INÍCIO

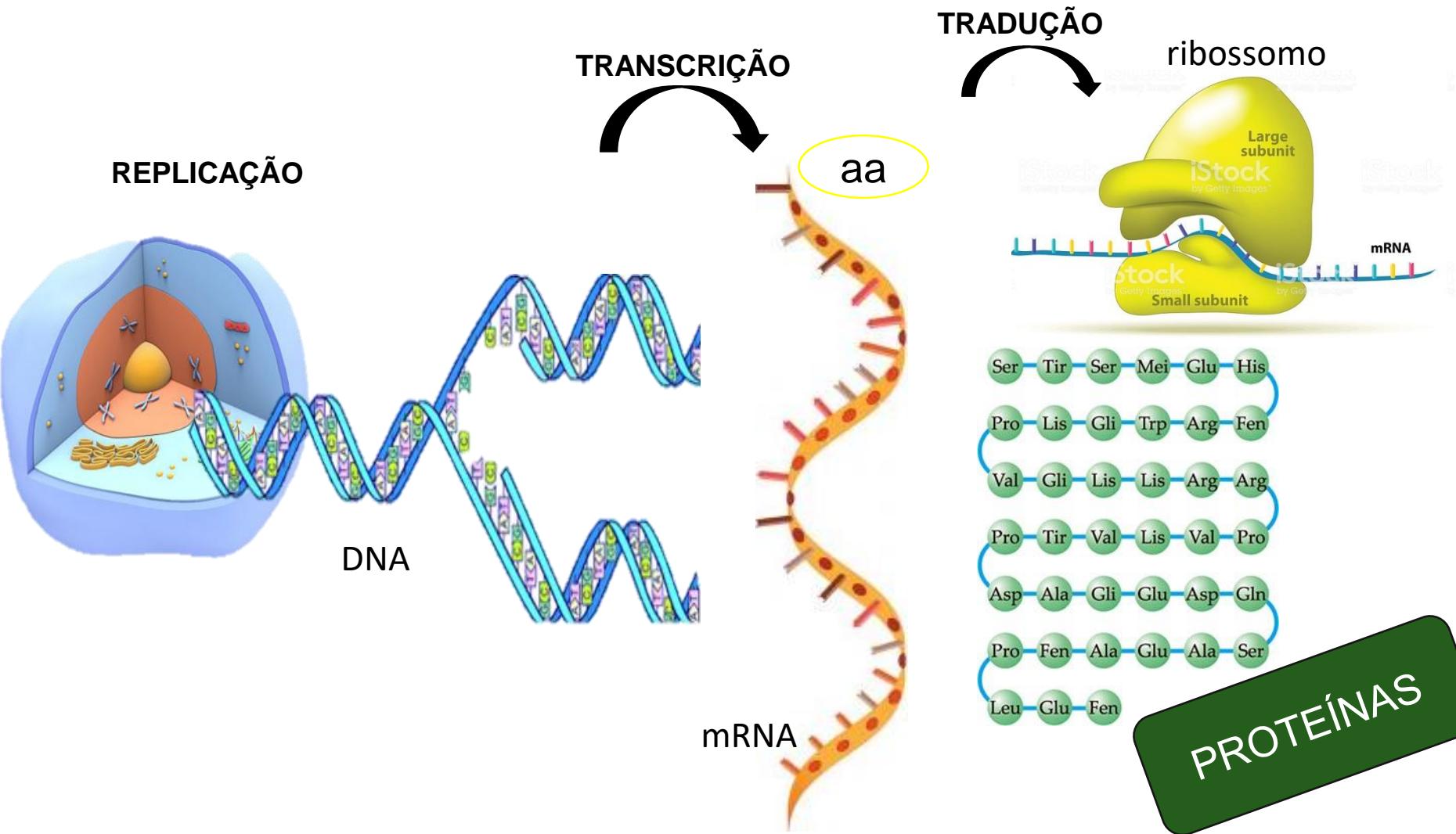
Expressão de milhares de
genes

Esclarecer mecanismos
moleculares de doenças



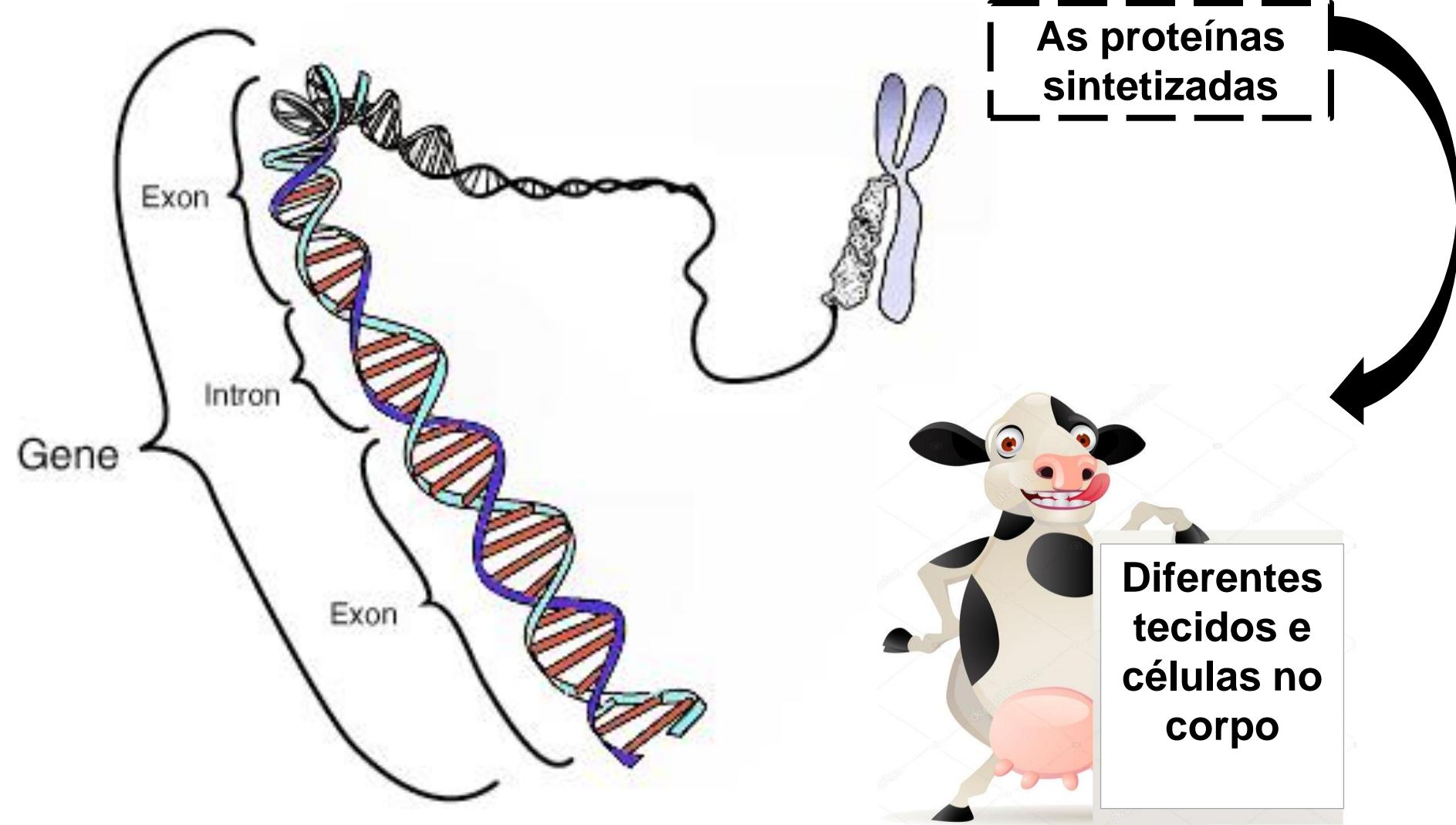
INTRODUÇÃO

EXPRESSÃO GÊNICA



INTRODUÇÃO

EXPRESSÃO GENICA



INTRODUÇÃO

Abordagem Molecular

CLAUDICAÇÃO

(Almeida et al., 2007)

CETOSE

(Loor et al., 2007)

MASTITE

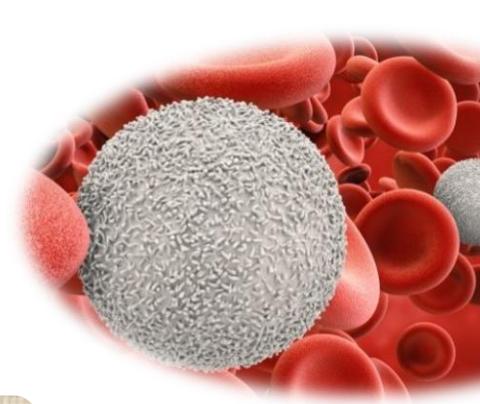
(Lutzow et al., 2008)

DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

(Newman et al., 2011)

RETARDO DE CRECIMIENTO

(Ishida et al., 2013)





OBJETIVO

Identificar potenciais biomarcadores através do perfil da expressão gênica de células mononucleares de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica induzida e espontânea.

MATERIAIS E MÉTODOS



Hipocalcemia induzida

→ n= 4 animais

→ ±7 anos de idade

→ Alojadas
individualmente

→ Não prenhas

Hipocalcemia espontânea

→ n= 13 animais

→ ± 6,5 anos de idade

→ Não especificado
pelo autor

→ Prenhas

MATERIAIS E MÉTODOS



17 vacas leiteiras

Experimentos

Hipocalcemia
induzida

Hipocalcemia
espontânea



EDTA Na



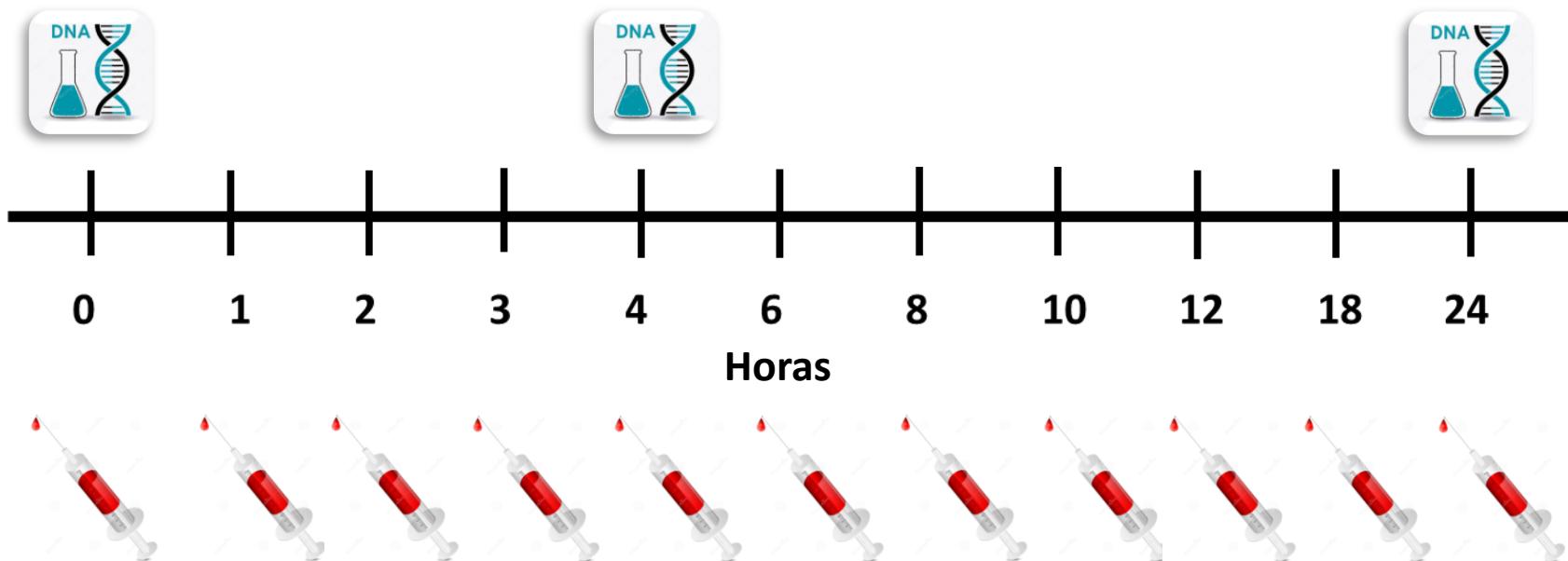
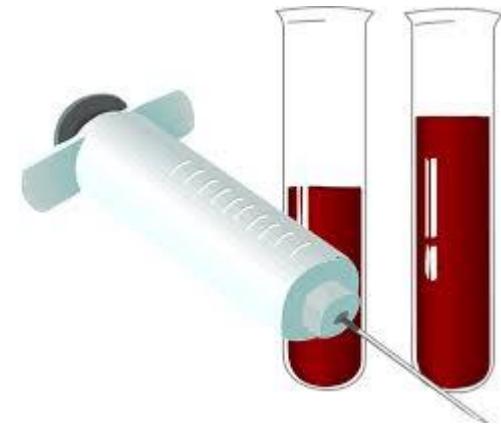
EDTA Ca

