



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

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

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

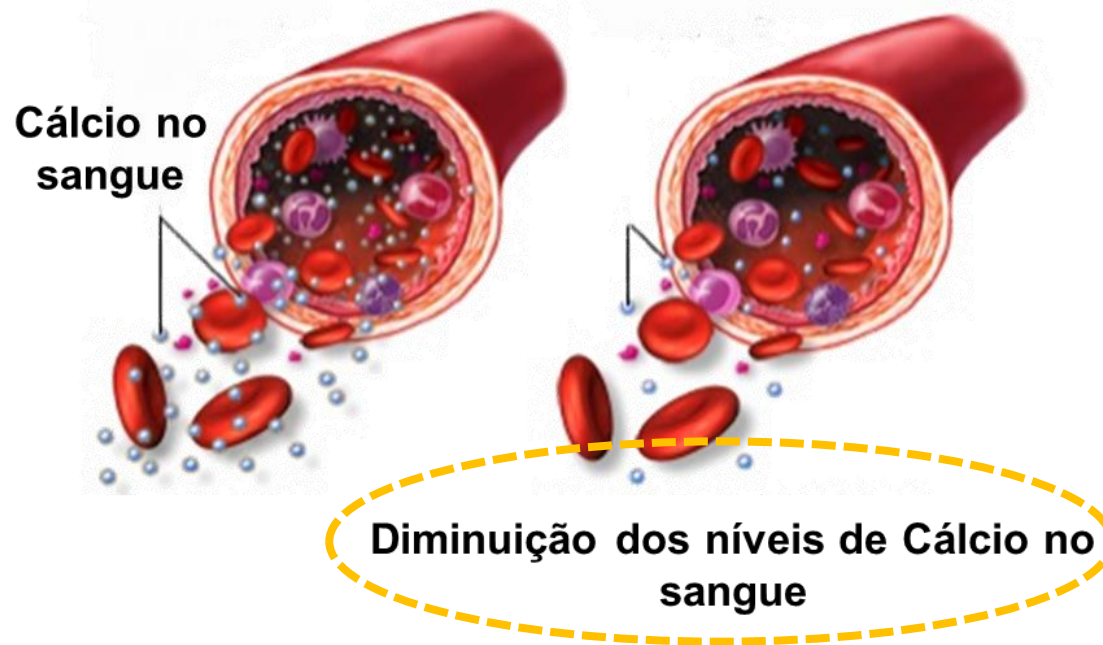
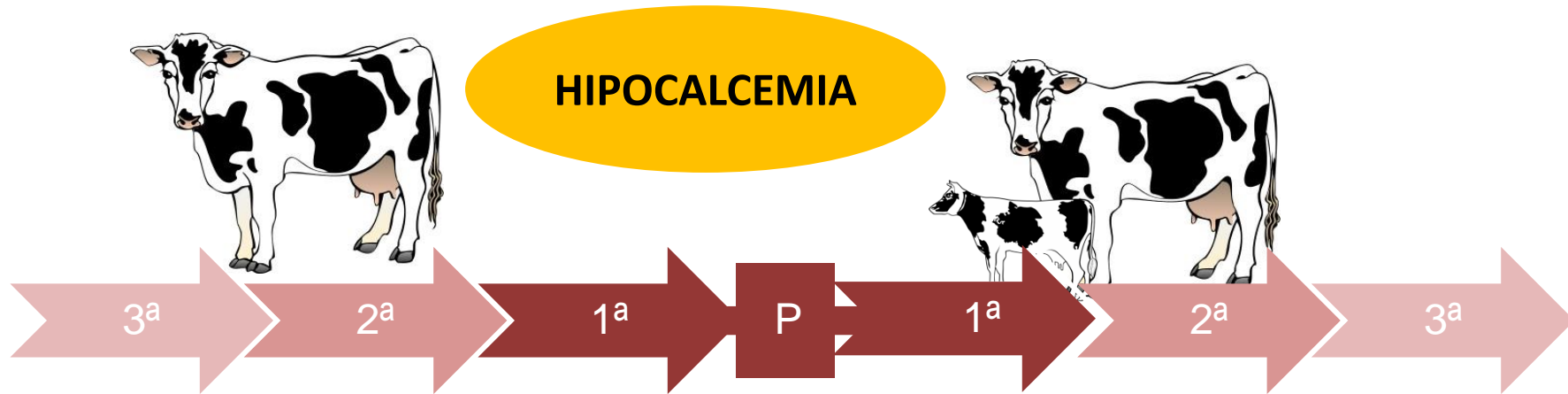
†Cooperative Department of Veterinary Medicine, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

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

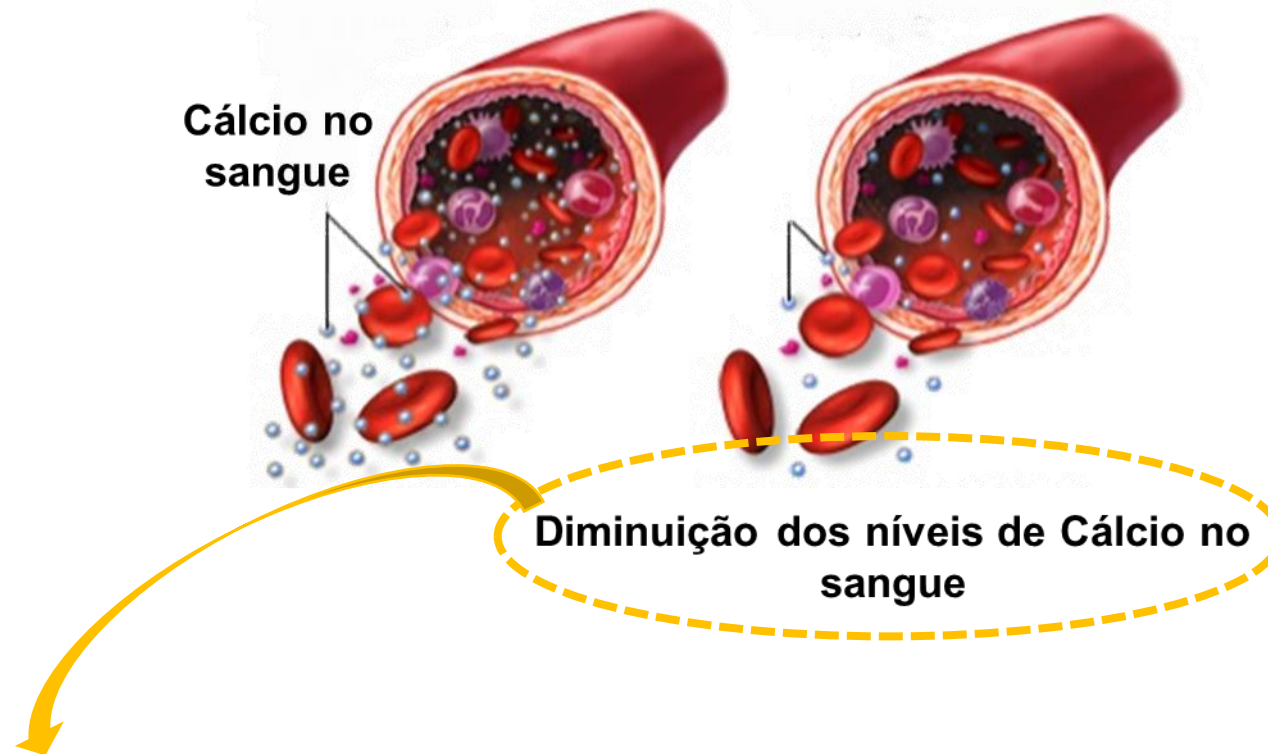
§Biotechnology Center, Agriculture and Forestry University, Chitwan, Nepal

