

Identificação de novos miRNAs expressos em tetos extracorpóreos bovinos inoculados com *Streptococcus agalactiae*

Lidiane Loeffler Lima^{(1) (8)}, Sabrina Marques Oliveira de Paulo⁽²⁾, Leticia Milena de Jesus⁽³⁾, Raíssa Cury Ferreira⁽⁴⁾, Isabela Fonseca⁽⁵⁾, Robert Domingues⁽⁶⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁶⁾, Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁷⁾ e Marta Fonseca Martins⁽⁷⁾

⁽¹⁾Estudante de graduação, Centro Universitário do Sudeste Mineiro, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estudante de graduação, Centro Universitário UniAcademia, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Estudante de graduação, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Professora, Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG. ⁽⁶⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁷⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁸⁾E-mail: lidianeloefflerlima@gmail.com.

Resumo — A mastite é uma inflamação da glândula mamária que compromete a saúde dos mamíferos e reduz a qualidade do leite. A doença pode ser subclínica, sem sinais visíveis, ou clínica, apresentando sintomas como inflamação do úbere e presença de pus e sangue no leite. Dentre as principais causas da doença podemos citar a infecção por microrganismos patogênicos, como os Gram positivos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Um caminho promissor para o controle da mastite é o melhoramento genético, e, assim, identificar genes relacionados com a resistência à doença é crucial para o desenvolvimento de melhores estratégias. Nesse contexto, os microRNAs desempenham um papel vital, regulando a expressão gênica e modulando a resposta imune. Assim, este estudo teve como objetivo investigar se existem miRNAs bovinos ainda não conhecidos e expressos durante a infecção bacteriana no teto. Para isso, úberes extracorpóreos de vacas foram inoculados com *S. agalactiae* e tecidos alveolares foram coletados para análise. A análise por bioinformática identificou 1.517 miRNAs, dos quais 679 eram conhecidos e 838 novos. Estes resultados fornecem uma base para futuras pesquisas sobre a regulação de genes e a resposta imune em bovinos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate à mastite.

Termos para indexação: bioinformática; expressão gênica; resposta imune.

Identification of new miRNAs expressed in bovine extracorporeal teats inoculated with *Streptococcus agalactiae*

Abstract — Mastitis is an inflammation of the mammary gland that affects the health of mammals and reduces milk quality. The disease can be subclinical, without visible signs, or clinical, presenting symptoms such as udder inflammation and the presence of pus and blood in the milk. Among the main causes of the disease are infections by pathogenic microorganisms, such as the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. A promising approach for controlling mastitis is genetic improvement, and thus, identifying genes related to disease resistance is crucial for developing better strategies. In this context, microRNAs play a vital role, regulating gene expression and modulating the immune response. Therefore, this study aimed to investigate whether there are bovine miRNAs that are yet to be discovered and expressed during bacterial infection in the teat. For this purpose, extracorporeal udders of cows were inoculated with *S. agalactiae* and alveolar tissues were collected for analysis. Bioinformatics analysis identified 1,517 miRNAs, of which 679 were known and 838 were new. These results provide a basis for future research on gene regulation and immune response in cattle, contributing to the development of more effective strategies to combat mastitis.

Index terms: bioinformatics; gene expression; immune response.

Introdução

A mastite é uma inflamação da glândula mamária que compromete a saúde e bem-estar dos animais, além de reduzir a produção e qualidade do leite. Ela se classifica em mastite subclínica, sem sinais visíveis, e mastite clínica, caracterizada pela inflamação do teto, perda de apetite, febre, alterações comportamentais, redução na produção, bem como pela presença de pus e sangue no leite secretado (Chung et al., 2021). As causas da mastite em vacas incluem traumas mecânicos, exposição a compostos químicos e infecção por microrganismos ambientais e/ou patogênicos. Em relação aos micro-organismos patogênicos associados à mastite, destacam-se as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que podem ser transmitidos de forma contagiosa de uma vaca para outra durante o processo de ordenha (Ruegg, 2017).

A abordagem predominante para tratar e prevenir a mastite é por meio da antibioticoterapia, seja durante a lactação ou no período seco (Krömker; Leimbach, 2017). No entanto, o uso constante de antibióticos na pecuária tem levantado preocupações significativas devido à seleção de micro-organismos resistentes, que podem ser transferidos para humanos e/ou disseminados pelo solo, alimentos e águas subterrâneas (Lhermie et al., 2017). Por essa razão, há uma demanda crescente por pesquisas focadas na identificação e seleção de variações de genes que promovam a resistência à mastite, visando selecionar bovinos geneticamente mais resistentes a essa doença e também em formas alternativas de controle (Sahana et al., 2014; Li et al., 2018).