Induzidas por 4 h

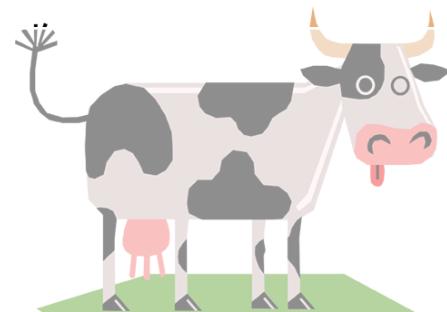
MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas de sangue

Análise
Concentrações de Ca
Expressão gênica



MATERIAIS E MÉTODOS

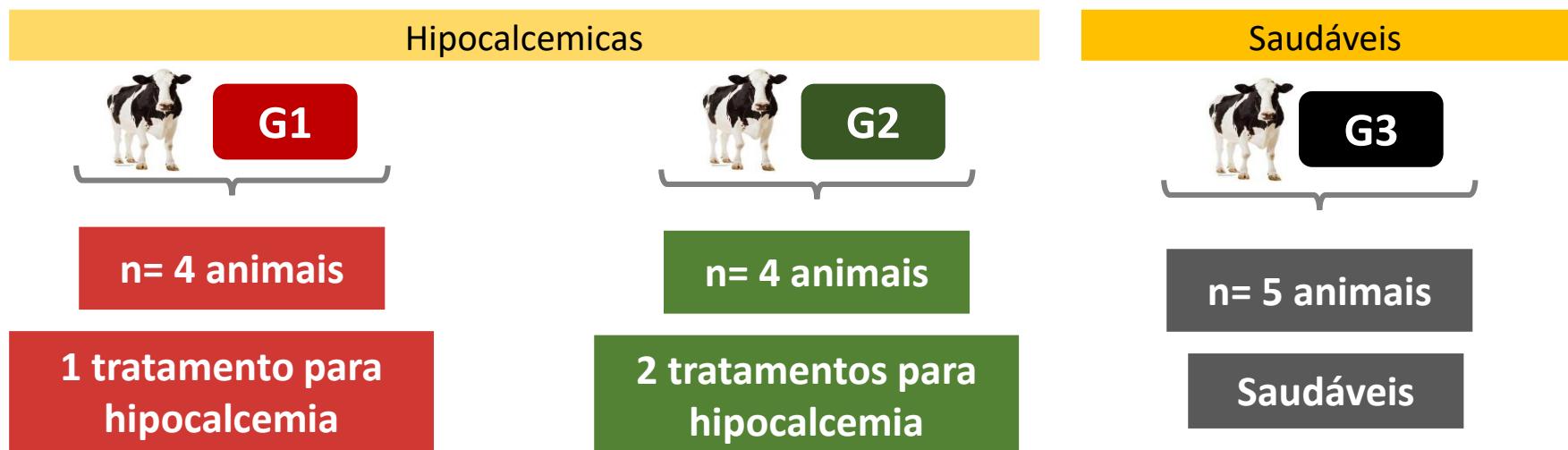


17 vacas leiteiras

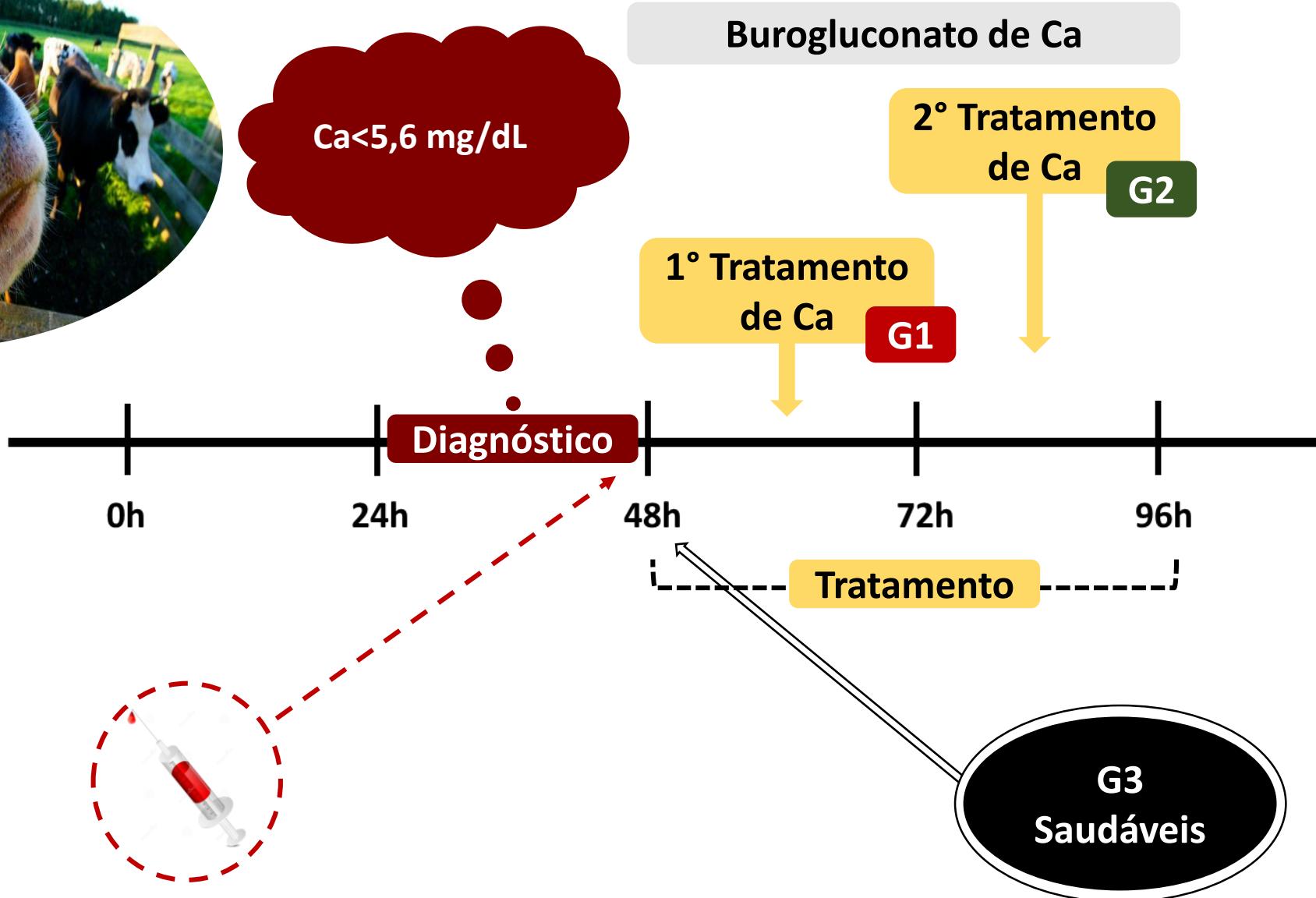
Hipocalcemia
induzida

Experimentos

Hipocalcemia
espontânea



MATERIAIS E MÉTODOS



MATERIAIS E MÉTODOS

Análises Bioquímicas



Ca

P

PTH

Analisador automático Accute

MATERIAIS E MÉTODOS



Análises Bioquímicas

Ca

P

PTH

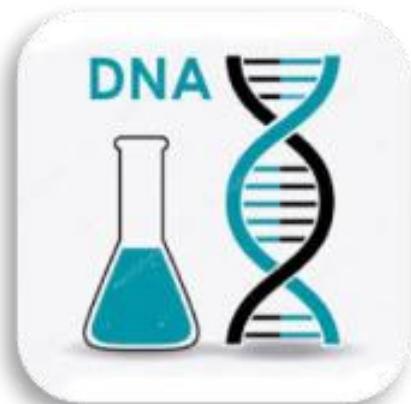
Imunoensaio de
eletroquimioluminescência



MATERIAIS E MÉTODOS



Expressão gênica



Microarranjo

PCR



MATERIAIS E MÉTODOS



Análise estatística



Os dados do Microarranjo foram analisados usando o GeneSpring 12.0 e o software SigmaPlot

Níveis de cálcio (Experimento Indução) foi analisado através de medidas repetidas

Teste unidirecional e Tukey foram usados para avaliar as diferenças entre a expressão gênica entre os 3 grupos (G1, G2 e G3)

A significância para todos os testes foi estabelecida como $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