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

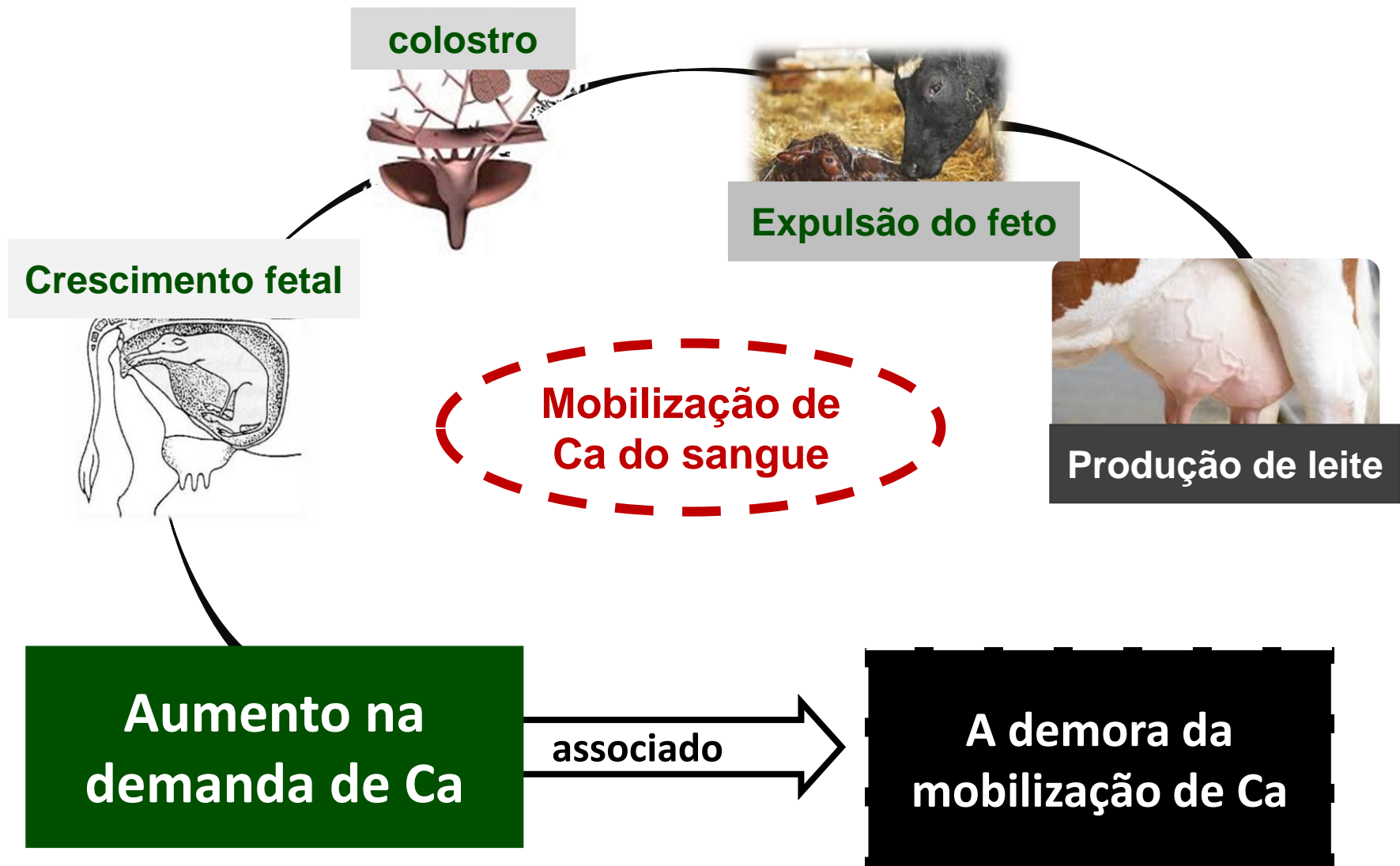
**A demora da
mobilização de Ca**

PERGUNTAS



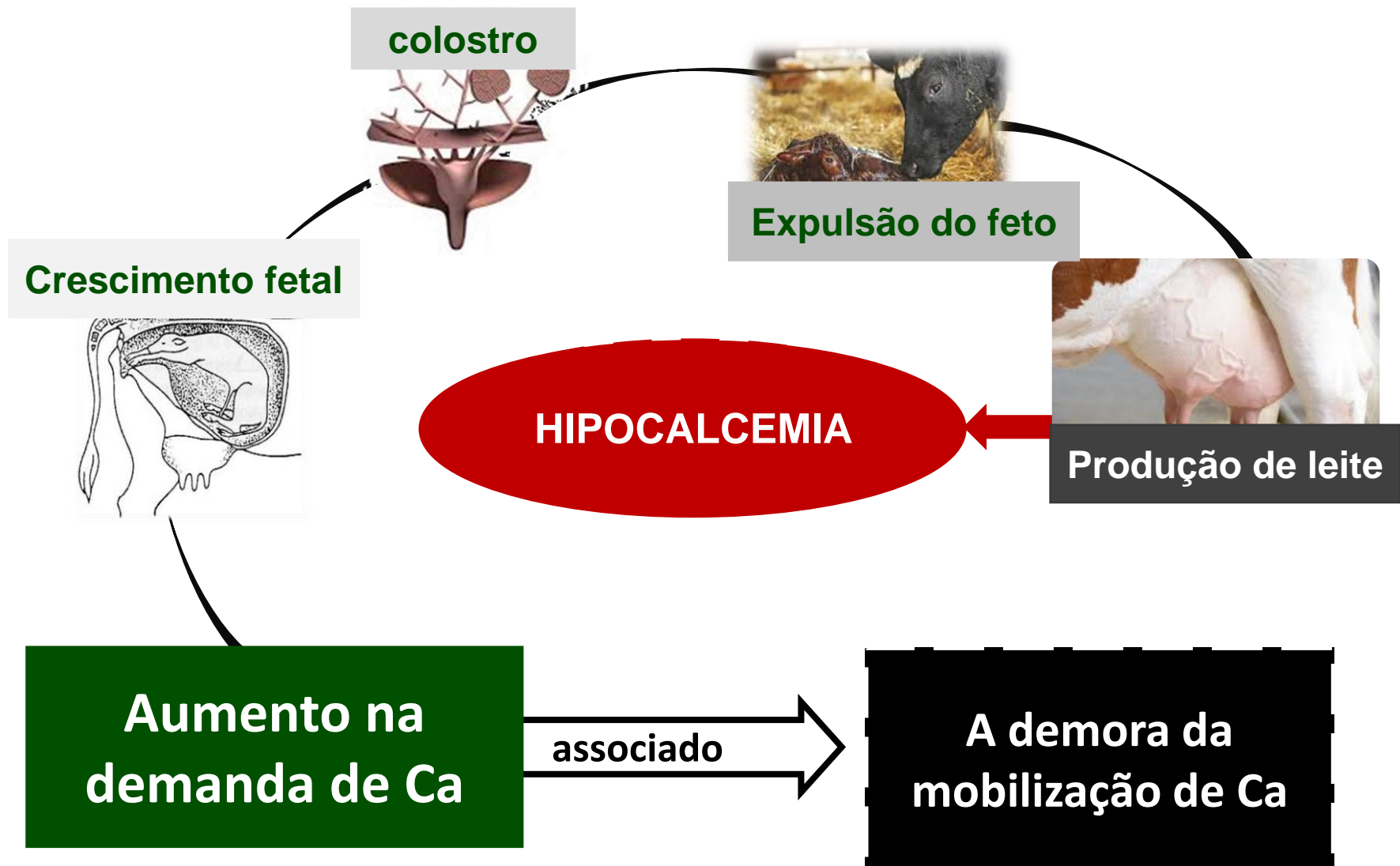
Quais os fatores que aumentam a demanda de Ca nesse período?

INTRODUÇÃO



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

INTRODUÇÃO



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

INTRODUÇÃO



Hipocalcemia

Clínica

$< 5,5 \text{ mg/dL}$

Subclínica

$8,0 - 5,5 \text{ mg/dL}$

Níveis de Ca
no sangue

CLÍNICA



INTRODUÇÃO



Hipocalcemia

Clínica

$< 5,5 \text{ mg/dL}$

Subclínica

$8,0 - 5,5 \text{ mg/dL}$

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 esta relacionada?

**Predispor a ocorrência
de outras enfermidades**

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



INTRODUÇÃO

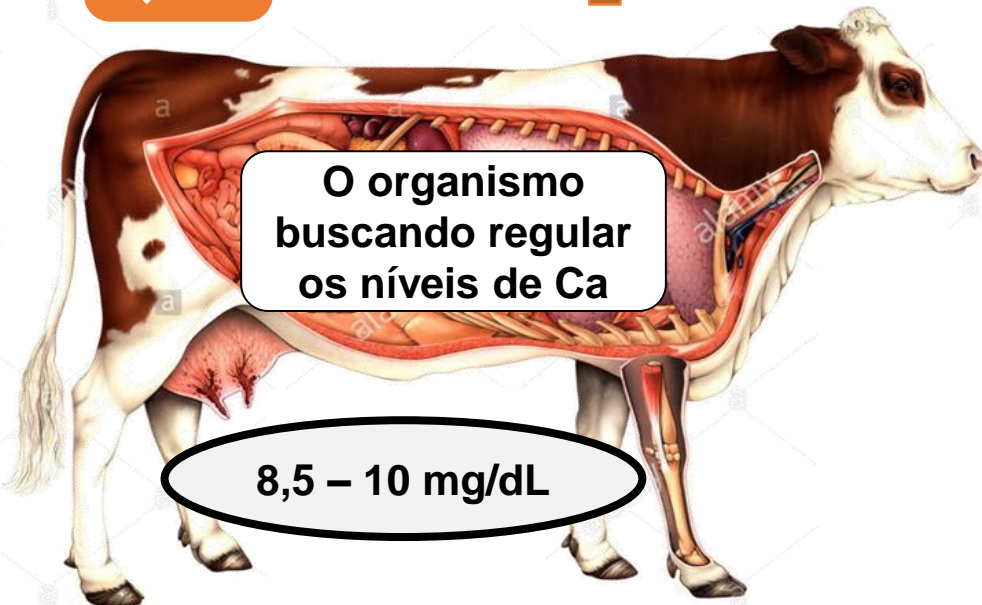


ativa

Hormônios
calciotrópicos

O organismo
buscando regular
os níveis de Ca

8,5 – 10 mg/dL



INTRODUÇÃO



ativa

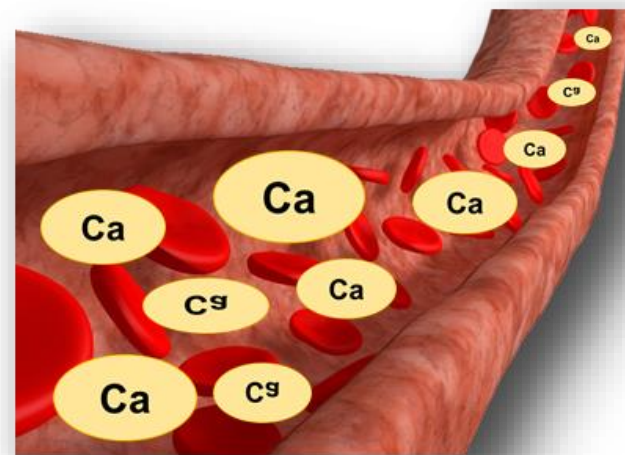
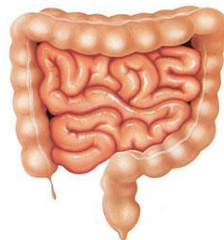
Hormônios
calciotrópicos

Paratormônio (PTH)

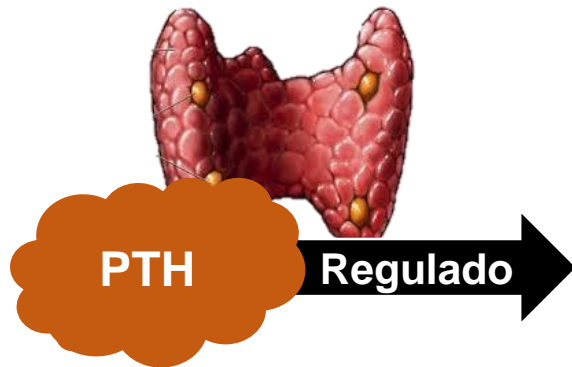
O organismo
tentando regular
os níveis de Ca

8,5 – 10 mg/dL

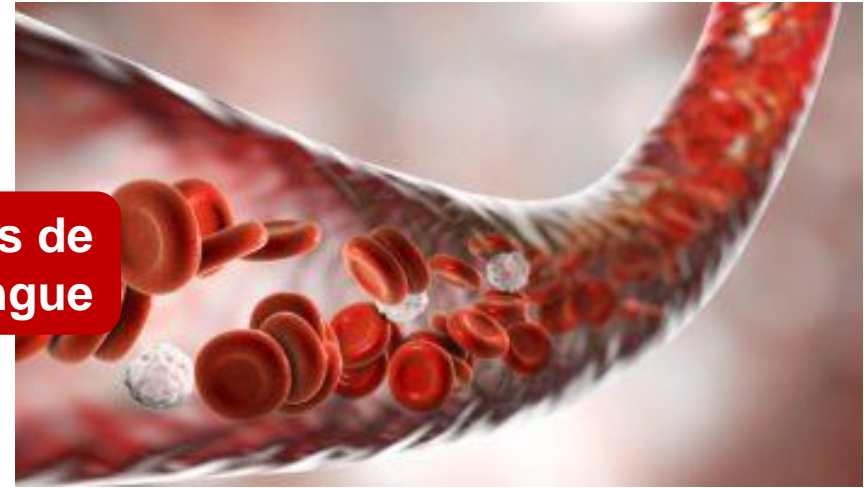
eleva



INTRODUÇÃO

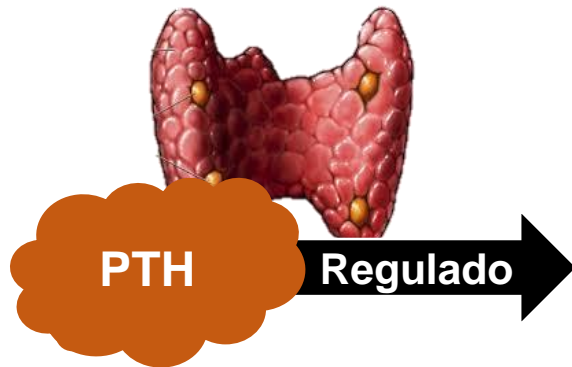


**Dos níveis de
Ca no sangue**

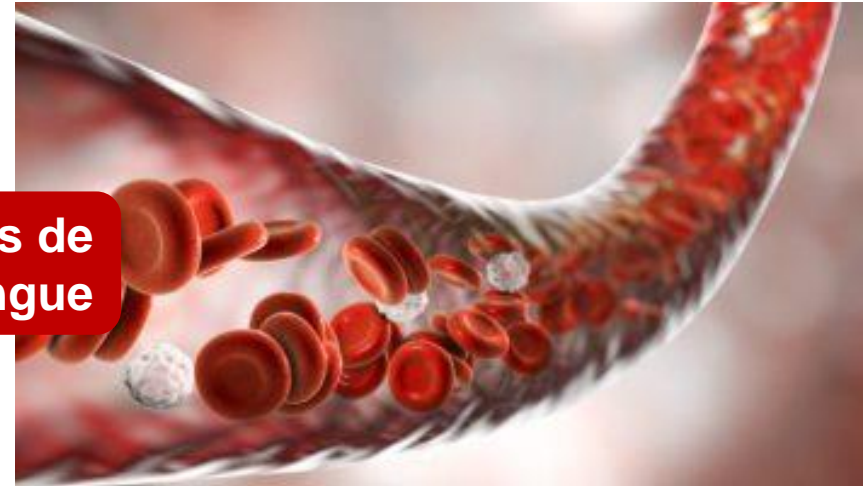


(BROZOS et al., 2011)

INTRODUÇÃO



**Dos níveis de
Ca no sangue**

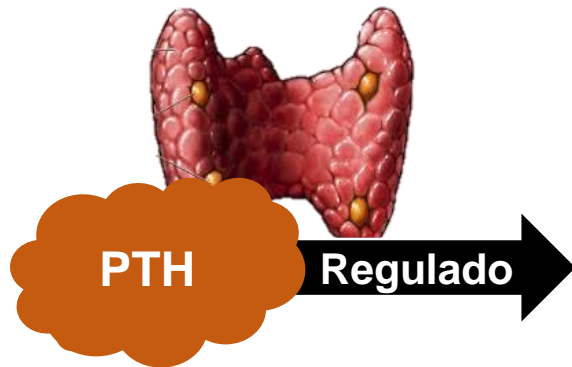


(BROZOS et al., 2011)

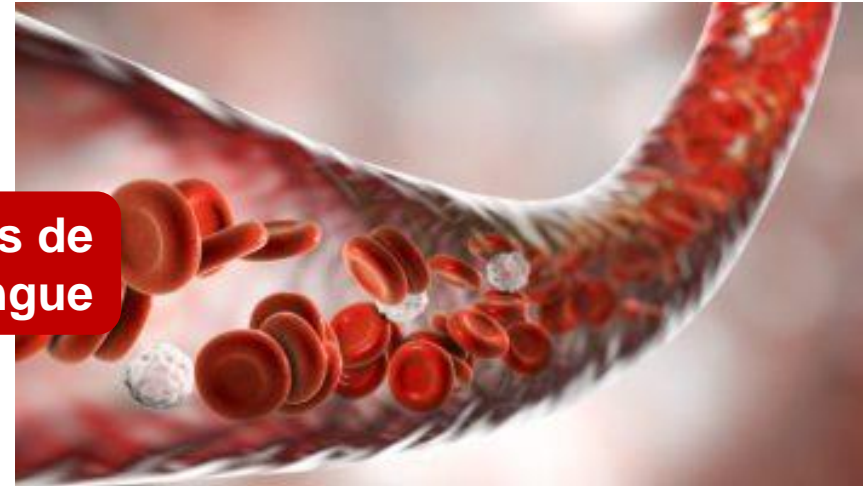
Processo de homeostase

Eficiente

INTRODUÇÃO



Dos níveis de
Ca no sangue



(BROZOS et al., 2011)



(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 dá
conta de suprir a demanda de Ca**