www.superwallpapers.com.br



Resultados e Discussão

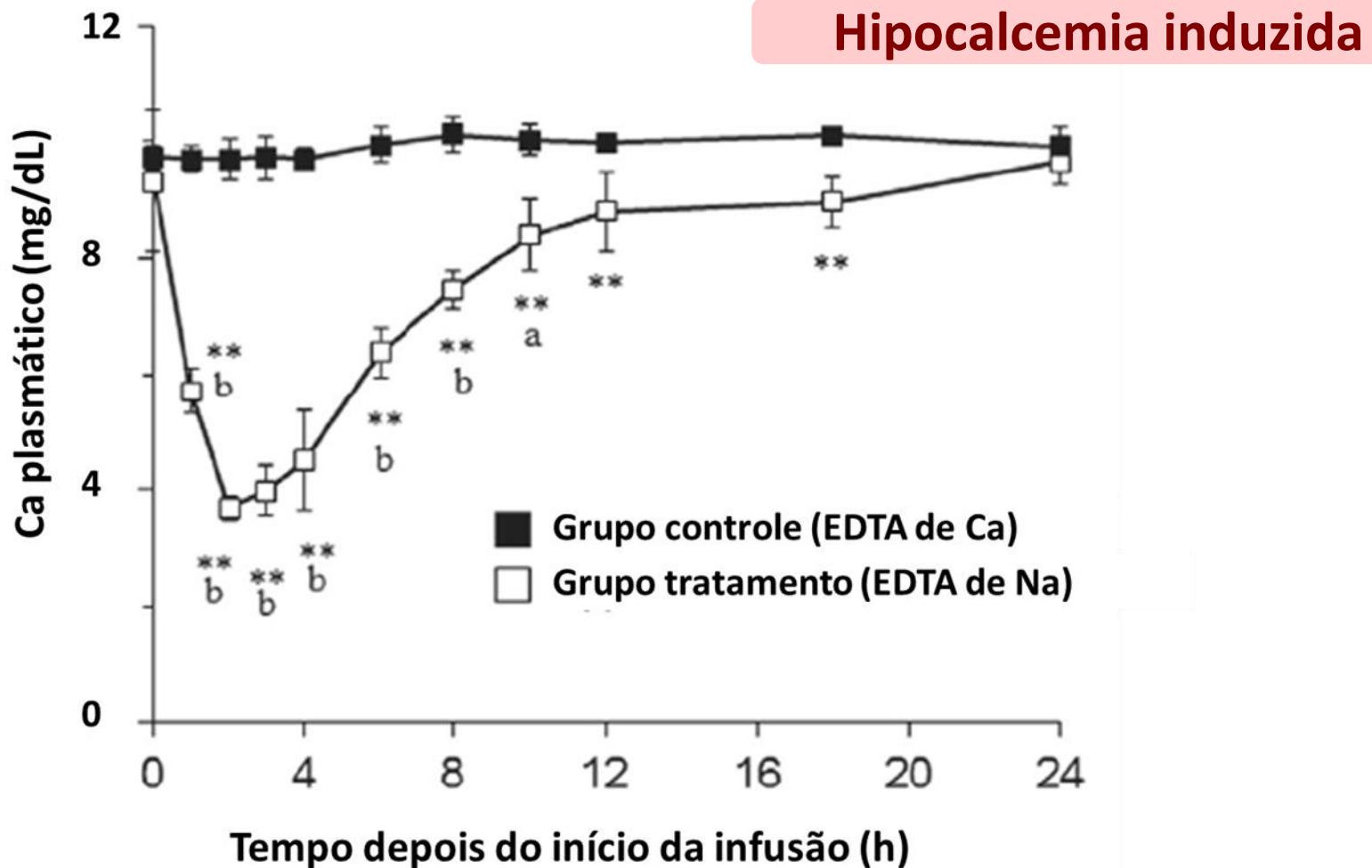


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA-Na₂ ou EDTA-Ca.

Resultados e Discussão

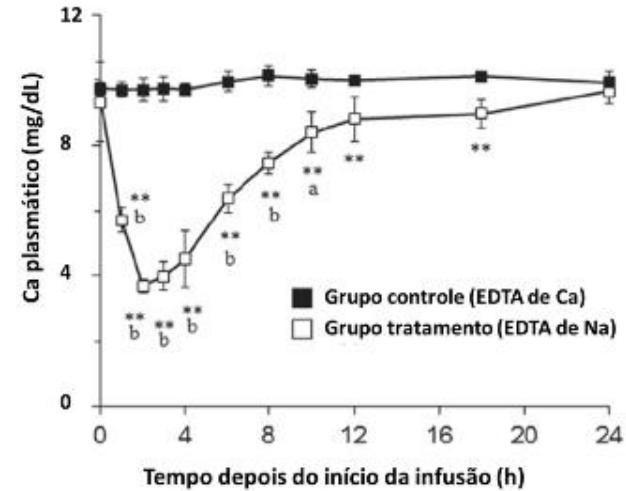
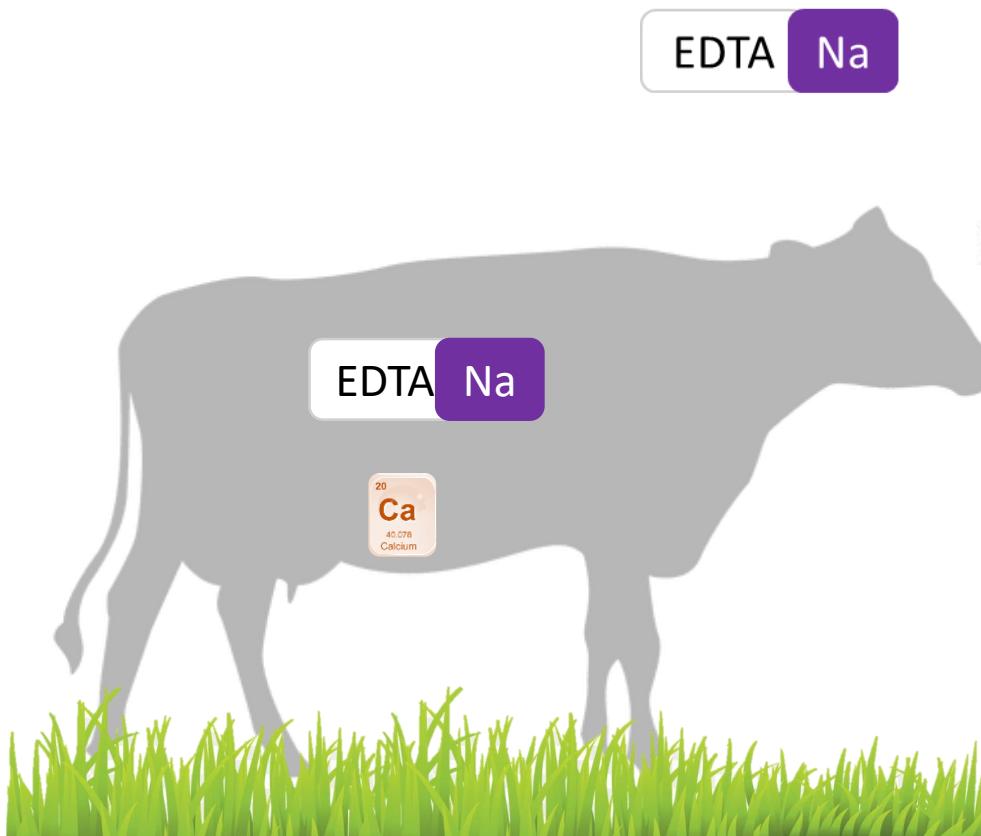


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA-Na₂ ou EDTA-Ca.

Resultados e Discussão

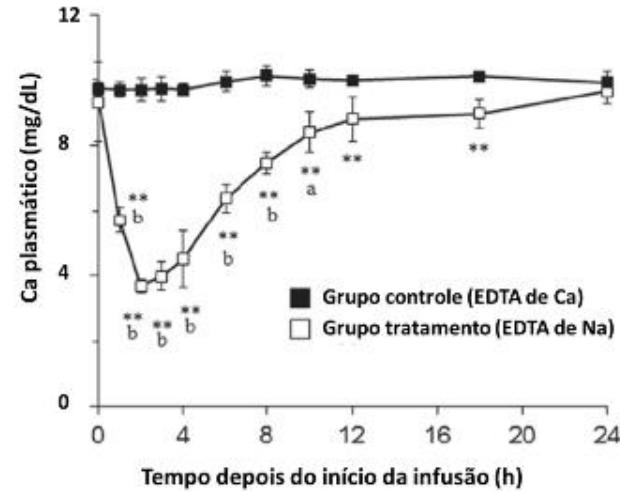
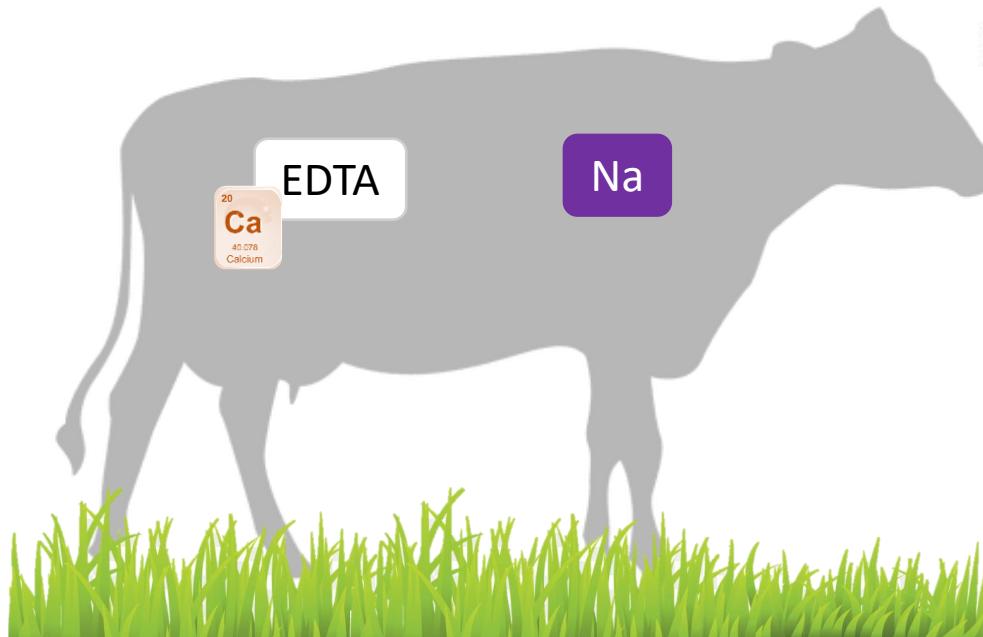


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA- Na_2 ou EDTA-Ca.



Resultados e Discussão

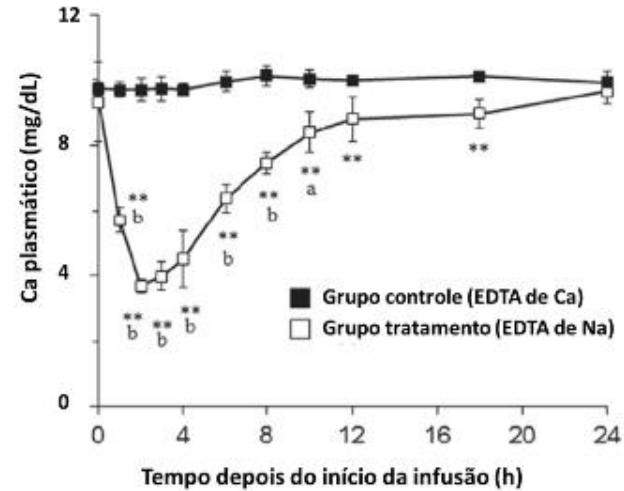


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA- Na_2 ou EDTA-Ca.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos de vacas com hipocalcemia espontânea (grupos G1 e G2) e vacas clinicamente saudáveis (grupo G3).

Item	G1	G2	G3
Ca (mg/dL)	3,6 ± 0,8 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	9,6 ± 0,1 ^b
P(mg/dL)	0,22 ± 0,4 ^a	0,19 ± 0,4 ^a	0,48 ± 0,1 ^b
PTH	346,0 ± 122,4 ^a	606,0 ± 653,3 ^a	71,6 ± 48,0 ^b

a, b valores com diferentes sobrescritos em cada parâmetro indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).



Resultados e Discussão

Hipocalcemia espontânea

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos de vacas com hipocalcemia espontânea (grupos G1 e G2) e vacas clinicamente saudáveis (grupo G3).

Item	G1	G2	G3
Ca (mg/dL)	3,6 ± 0,8 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	9,6 ± 0,1 ^b
P(mg/dL)	0,22 ± 0,4 ^a	0,19 ± 0,4 ^a	0,48 ± 0,1 ^b
PTH	346,0 ± 122,4 ^a	606,0 ± 653,3 ^a	71,6 ± 48,0 ^b

a, b valores com diferentes sobrescritos em cada parâmetro indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).