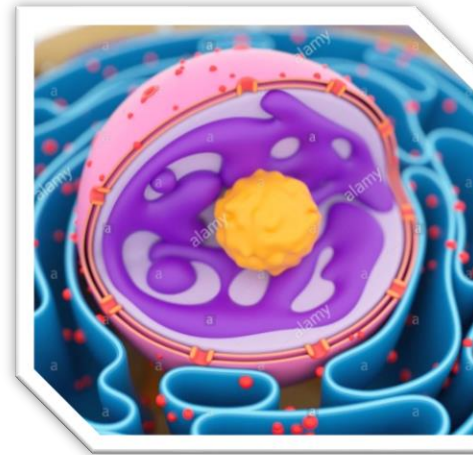
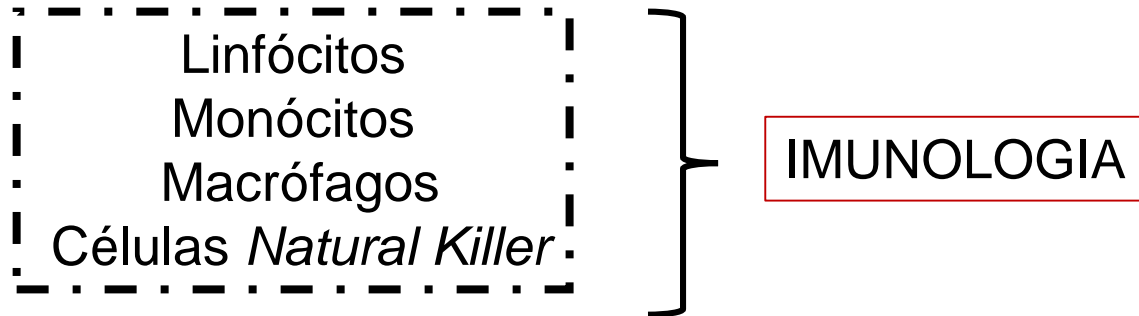
HIPOCALCEMIA

**Recrutamento de células
de defesa**

Processo de inflamatório



INTRODUÇÃO



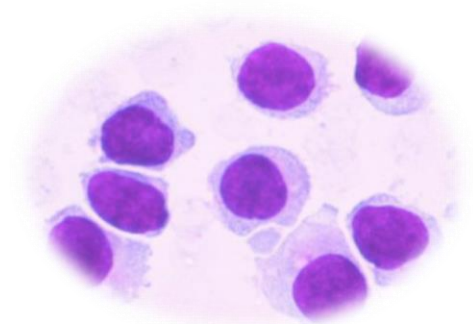
A expressão gênica
de leucócitos



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

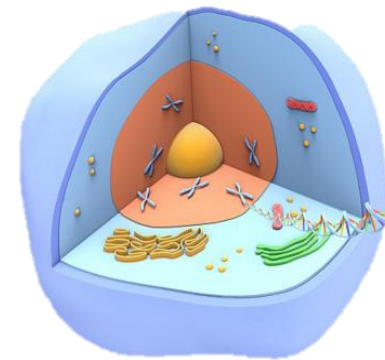
Vários tecidos (rim, fígado)

Biomarcadores da
hipocalcemia

INÍCIO

Expressão de milhares de
genes

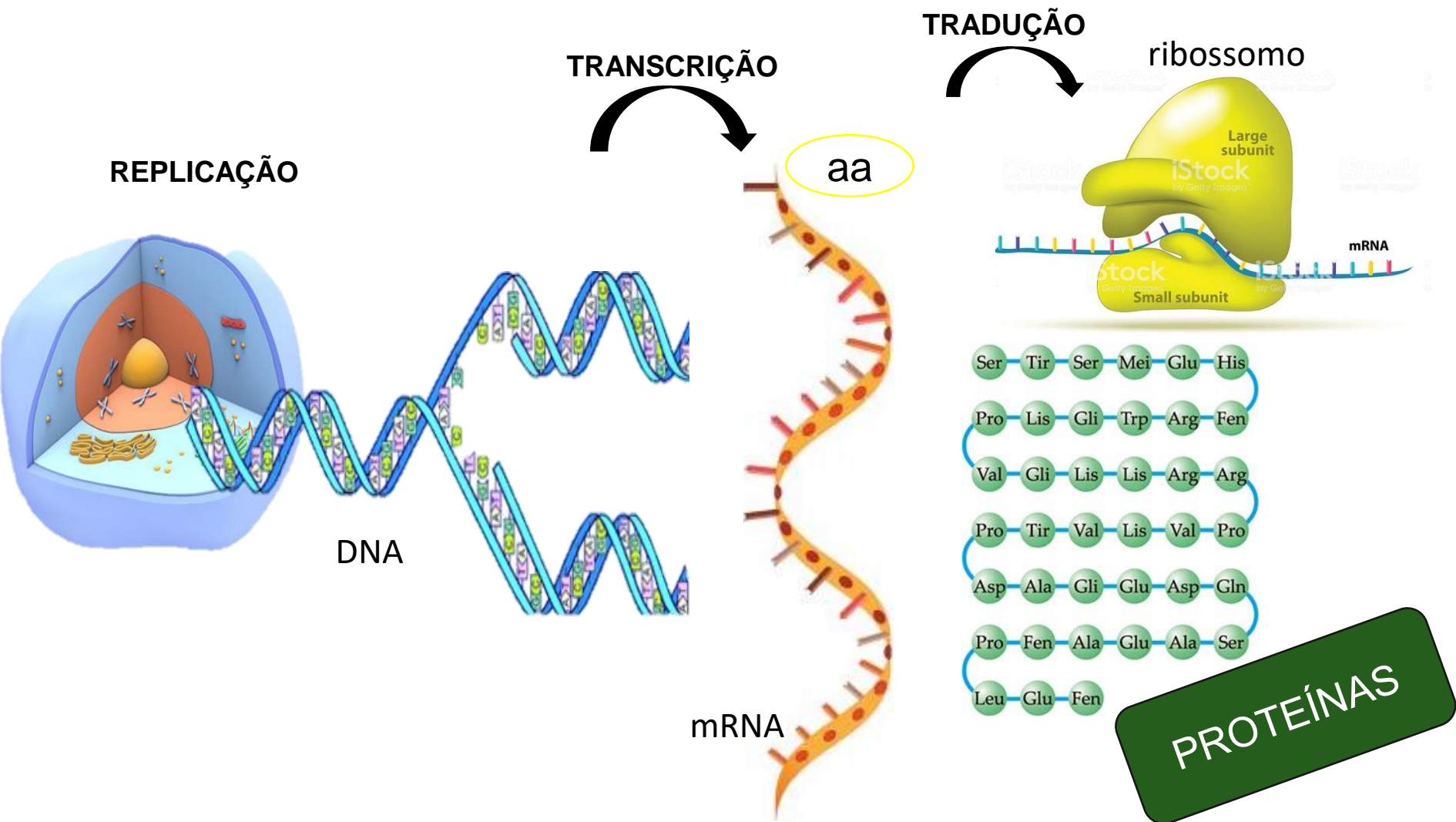
Esclarecer mecanismos
moleculares de doenças



INTRODUÇÃO



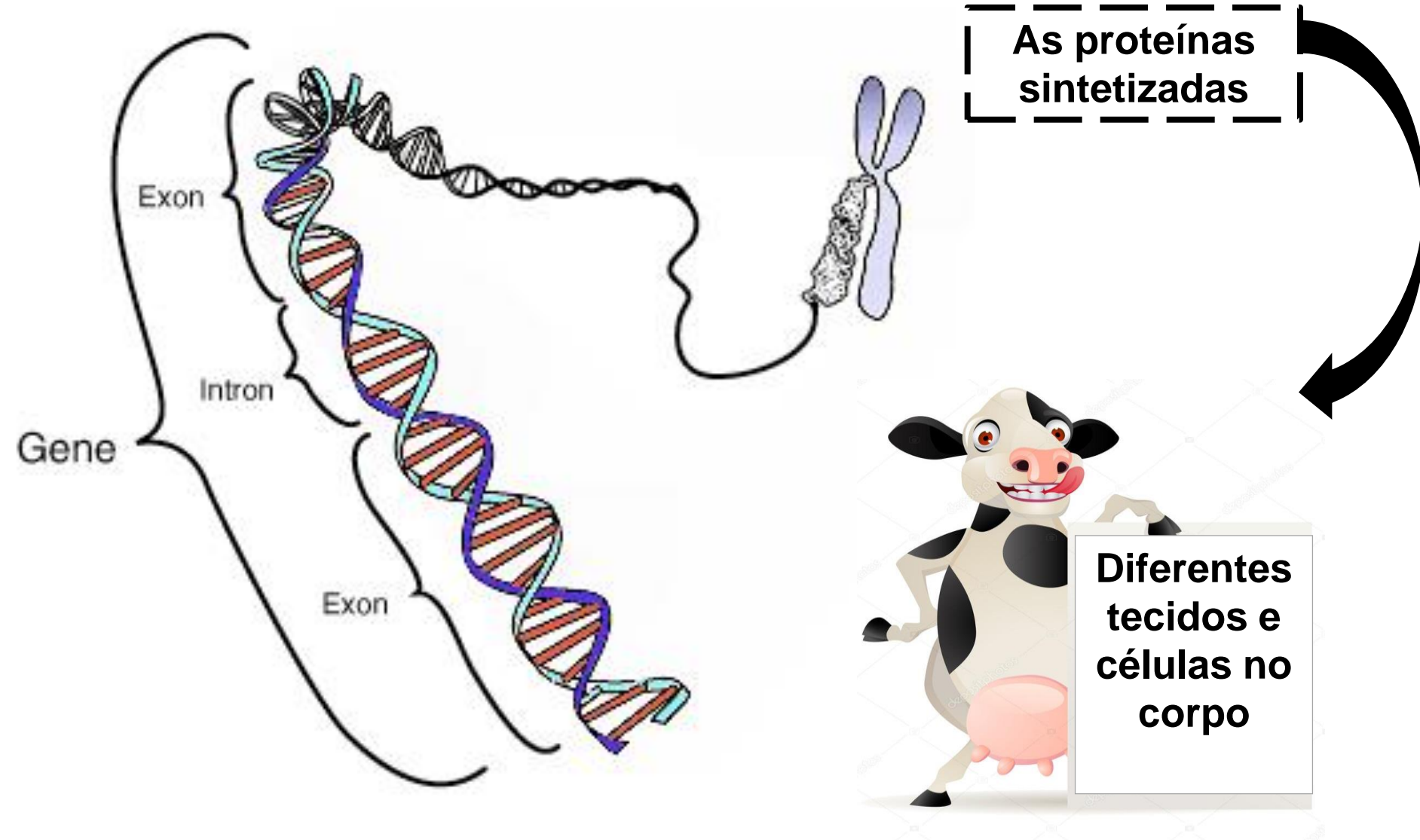
EXPRESSÃO GÊNICA



INTRODUÇÃO



EXPRESSÃO GENICA



Abordagem Molecular

CLAUDICAÇÃO

(Almeida et al., 2007)

CETOSE

(Loor et al., 2007)

MASTITE

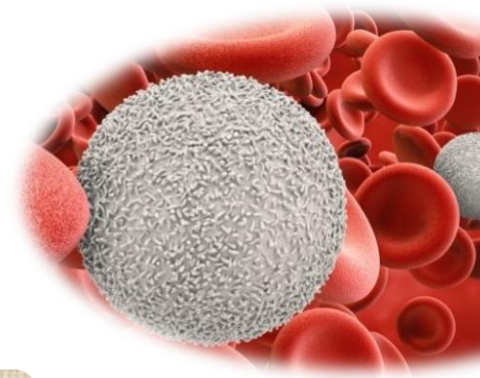
(Lutzow et al., 2008)

DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

(Newman et al., 2011)

RETARDO DE CRECIMENTO

(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.