Devido o aumento
da demanda

Demora dos mecanismos
de homeostase



Devido a relação
C:P

Produção



Resposta do organismo a queda do Ca

RESULTADOS

Genes diferencialmente expressos entre vacas com hipocalcemia clínica espontânea (G1 e G2) e vacas clinicamente saudáveis (G3)

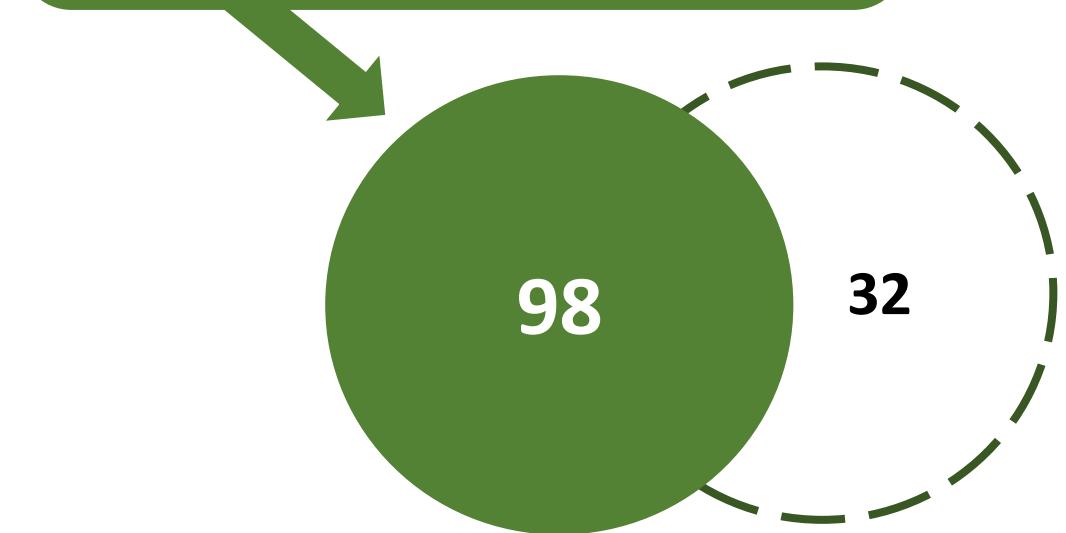


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clínica induzida e hipocalcemia clínica espontânea.

RESULTADOS

Genes cuja expressão foi diferente entre o grupo de vacas induzidas a hipocalcemia clinica (EDTA-Na₂) e o grupo controle (EDTA-Ca)

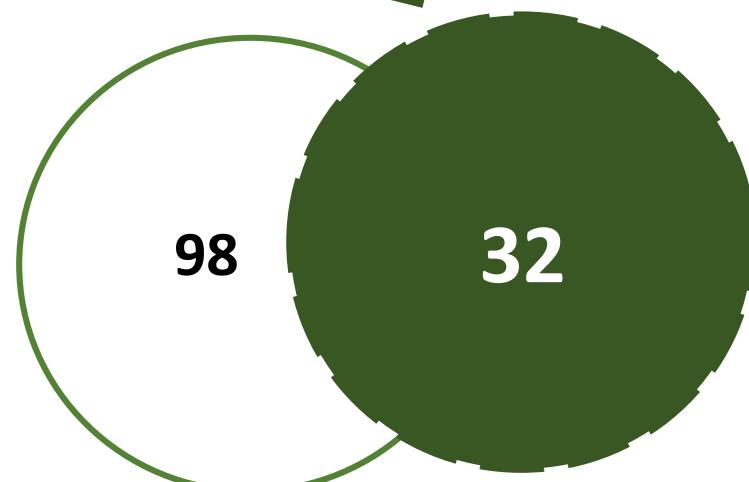


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clinica induzida e hipocalcemia clinica espontânea.

RESULTADOS

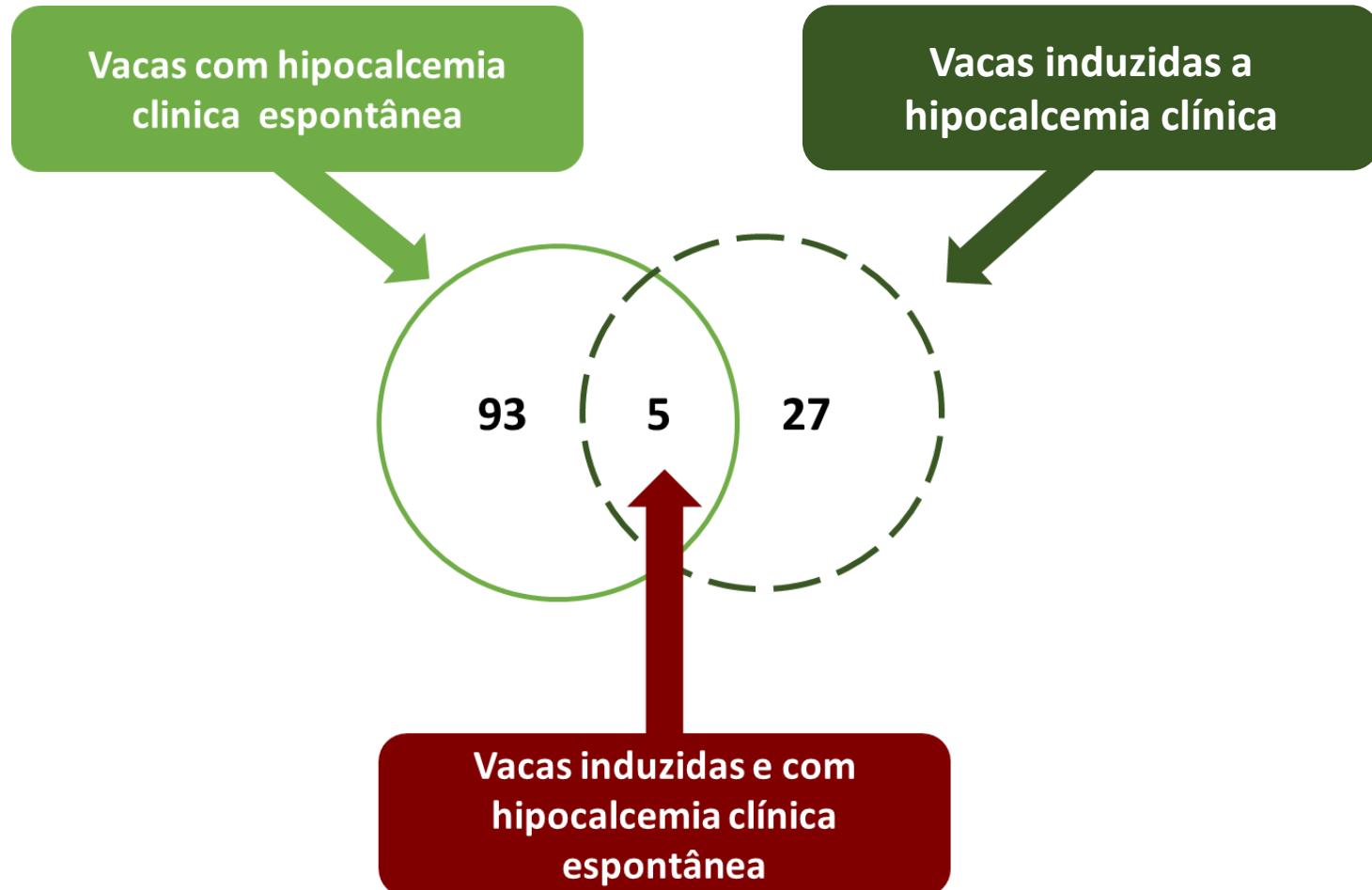
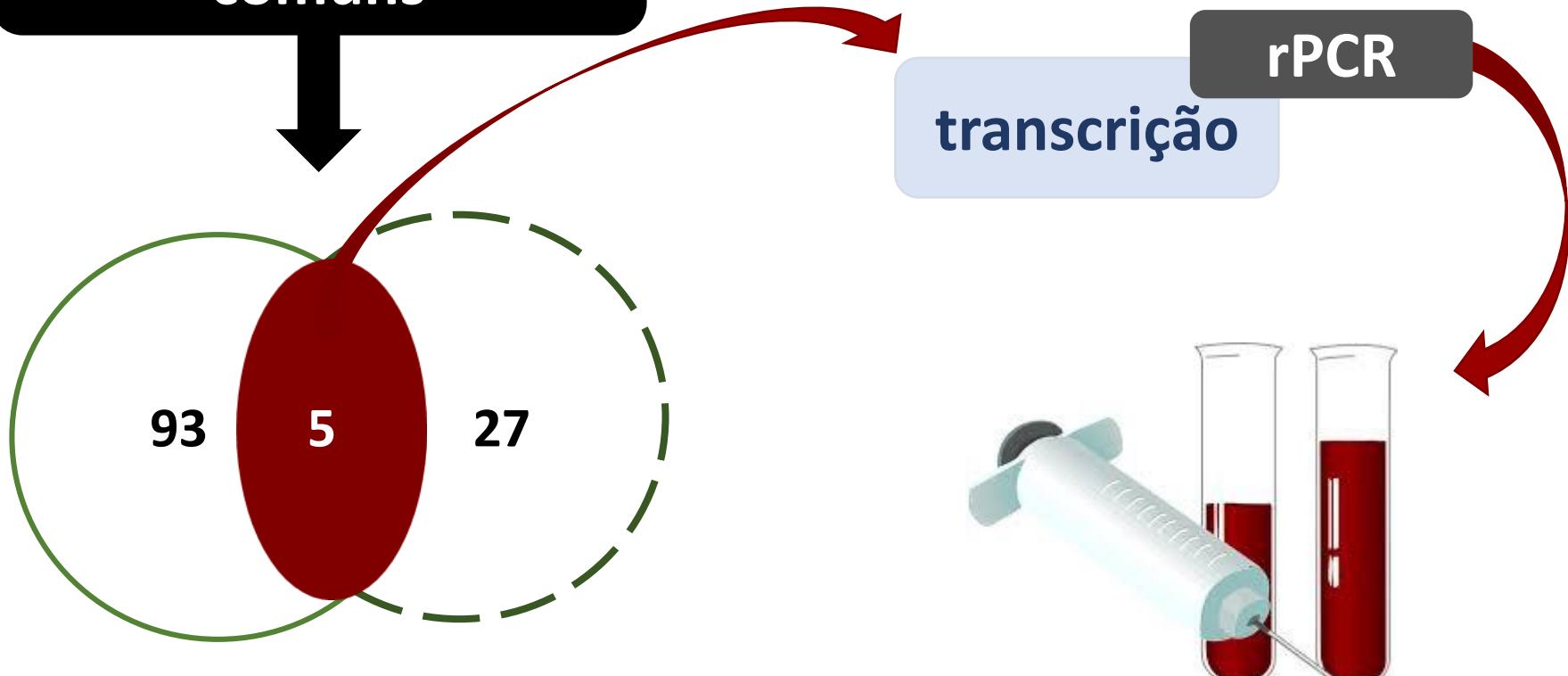


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clínica induzida e hipocalcemia clínica espontânea.

RESULTADOS

Expressão de genes
comuns



G1

G2

G3

RESULTADOS

Expressão gênica

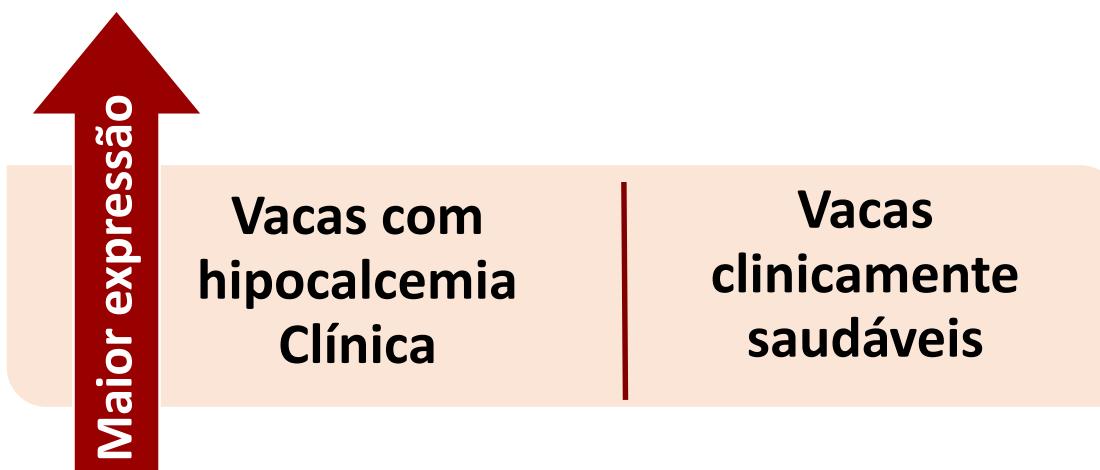
PKIB

DDIT4

PER1

NUAK1

BI537947



DISCUSSÃO

Expressão gênica

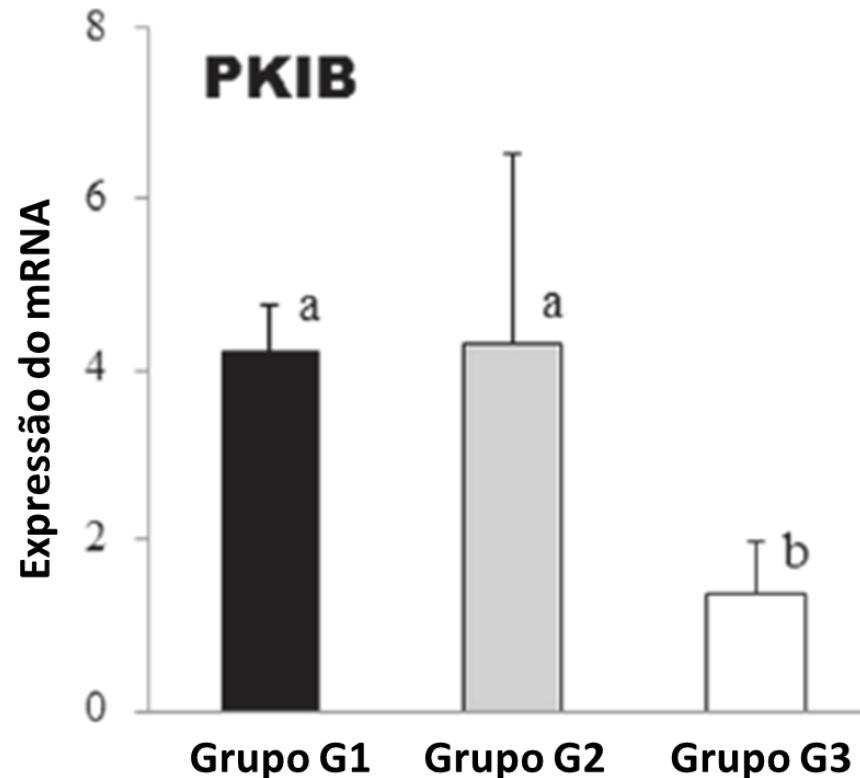


Fig. Expressão de mRNA do gene PKIB em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Expressão gênica

PKIB

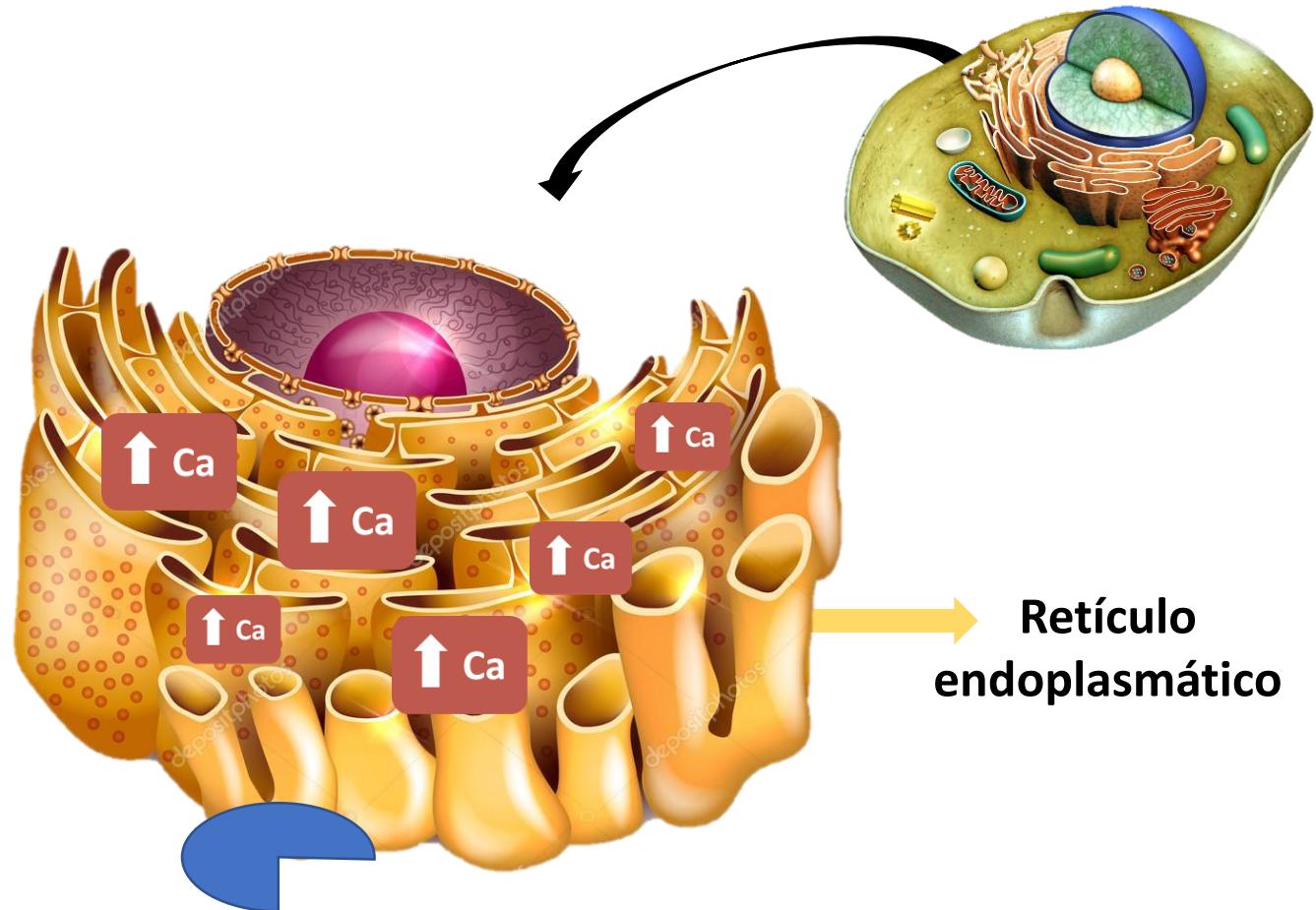


Inibidor de proteína quinase beta
dependente de AMPc

É da família de inibidores da
proteína quinase dependente de
cAMP (PKA)