Hipocalcemia induzida

→ **n= 4 animais**

→ **±7 anos de idade**

→ **Alojadas
individualmente**

→ **Não prenhas**

Hipocalcemia espontânea

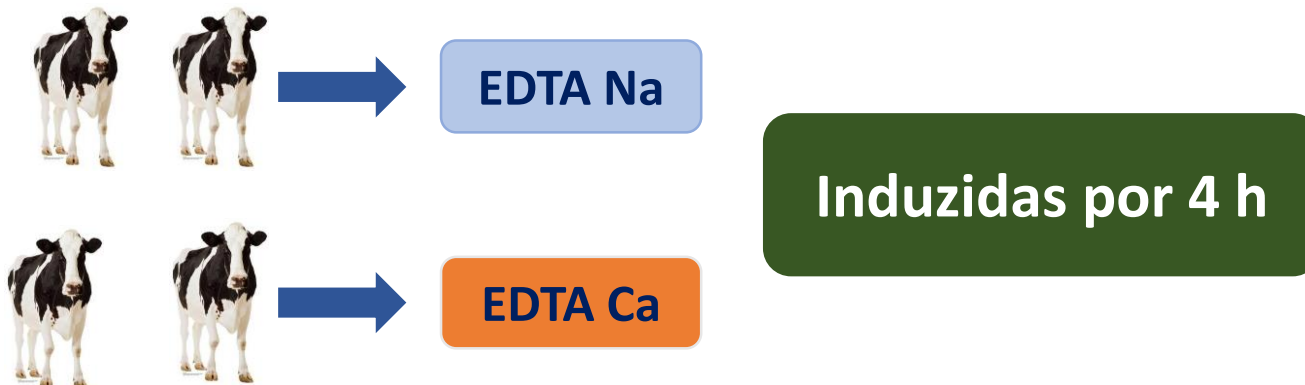
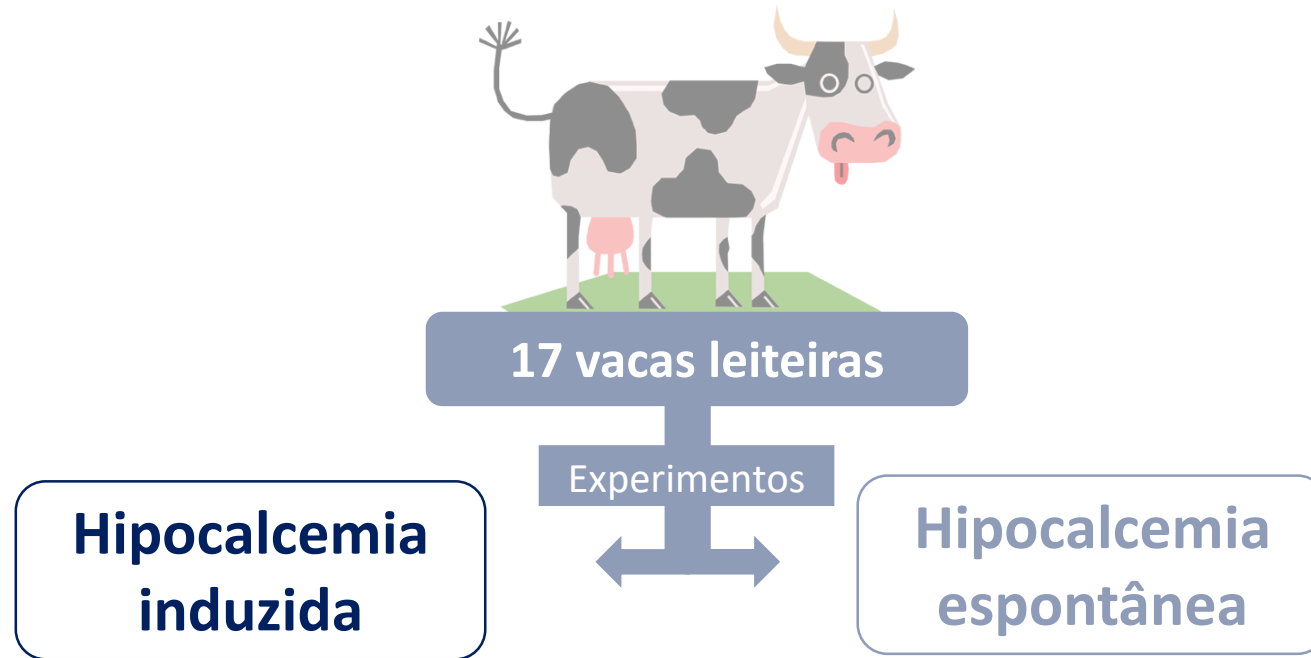
→ **n= 13 animais**

→ **± 6,5 anos de idade**

→ **Não especificado
pelo autor**

→ **Prenhas**

MATERIAIS E MÉTODOS



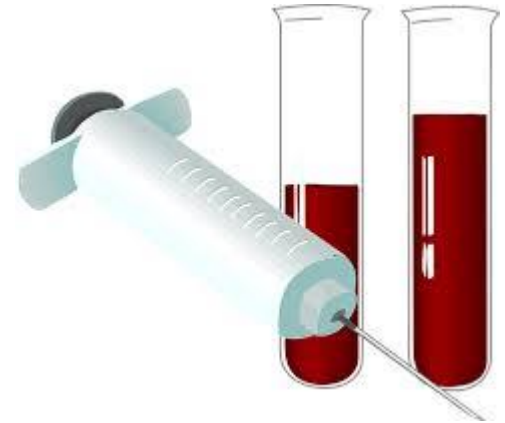
MATERIAIS E MÉTODOS



Coletas de sangue

Análise

Concentrações de Ca
Expressão gênica



0

1

2

3

4

6

8

10

12

18

24

Horas



MATERIAIS E MÉTODOS



17 vacas leiteiras

Experimentos

Hipocalcemia
induzida

Hipocalcemia
espontânea

Hipocalcemicas

Saudáveis



G1



G2



G3

n= 4 animais

n= 4 animais

n= 5 animais

1 tratamento para
hipocalcemia

2 tratamentos para
hipocalcemia

Saudáveis

MATERIAIS E MÉTODOS



Ca < 5,6 mg/dL

Burogluconato de Ca

2º Tratamento
de Ca

G2

1º Tratamento
de Ca

G1

Diagnóstico

0h

24h

48h

72h

96h

Tratamento

G3
Saudáveis



Análises Bioquímicas



Ca

P

PTH

Analizador automático Accute

Análises Bioquímicas

Ca

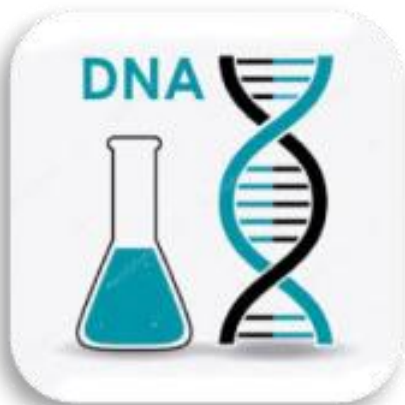
P

PTH

Imunoensaio de
eletroquimioluminescência



Expressão gênica



Microarranjo

PCR



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



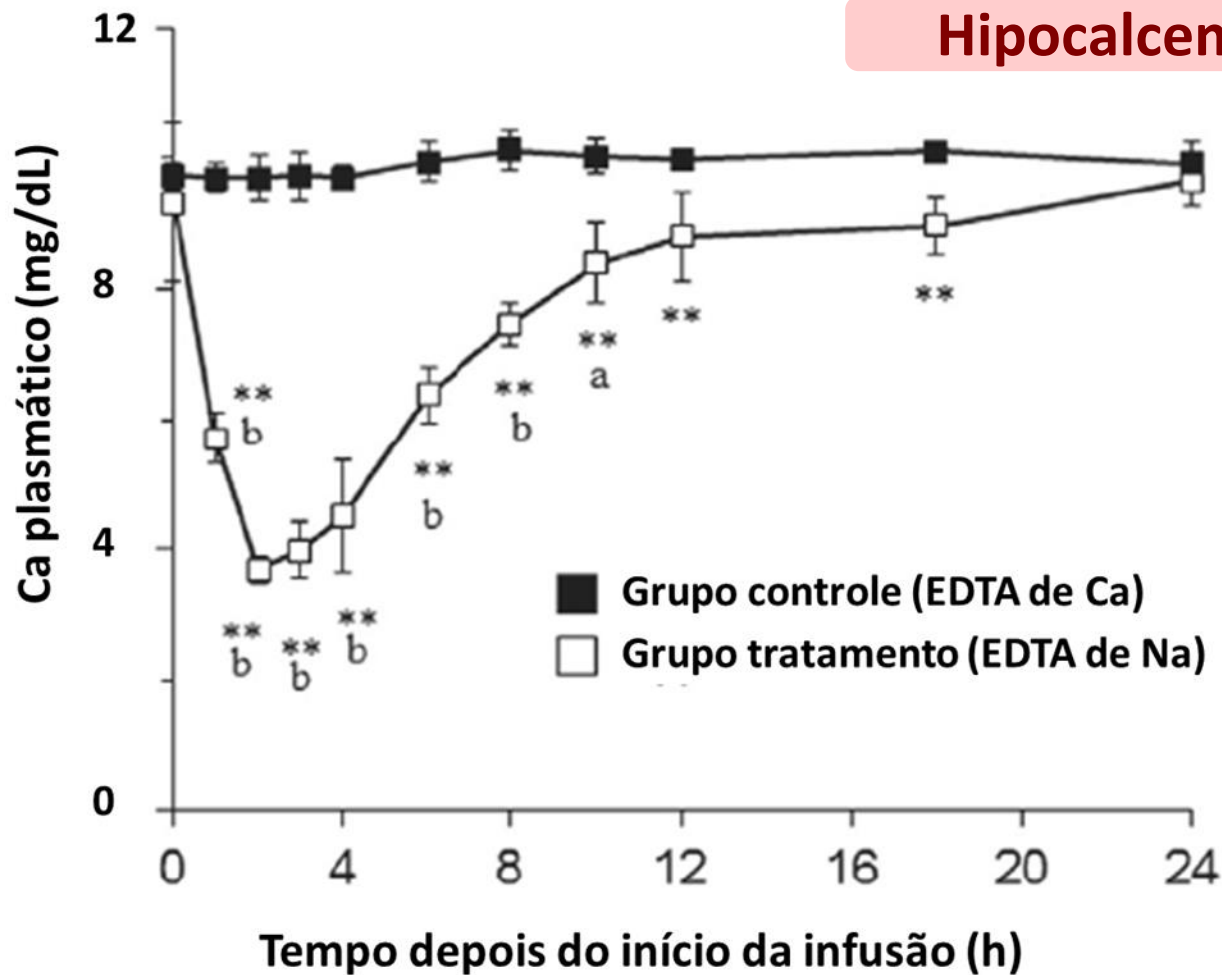


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA- Na_2 ou EDTA-Ca.

Resultados e Discussão

EDTA Na

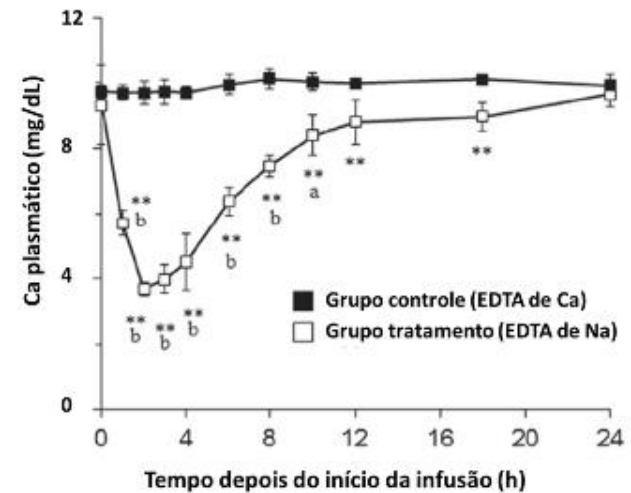


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA-Na₂ ou EDTA-Ca.

EDTA Na

20
Ca
40.078
Calcium

Resultados e Discussão

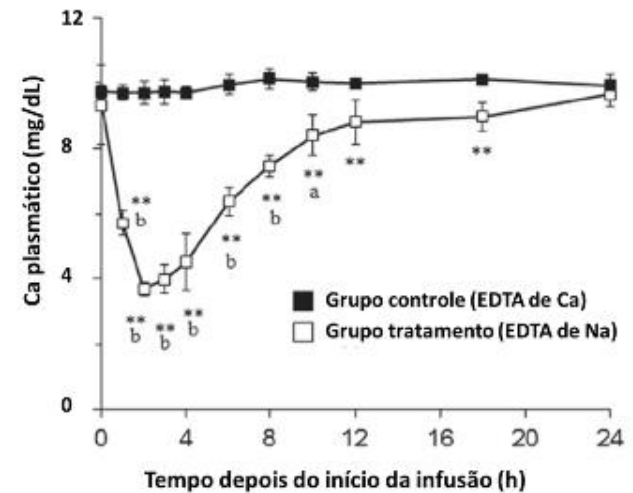
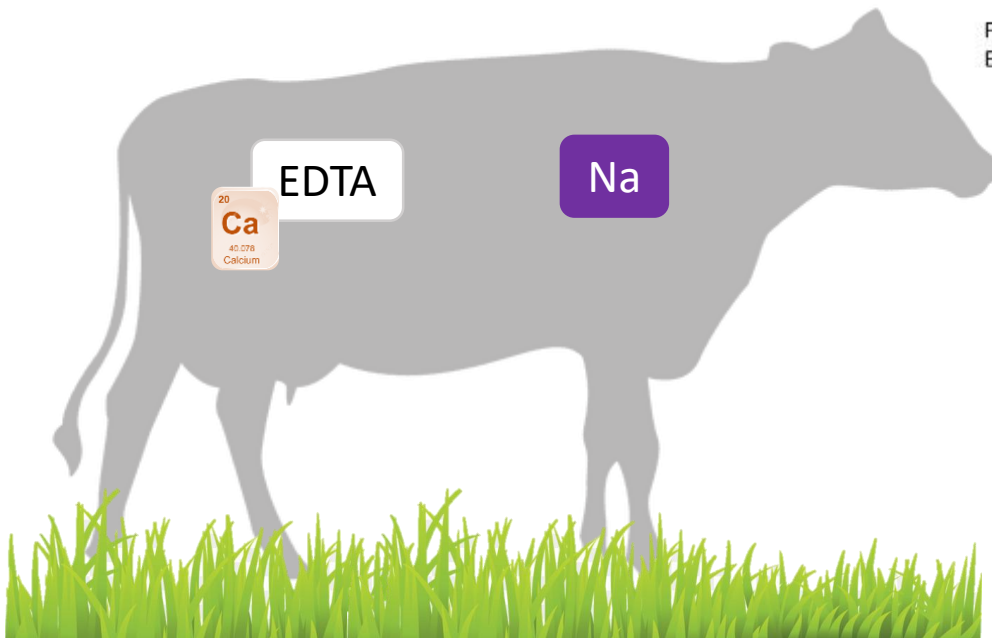


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA- Na_2 ou EDTA-Ca.