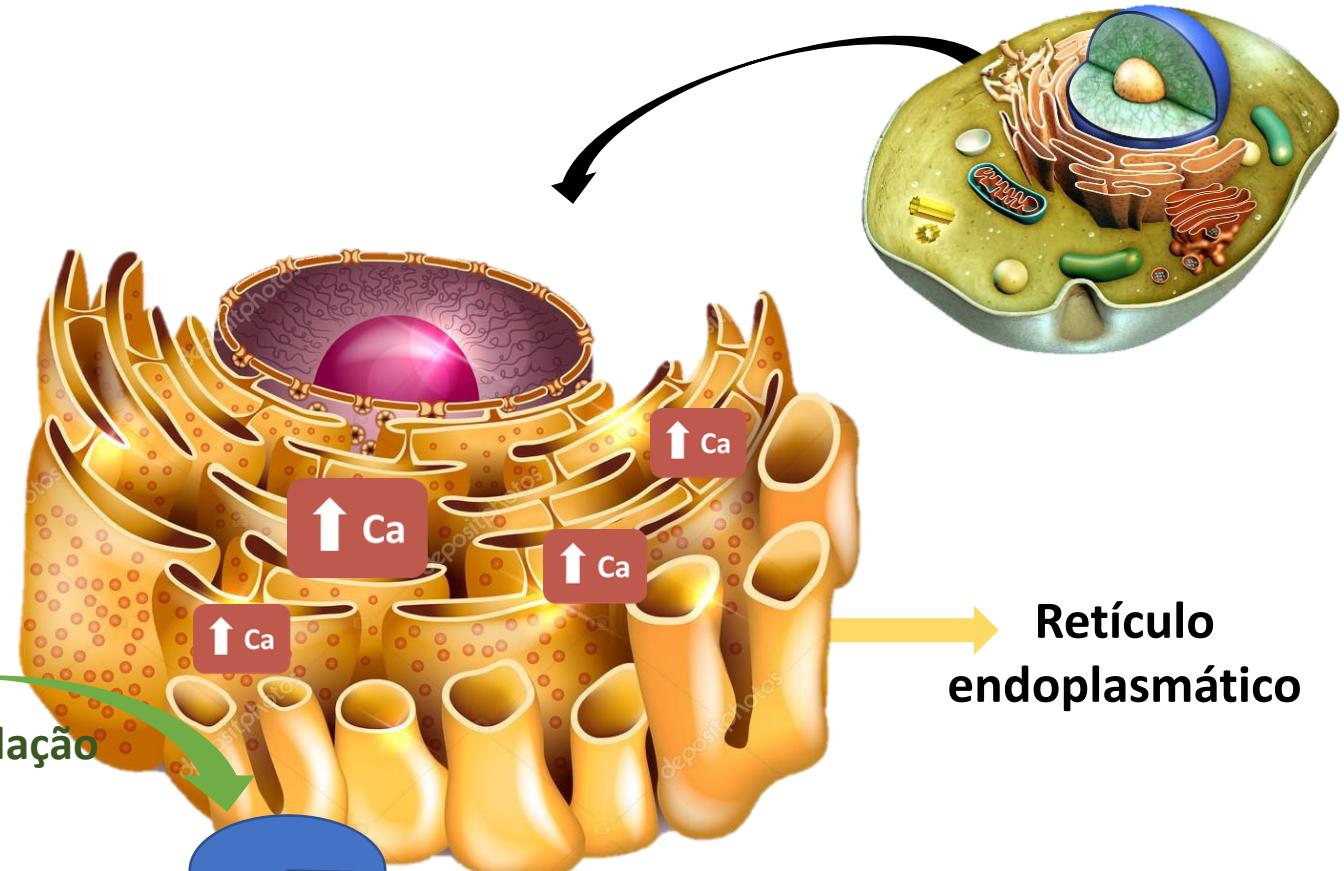


DISCUSSÃO



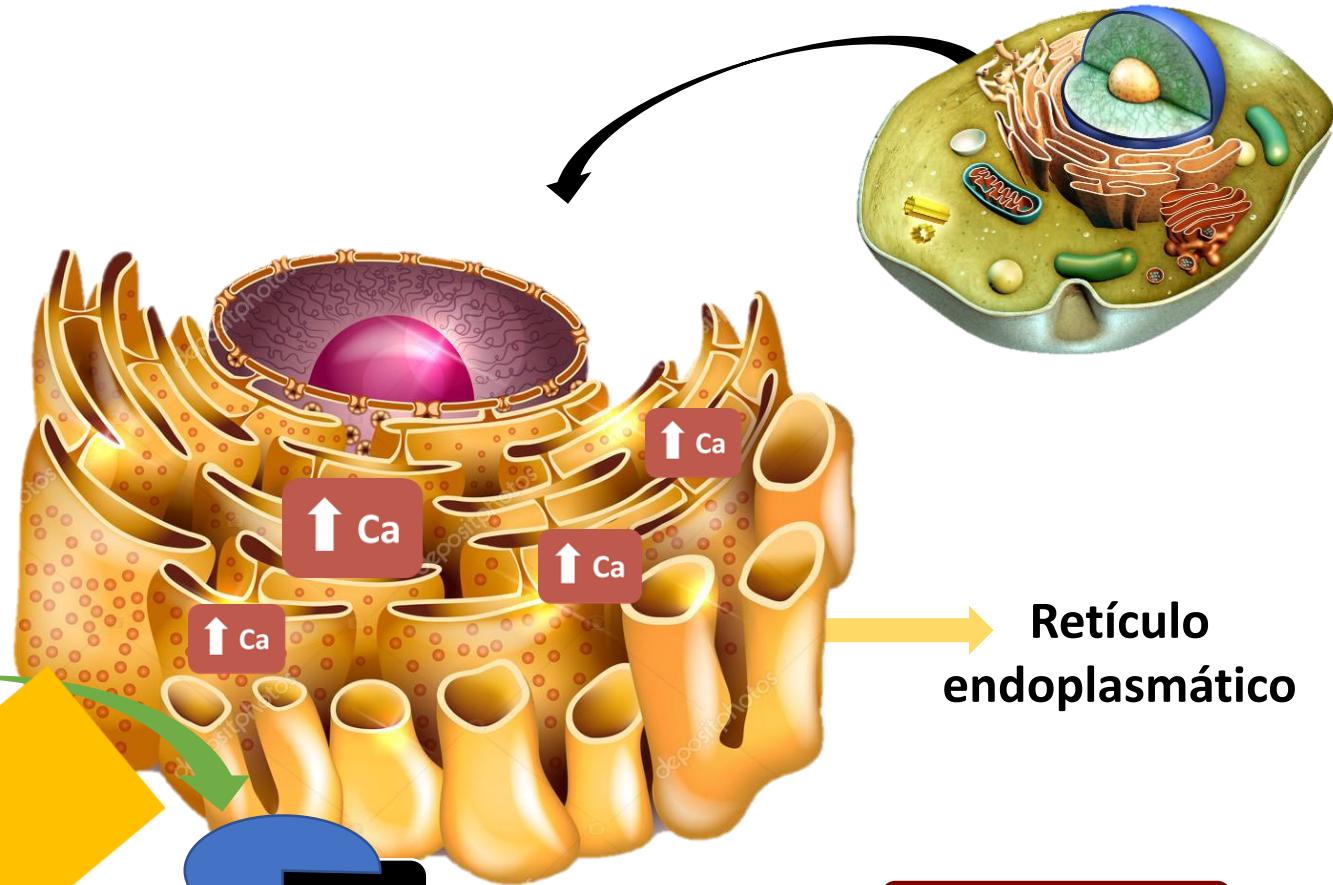
IP3 (inositol-1,4,5-trifosfato)