Resultados e Discussão

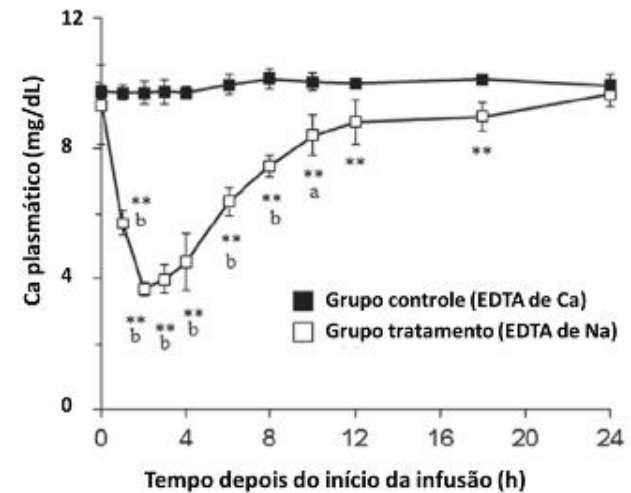


Figura 1. Concentrações de Ca no plasma de vacas leiteiras após a infusão de EDTA-Na₂ ou EDTA-Ca.

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).



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)	$3,6 \pm 0,8^a$	$4,4 \pm 0,2^a$	$9,6 \pm 0,1^b$
P(mg/dL)	$0,22 \pm 0,4^a$	$0,19 \pm 0,4^a$	$0,48 \pm 0,1^b$
PTH	$346,0 \pm 122,4^a$	$606,0 \pm 653,3^a$	$71,6 \pm 48,0^b$

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

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

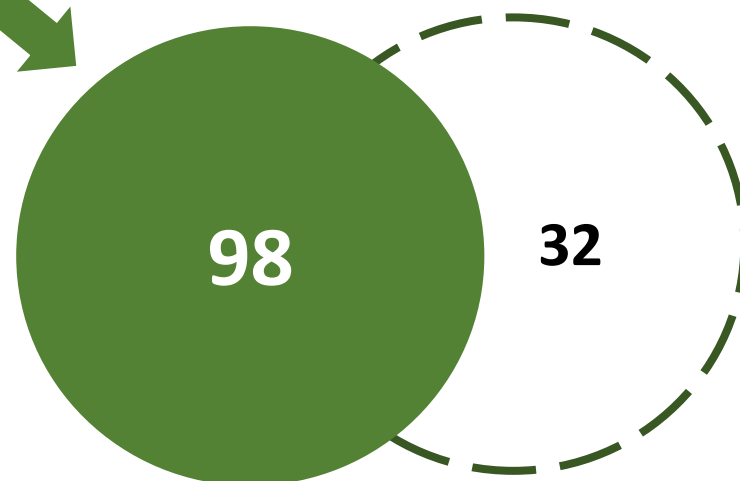


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clinica induzida e hipocalcemia clinica espontânea.



RESULTADOS



Genes cuja expressão foi diferente entre o grupo de vacas induzidas a hipocalcemia clinica (EDTA-Na_2) e o grupo controle (EDTA-Ca)

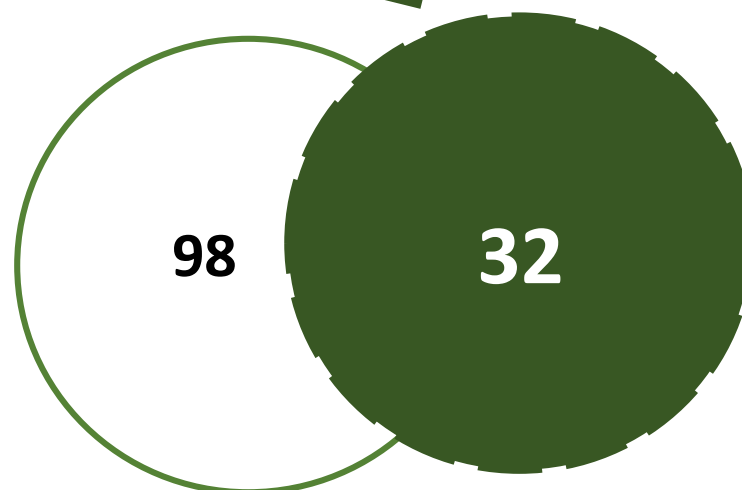


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clinica induzida e hipocalcemia clinica espontânea.

RESULTADOS

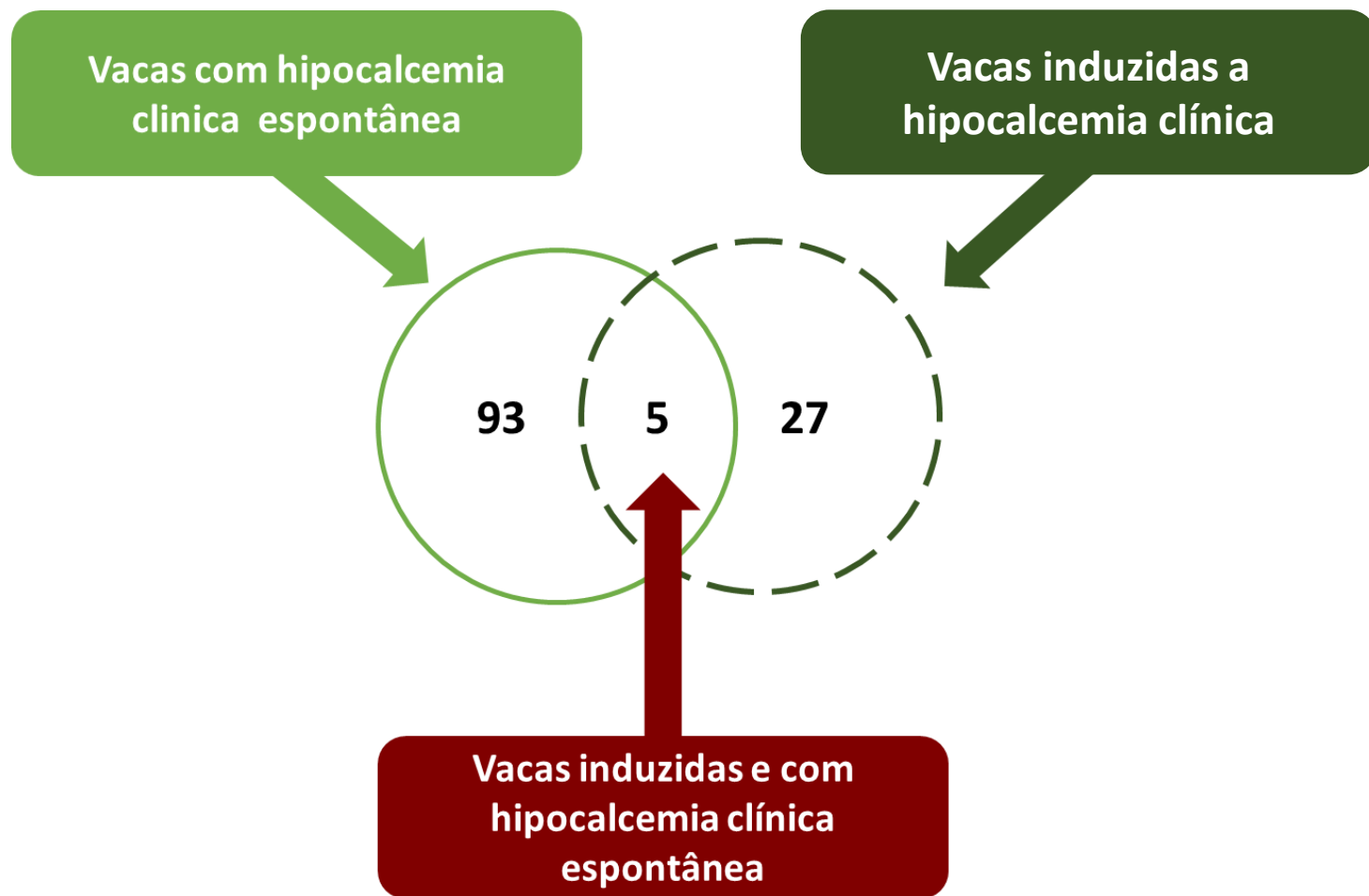
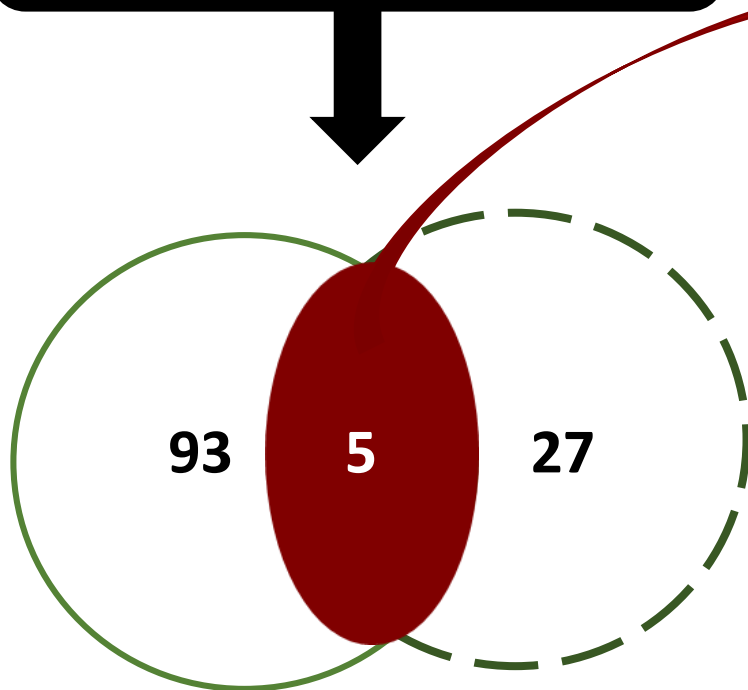


Figura 2. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clinica induzida e hipocalcemia clinica espontânea.

RESULTADOS

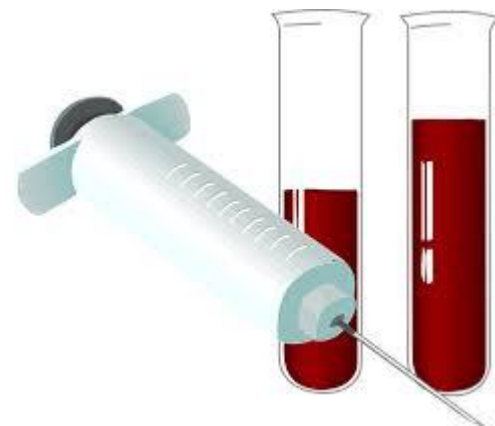


Expressão de genes
comuns



transcrição

rPCR



G1

G2

G3

RESULTADOS



Expressão gênica

PKIB

DDIT4

PER1

NUAK1

BI537947

Maior expressão

Vacas com
hipocalcemia
Clínica

Vacas
cl clinicamente
saudáveis

Expressão gênica

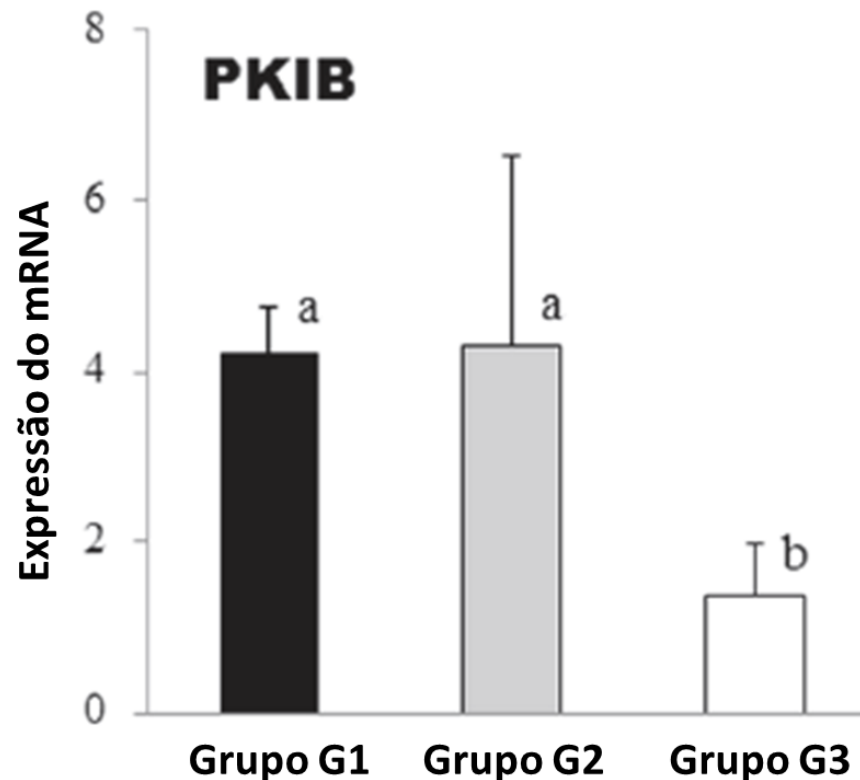


Fig. Expressão de mRNA do gene PKIB em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO



Expressão gênica

PKIB

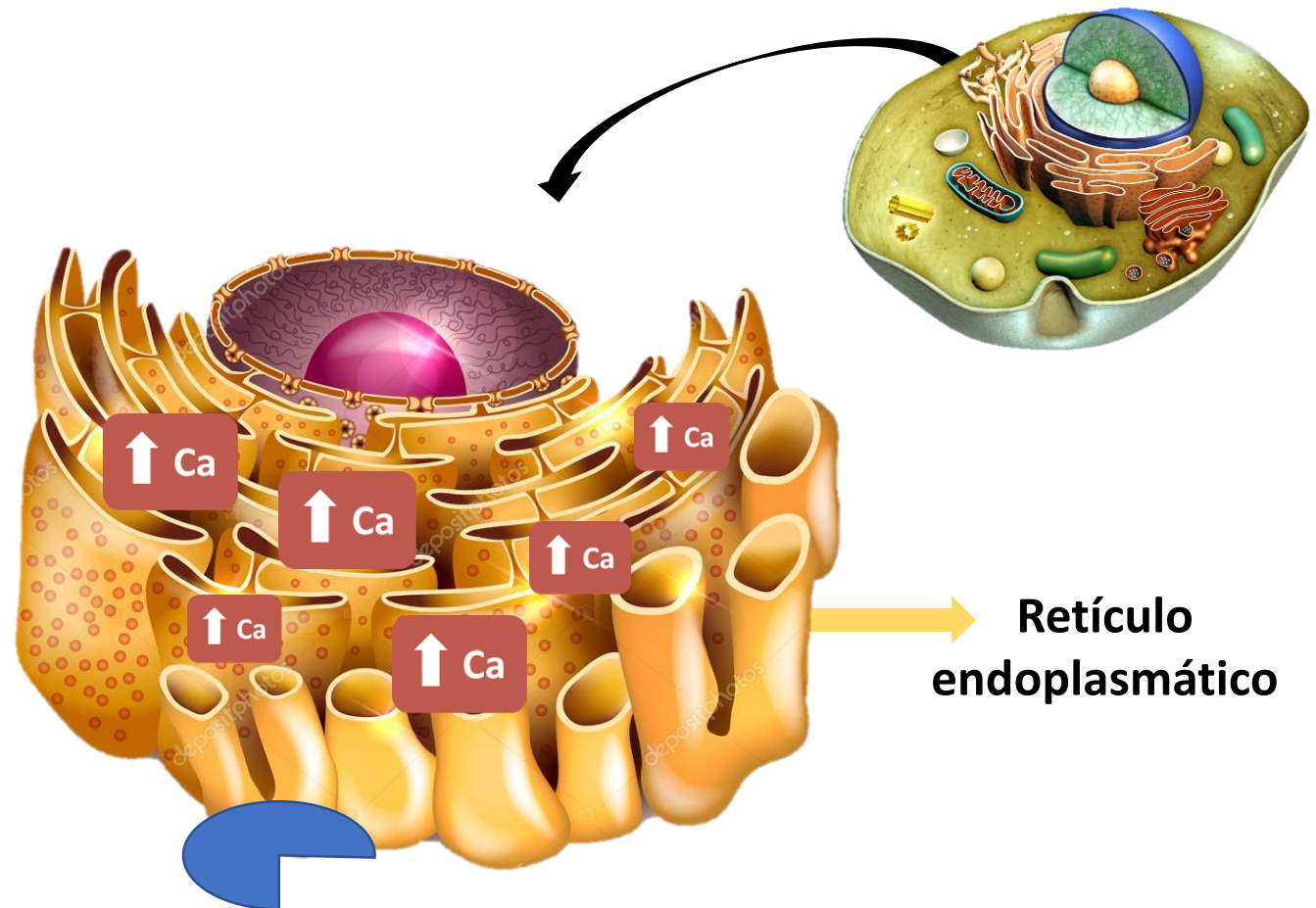


Inibidor de proteína quinase beta
dependente de AMPc

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

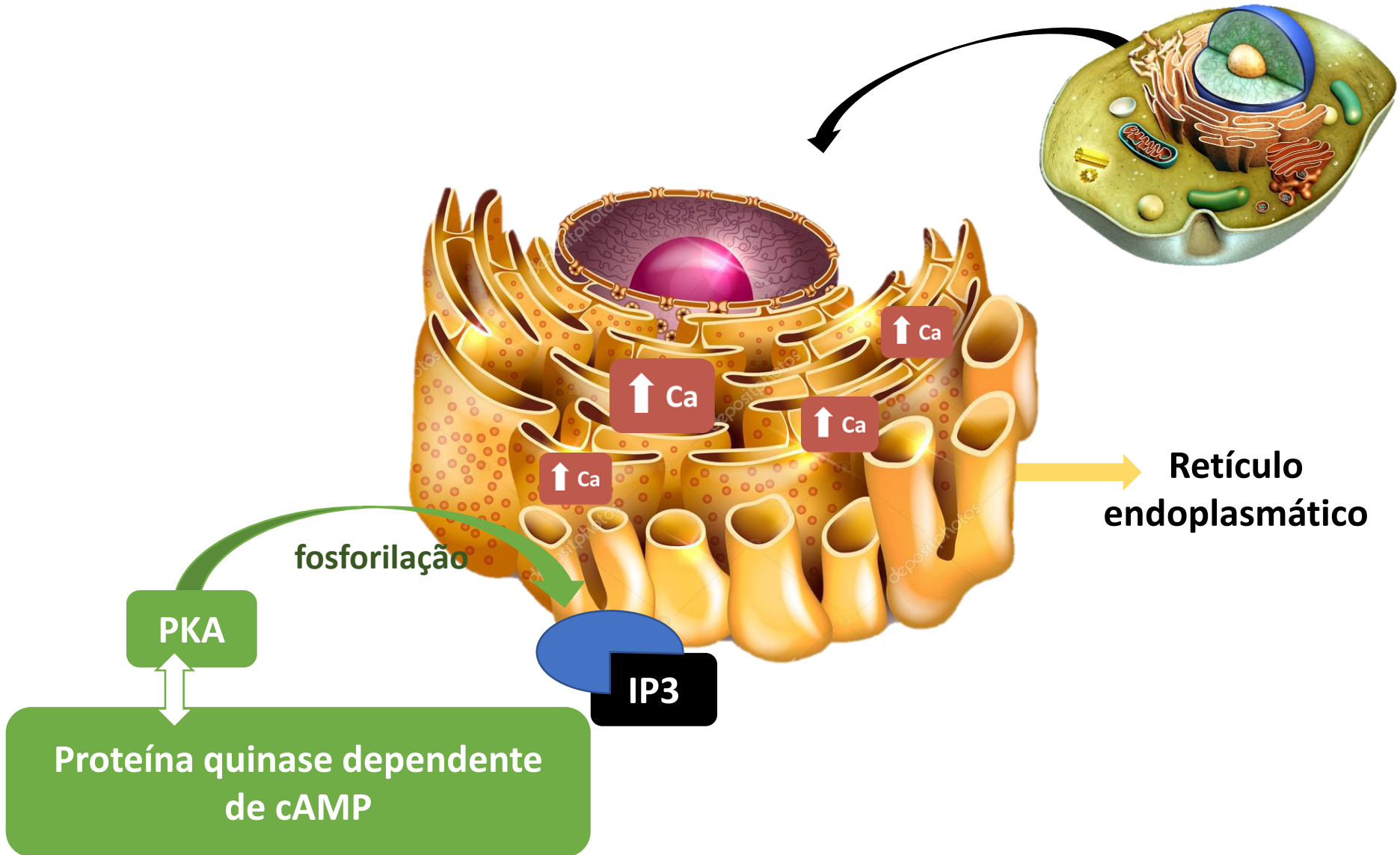


DISCUSSÃO

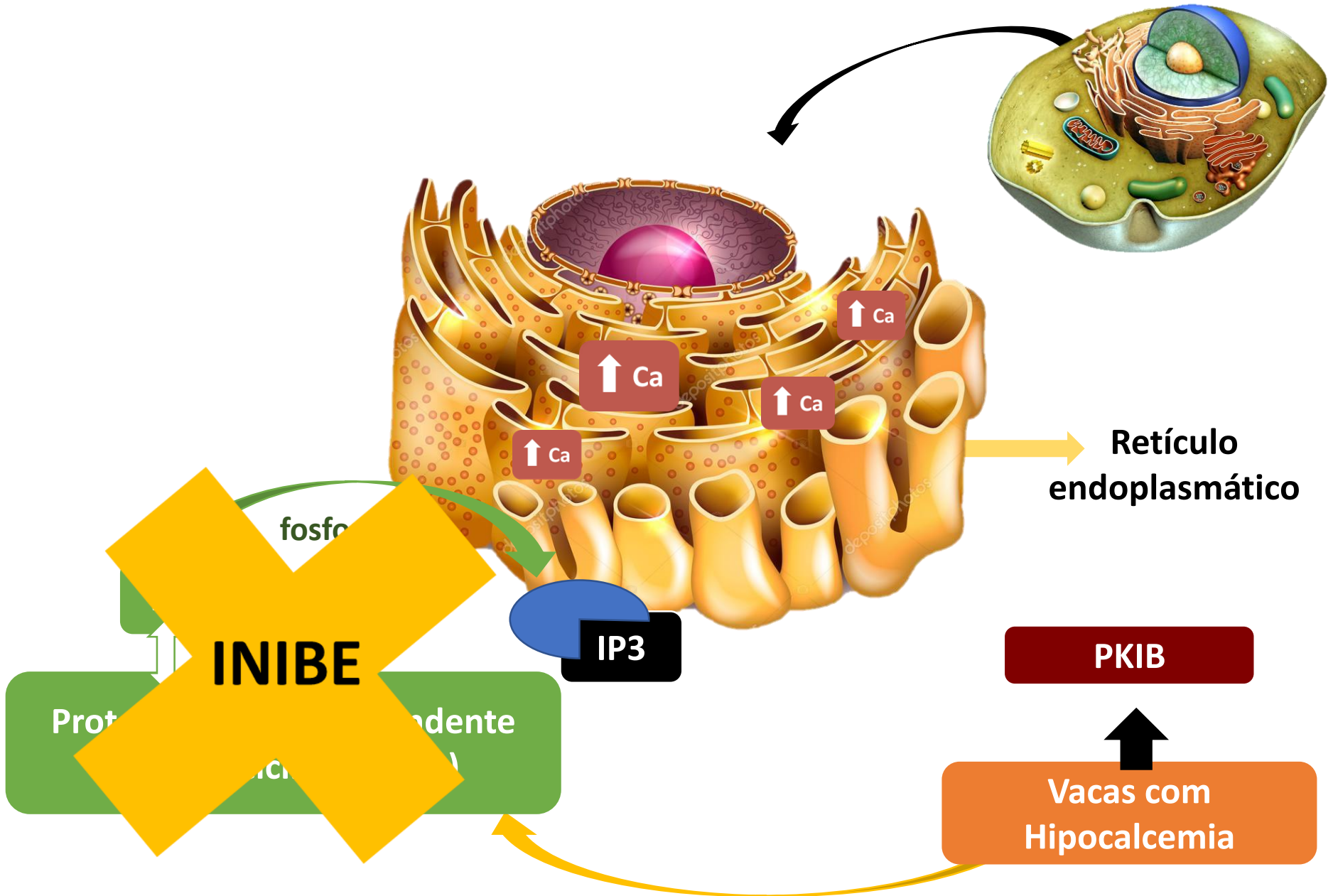


IP3 (inositol **IP3** -trifosfato)