DISCUSSÃO



Proteína quinase dependente
de cAMP

DISCUSSÃO



Retículo
endoplasmático

INIBE

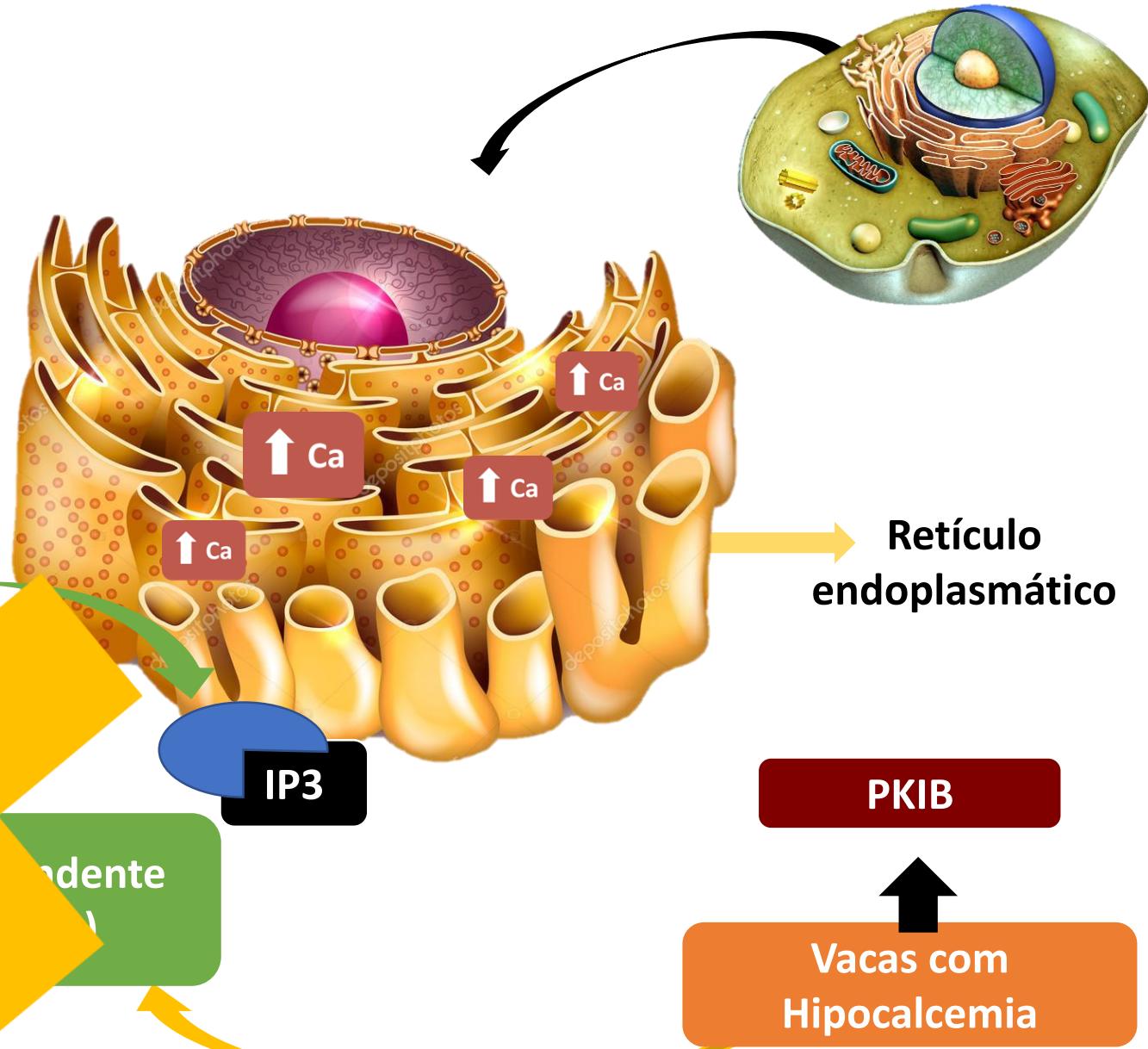
Proteína
dependente
de calcio

IP3

PKIB

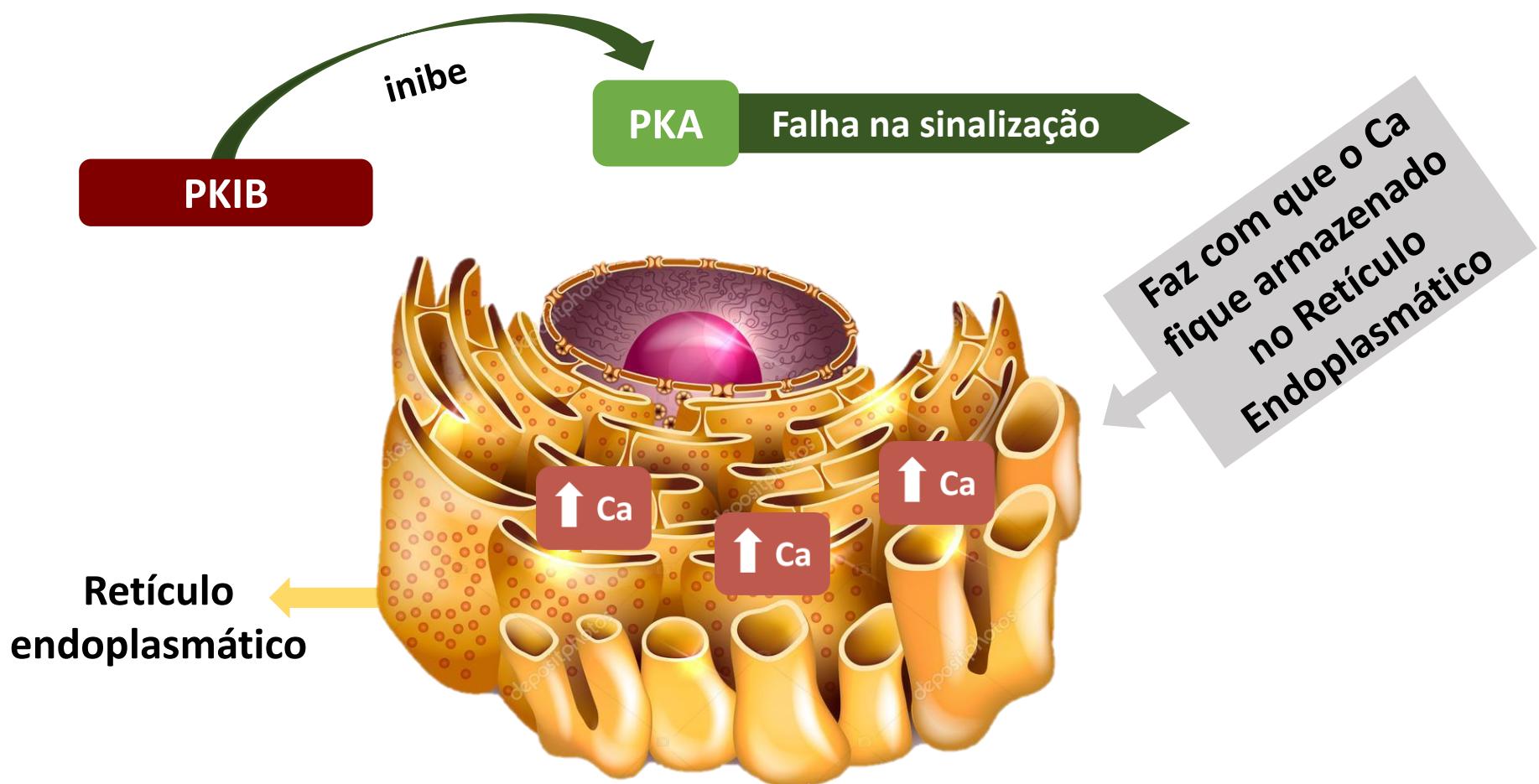
Vacas com
Hipocalcemia

DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

Simplificando



RESULTADOS

Expressão gênica

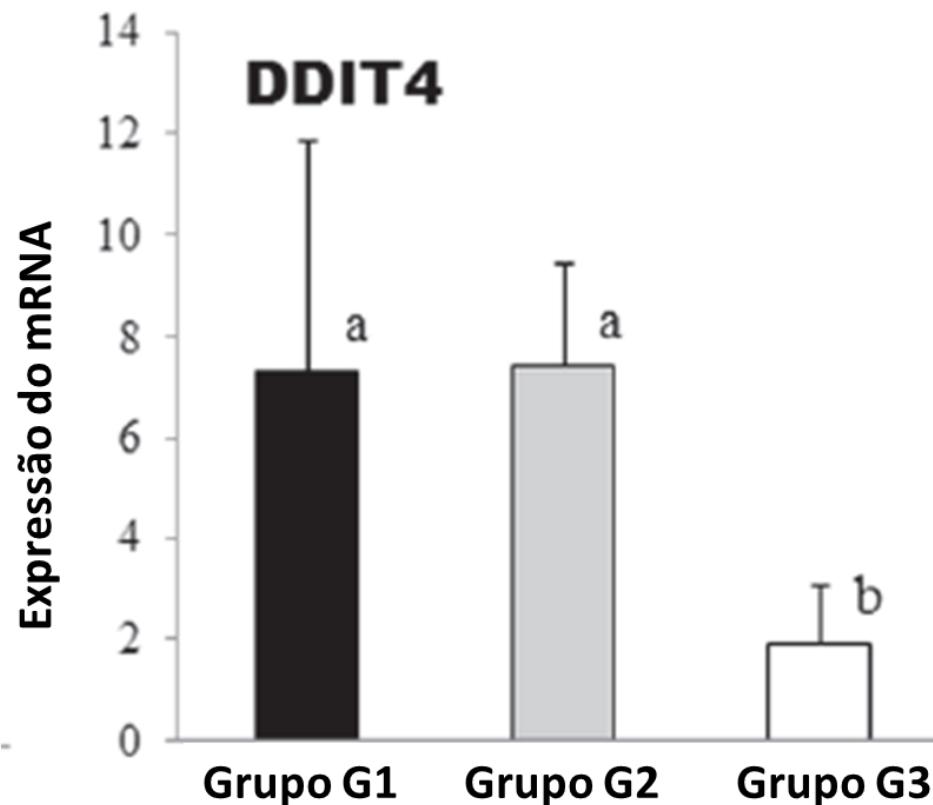


Fig. Expressão de mRNA do gene DDIT4 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b}Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Estresse
celular

DDIT4

Codifica

Proteína cuja
principal ação é inibir
o mTOR

Homeostase celular

Promove o anabolismo (síntese
de proteínas, nucleotídeos e
lipídios)

mTOR
Esta enzima envolve no crescimento e
proliferação celular e evita a
apoptose

FUNÇÃO

imunossupressão

Diminui a expressão dos genes associados a
produção de citocinas pró-inflamatórias

(Zebelli et al., 2013)

RESULTADOS

Expressão gênica

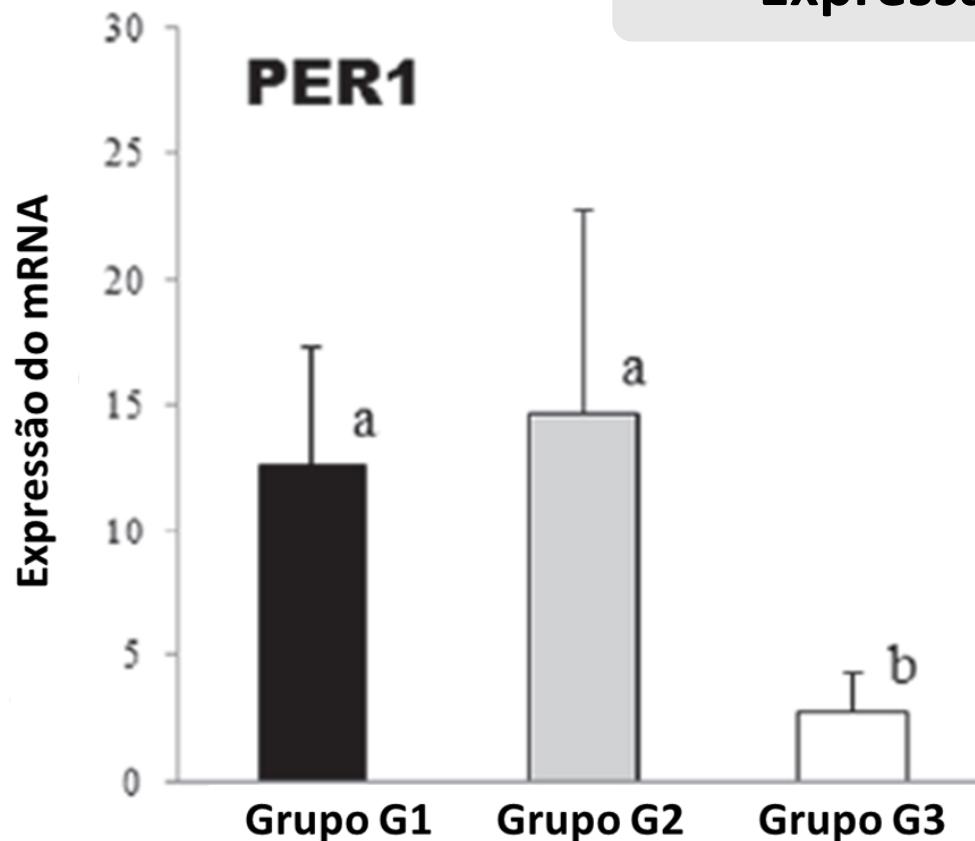


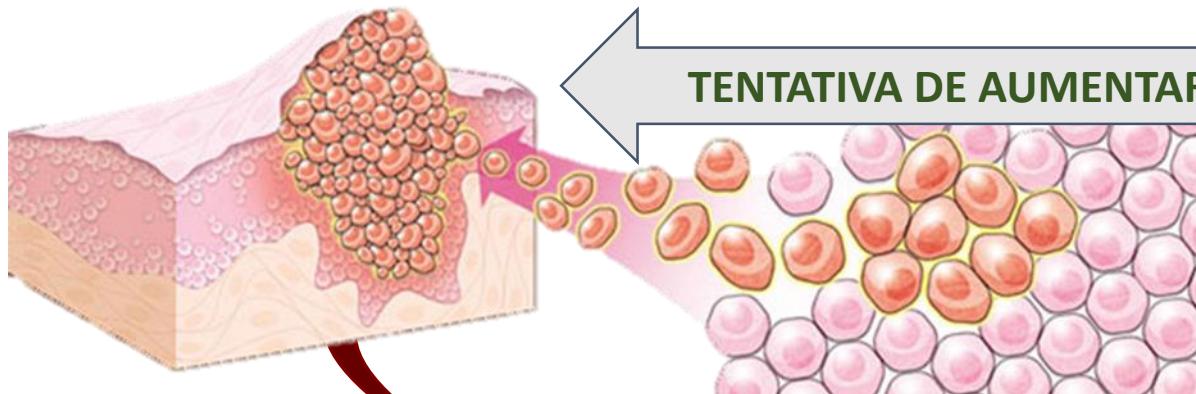
Fig. Expressão de mRNA do gene PER1 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

↑ PER1 →

Tem ação no
funcionamento
celular

cortisol



TENTATIVA DE AUMENTAR

O aumento da
expressão do
PER1

Principalmente das
células imunes

DISCUSSÃO



Vacas com hipocalcemia clínica
tem níveis elevados de cortisol

(Riond et al., 1999; Horst and Jørgensen, 1982)

RESULTADOS

Expressão gênica

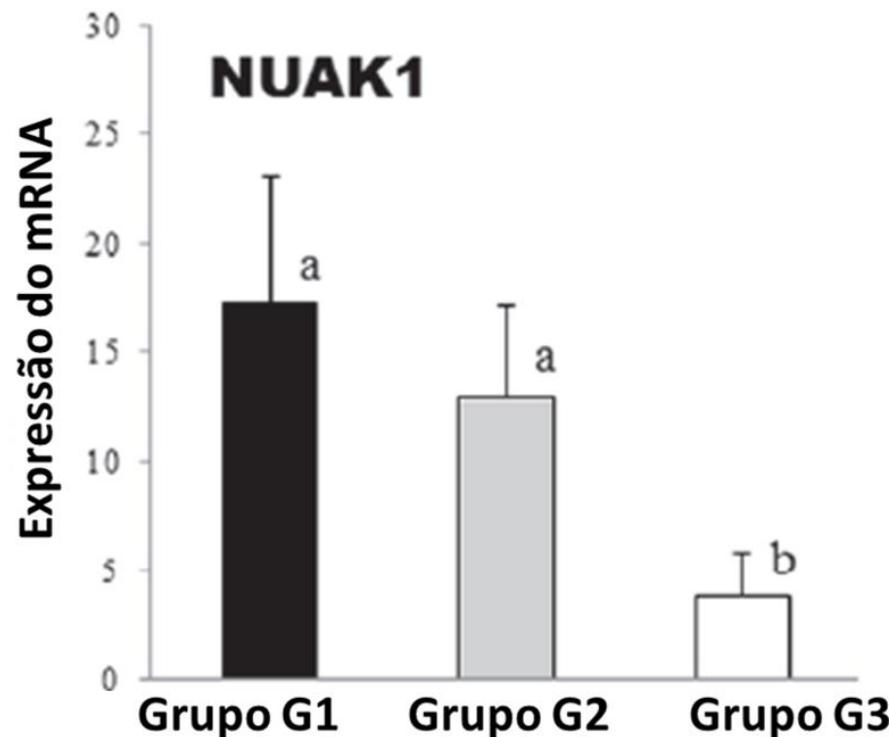


Fig. Expressão de mRNA do gene NUAK1 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b}Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

NUAK1

função

Diminuir a captação de glicose pelos tecidos

(Inazuka et al., 2012)

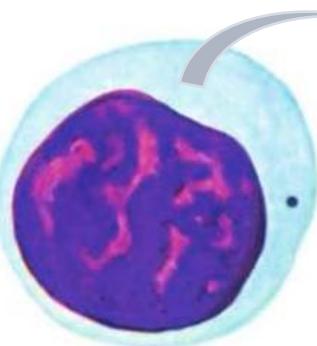
Através da resistência a insulina

Falta glicose

glicose

Produção de leite

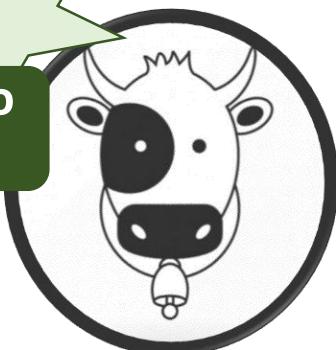
Sistema imune



Linfócito

Os linfócitos exigem uma regulação rigorosa da captação de glicose para manter a homeostase imunológica

(Maclever et al., 2008)