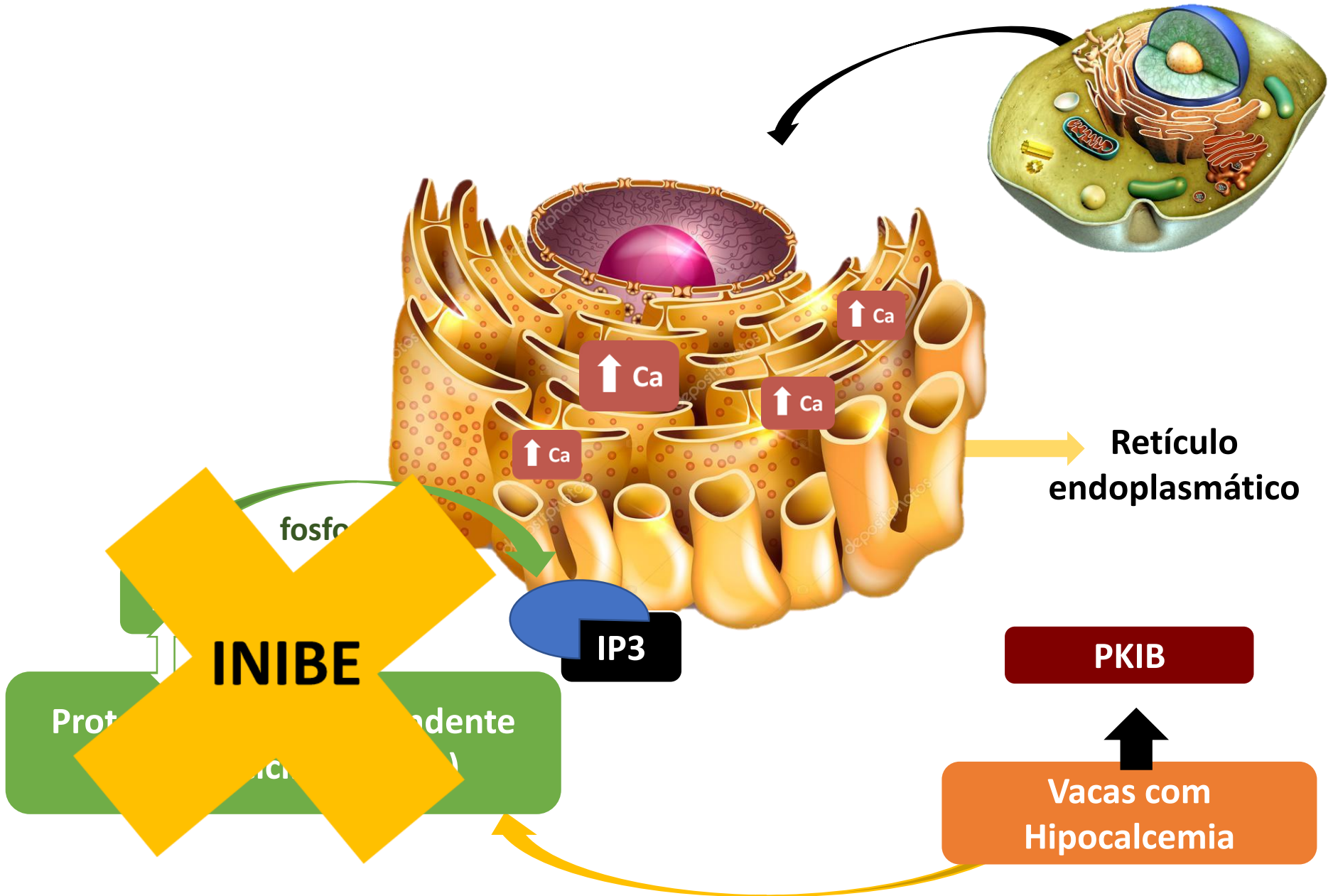
DISCUSSÃO



DISCUSSÃO



DISCUSSÃO



DISCUSSÃO



Simplificando

inibe

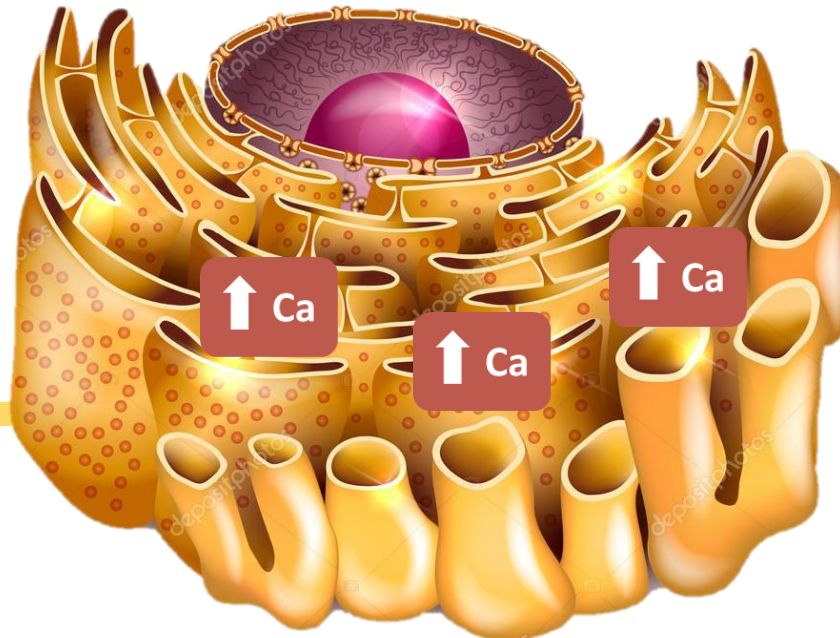
PKIB

PKA

Falha na sinalização

Retículo
endoplasmático

Faz com que o Ca
fique armazenado
no Retículo
Endoplasmático



RESULTADOS



Expressão gênica

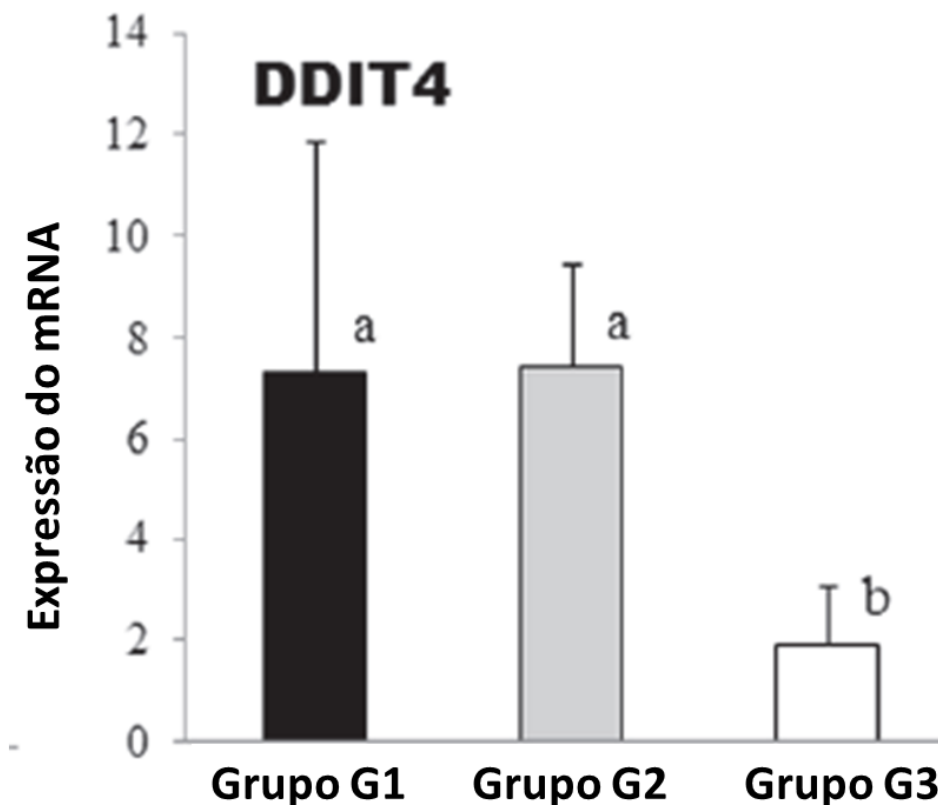


Fig. Expressão de mRNA do gene DDIT4 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

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 envolvida no crescimento e proliferação celular e evita a

FUNÇÃO

imunossupressão

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

(Zebelli et al., 2013)

RESULTADOS

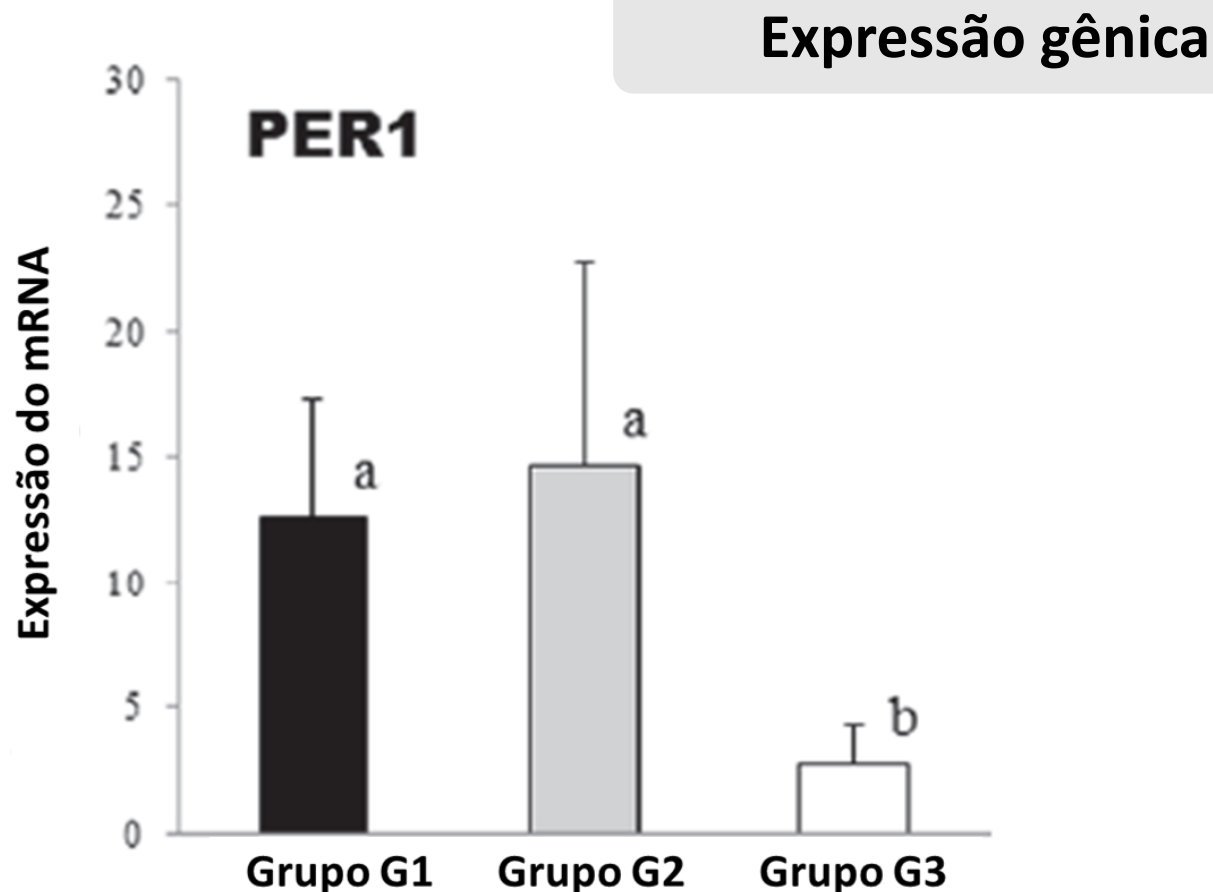


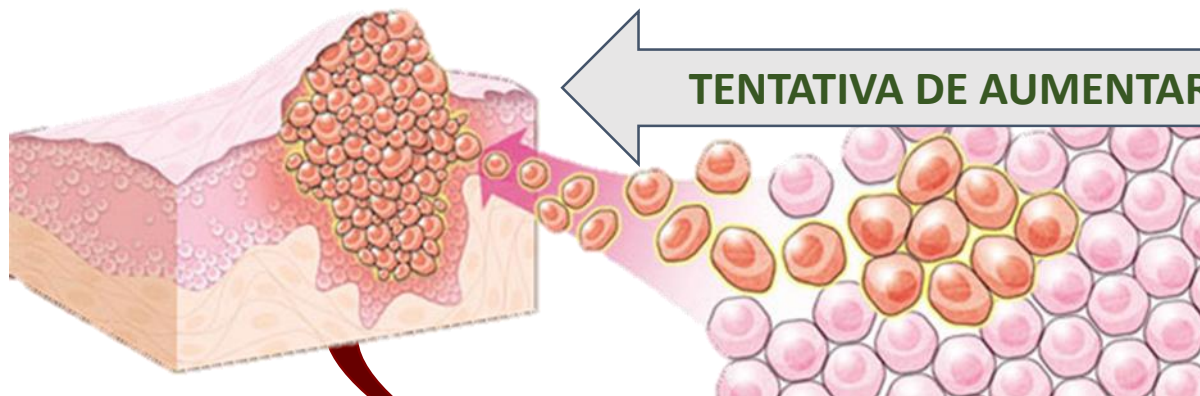
Fig. Expressão de mRNA do gene PER1 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO



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

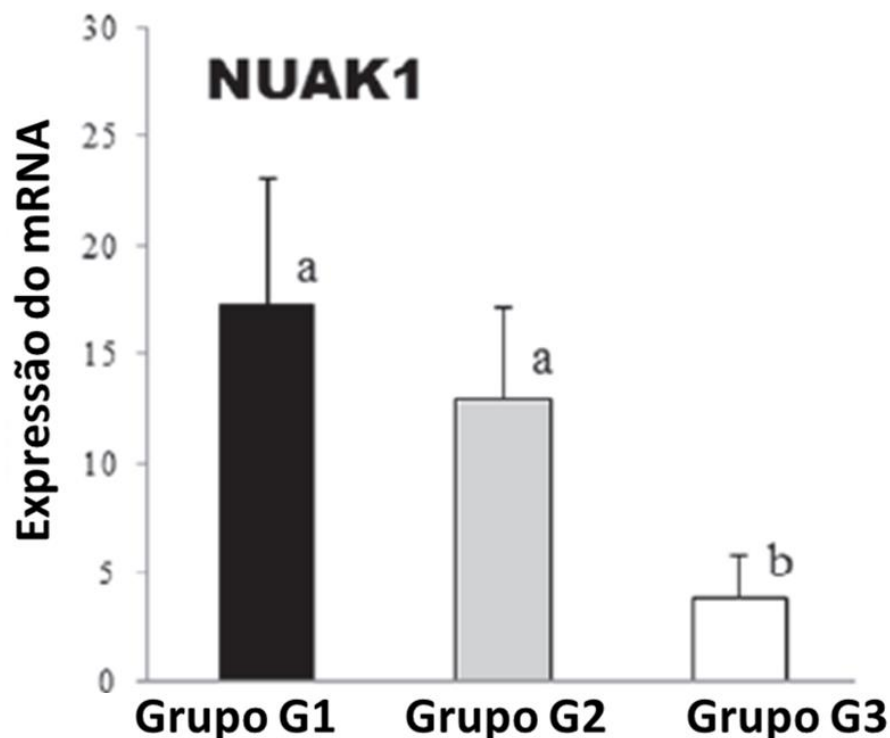


Fig. Expressão de mRNA do gene NUA1 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO



NUAK1

função

**Diminuir a captação de
glicose pelos tecidos**

Através da
resistência
a insulina

(Inazuka et al., 2012)

Sistema imune

Falta glicose

glicose

**Produção
de leite**



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

Linfócito

(Maclever et al., 2008)

RESULTADOS



Expressão gênica

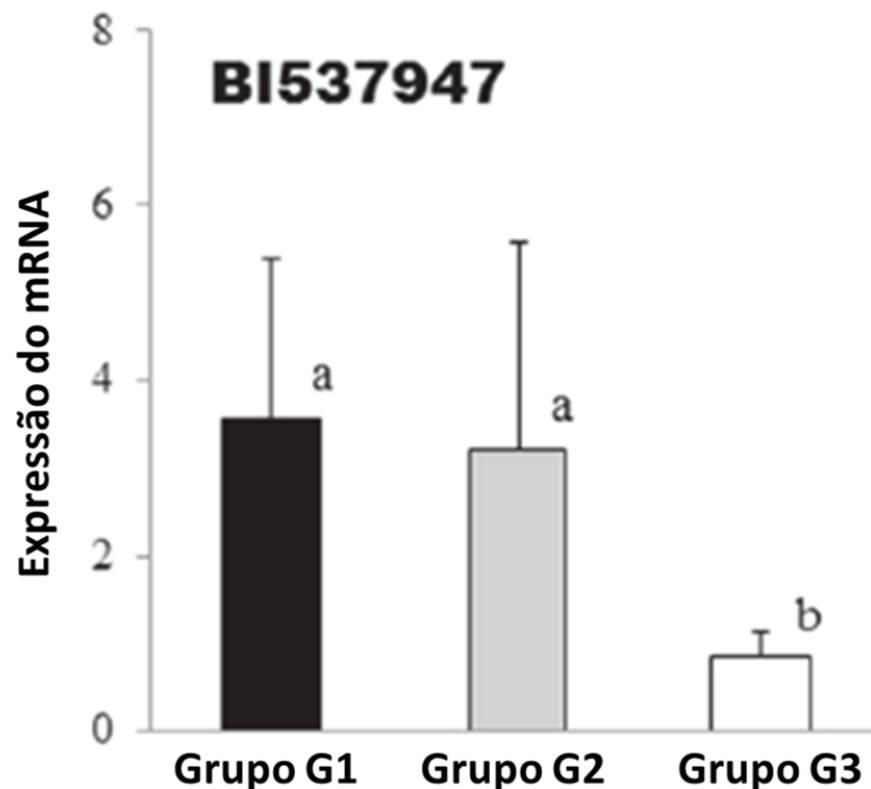


Fig. Expressão de mRNA do gene BI537947 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

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 clinica
espontânea (G1 e G2) e vacas
cl clinicamente saudáveis (G3)**

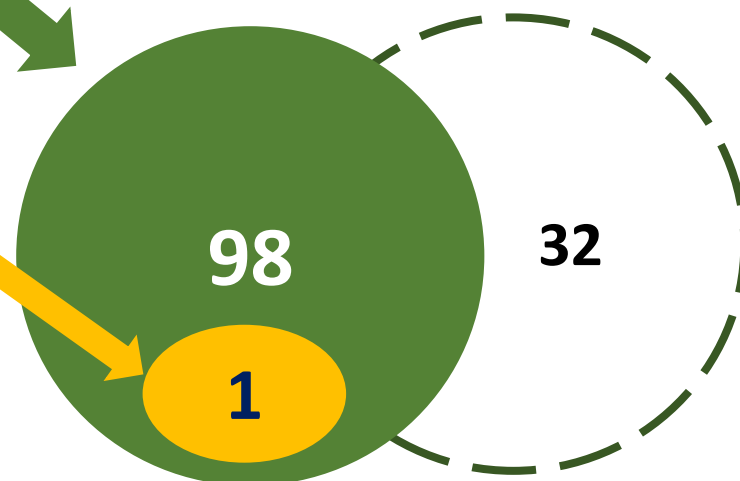


Fig. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos entre os grupos hipocalcemia clinica induzida e hipocalcemia clinica espontânea.



RESULTADOS



Expressão gênica

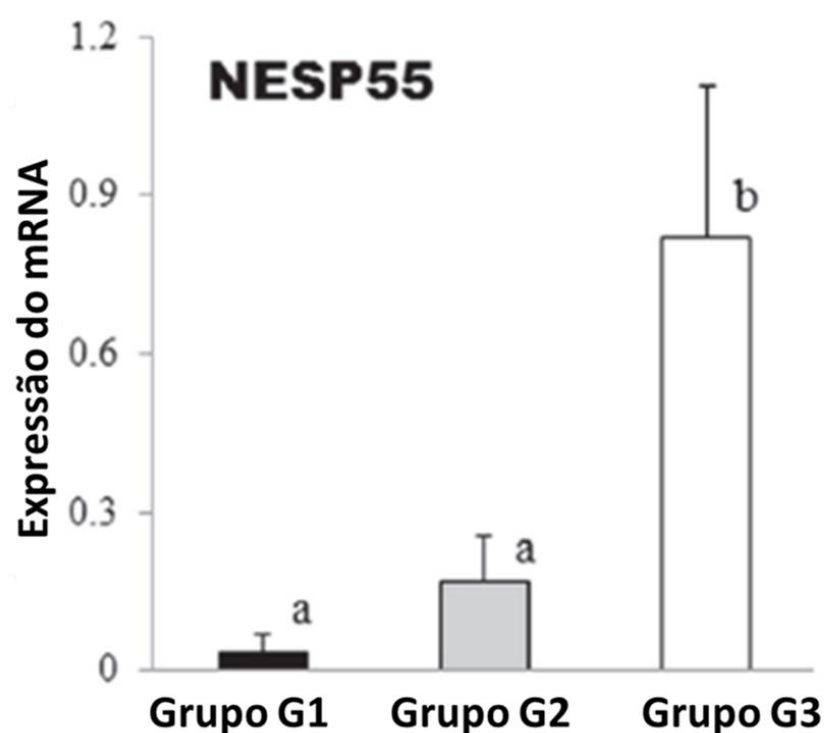


Fig. Expressão de mRNA do gene NESP55 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS



Expressão gênica

NESP55

Esse gene não foi expresso em vacas induzidas a hipocalcemia clínica

Mas foi alterado em vacas com hipocalcemia clínica espontânea

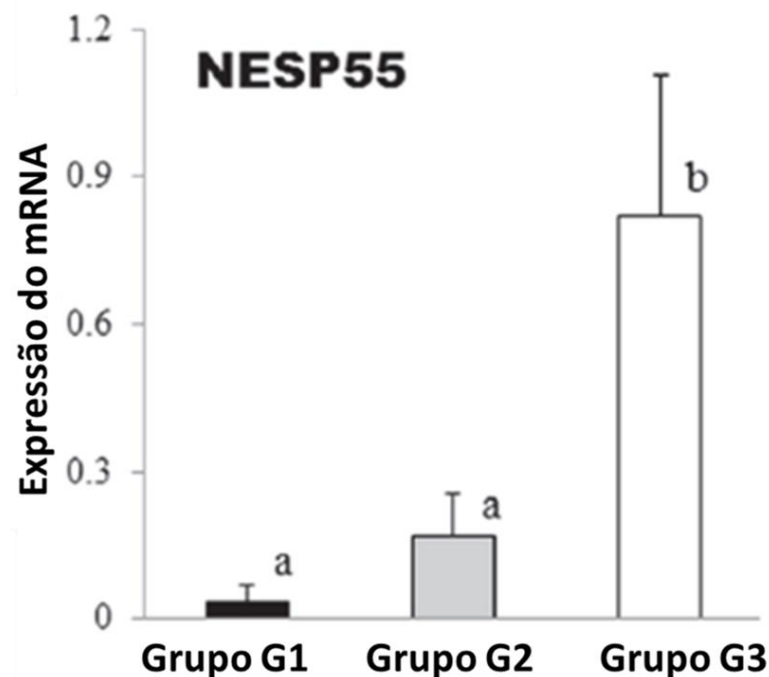


Fig. Expressão de mRNA do gene NESP55 em célula mononuclear de vacas leiteiras com hipocalcemia clínica espontânea (grupos G1 e G2) e clinicamente saudável (grupo G3). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

RESULTADOS



NESP55

Em humanos ele esta 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



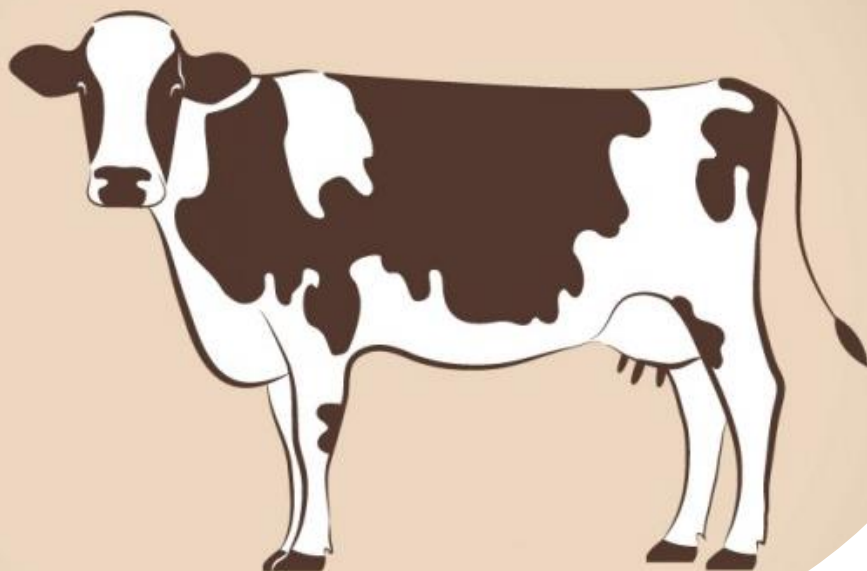
Hipocalcemicas



IMUNOSSUPRESSÃO

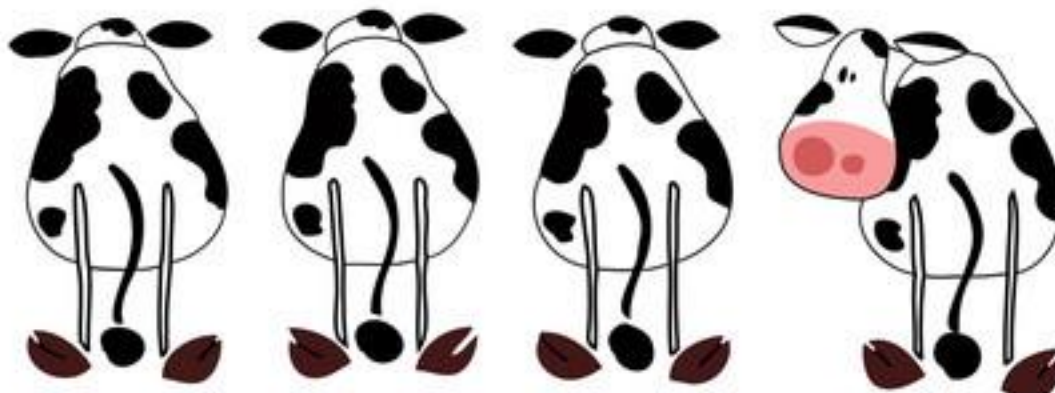


Predisposição a
outras doenças



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

Análise da expressão gênica



Butafosfan em gel

A close-up photograph of a black and white cow's face, looking directly at the camera. The cow has a white blaze on its forehead and a pink nose with black spots. It is wearing yellow ear tags. The background is a blurred barn interior.

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