RESULTADOS

Expressão gênica

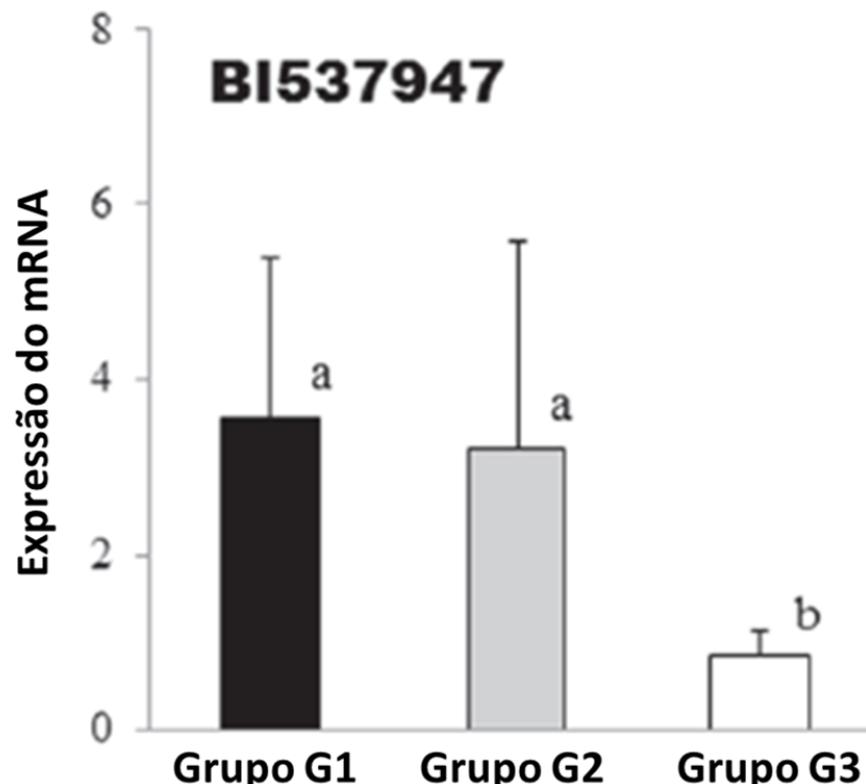


Fig. Expressão de mRNA do gene BI537947 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS



Gene BI537947

Função permanece
incerta

O autor não discute qual a
ação na ocorrência da doença

RESULTADOS

Expresso diferentemente entre G1 e G2

Genes diferencialmente expressos entre vacas com hipocalcemia clínica espontânea (G1 e G2) e vacas clinicamente saudáveis (G3)

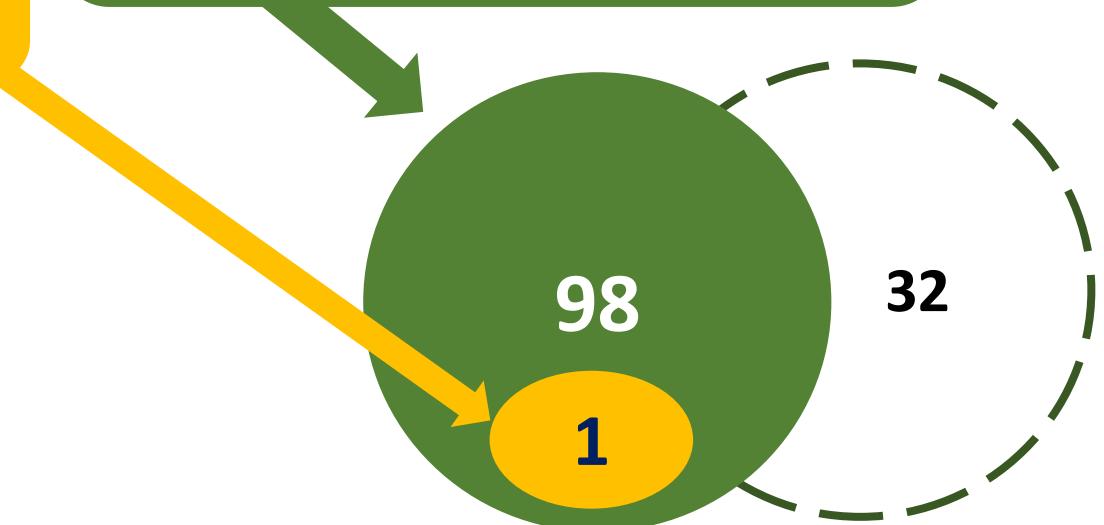


Fig. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clínica induzida e hipocalcemia clínica espontânea.

RESULTADOS

Expressão gênica

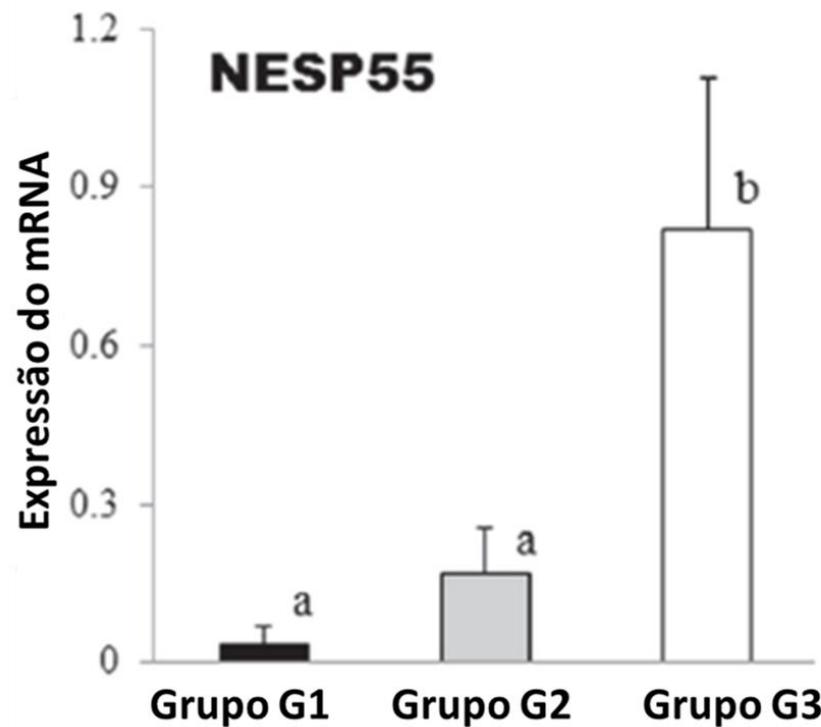


Fig. Expressão de mRNA do gene NESP55 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Expressão gênica

NESP55

Esse gene não foi expresso em vacas induzidas a hipocalcemia clínica

Mas foi alterado em vacas com hipocalcemia clínica espontânea

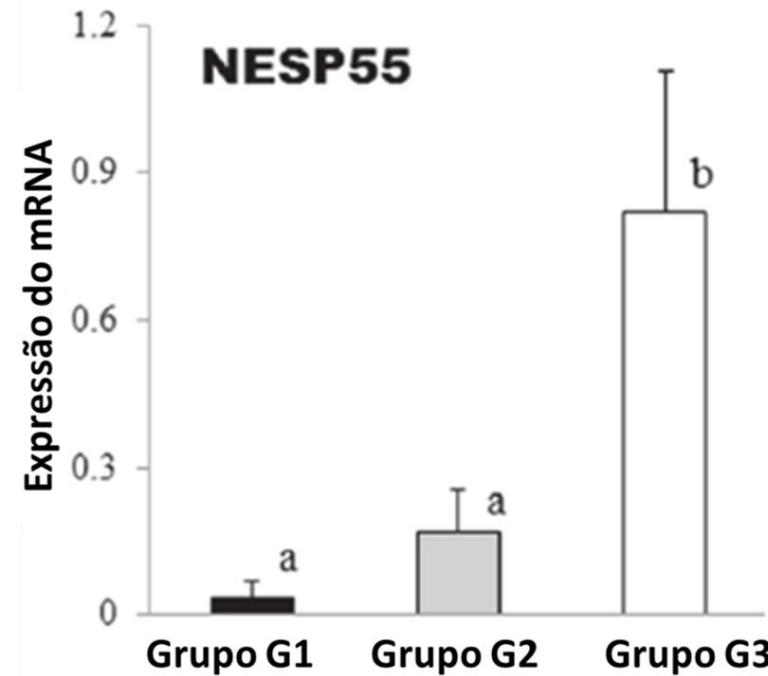


Fig. Expressão de mRNA do gene NESP55 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS

NESP55

Em humanos ele está associado com
doenças neuroendócrinas



Ainda não é comprovado essa
função, são apenas especulações

É necessário saber mais sobre ele para que possa ser
utilizado como biomarcador da hipocalcemia

RESUMO

Esse estudo mostrou a expressão de 6 genes em células mononucleares de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica

PKIB DDIT4 PER1 NUAK1 BI537947 NESP55



Hipocalcêmicas

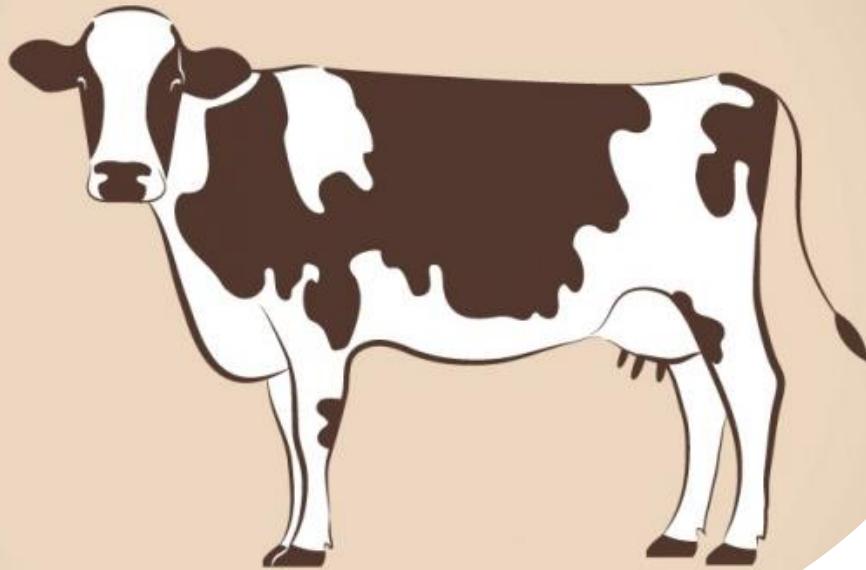


IMUNOSSUPRESSÃO



Predisposição a outras doenças

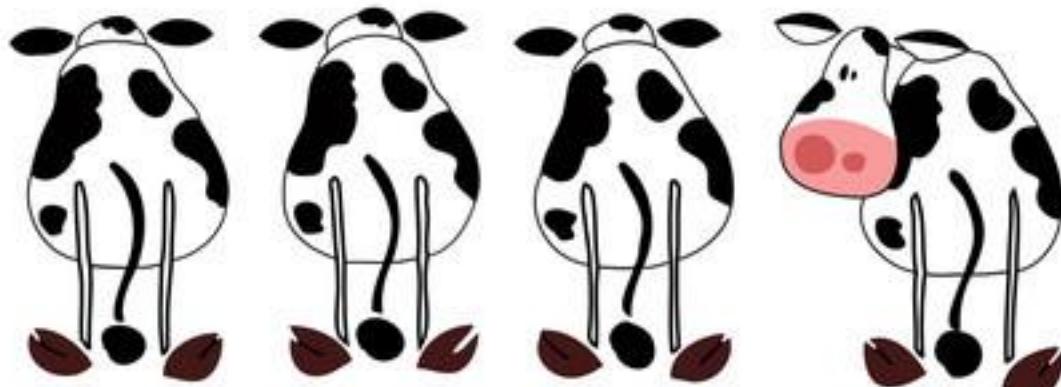
CONCLUSÃO



**Os genes encontrados no presente estudo
são fortes candidatos a biomarcadores
genéticos específicos para hipocalcemia
clínica de vacas leiteiras**

PROJETO

Análise da expressão gênica



Butafosfan em gel

A close-up photograph of a cow's face, focusing on its nose and mouth area. The cow has black and white markings, with a white patch on its nose containing several dark spots. It has two yellow ear tags. The background is blurred, showing other cows and farm equipment.

MUITO OBRIGADA!



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

www.ufpel.edu.br/nupeec



Perfil da expressão gênica em vacas leiteiras com hipocalcemia clínica

kauaniborgescardoso@gmail.com

milena_bugoni@yahoo.com