Alguns estudos indicam que os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes, desempenham um papel crucial na regulação gênica e na resposta imune, especialmente nas primeiras horas após infecções experimentais de vacas por *S. agalactiae* (Fonseca et al., 2015; Pereira et al., 2021). Assim, este estudo teve como objetivo investigar se existem miRNAs bovinos ainda não conhecidos e expressos em vacas após infecção com *S. agalactiae* em úberes extracorpóreos.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 1 – “Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares”; ODS 3 – “Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades”; ODS 12 - “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

Úberes de quatro vacas destinadas para abate foram mantidos em um sistema extracorpóreo (Pinto et al., 2017). Os tetos esquerdos foram inoculados com *Streptococcus agalactiae*, enquanto os tetos direitos serviram como controle não inoculado. Biópsias dos tecidos alveolares foram coletadas nos tempos 0 horas e 3 horas após a infecção, preservadas em RNAlater® e o RNA total enriquecido com miRNA foi extraído utilizando o kit MiRNeasy Tissue/Cells Advanced (Qiagen, Alemanha). As amostras de RNA foram sequenciadas usando a tecnologia NGS Illumina®. A qualidade do sequenciamento foi avaliada pelo Q-Score, onde um valor alto indica menor probabilidade de erro e maior precisão. Após isso, um controle de qualidade dos *reads* foi realizado, excluindo aqueles com menos de 18 pb, mais de 30 pb, com mais de 10% de bases não reconhecidas (N), ou com Q-Score menor que 30. Os *reads* foram alinhados utilizando o software Bowtie contra os bancos de dados Silva, GtRNADB, Rfam e Rfam para quantificar os tipos de RNAs

presentes (rRNA, scRNA, snRNA, snoRNA, tRNA e sequências repetitivas). Em seguida, os reads foram mapeados no genoma de referência *Bos taurus* GCF_002263795.3_ARS_UCD 2.0 e comparados com miRNAs maduros no banco de dados miRBase (v.22), considerando apenas leituras com no máximo uma incompatibilidade. Utilizando mirDeep2, as leituras foram analisadas para prever novos miRNAs baseados no genoma de referência *Bos taurus* GCF_002263795.3_ARS_UCD 2.0.

Resultados e discussão

A análise por bioinformática dos dados gerou 215.958.297 sequências limpas, ou seja, sequências de alta qualidade filtradas para remover contaminantes. A partir dessas sequências, foram identificados 1.517 miRNAs, dos quais 679 eram conhecidos e 838 não tinham sido descritos anteriormente. Isso indica que há um número maior de miRNAs desconhecidos do que de miRNAs conhecidos. Além disso, a identificação de tantos miRNAs novos destaca a complexidade da resposta imunológica mediada por miRNAs em bovinos após infecção por *S. agalactiae*. Dessa forma, os novos miRNAs encontrados neste estudo podem ser alvos promissores para biomarcadores de diagnóstico precoce da mastite, embora suas funções ainda precisam ser elucidadas. Para isso, ferramentas como o TargetScan, que preveem quais mRNAs podem ser regulados por miRNAs desconhecidos com base na complementaridade de sequências, podem ser valiosas para identificar essas funções. Assim, a análise funcional desses miRNAs pode revelar novas vias regulatórias e mecanismos moleculares importantes em resposta à infecção por *S. agalactiae* em bovinos.

Conclusões

Foram identificados 1517 miRNAs em tetos extracorpóreos de vacas infectados com *S. agalactiae* após 3 h, dos quais 838 não haviam sido descritos anteriormente.

Agradecimentos

À Fapemig (Processo APQ-02750-23), ao CNPq, e ao INCT-CA/Brasil pelo suporte financeiro.

Referências

- CHUNG, L. K.; SAHIBZADA, S.; ANNANDALE, H. C.; ROBERTSON, I. D.; WAICHIGO, F. W.; TUFAIL, M. S.; ALERI, J. A. Bacterial pathogens associated with clinical and subclinical mastitis in a Mediterranean pasture-based dairy production system of Australia. **Research in Veterinary Science**, v.141, p.103-109, 2021. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.10.005>.
- FONSECA, I.; CARDOSO, F. F.; HIGA, R. H.; GIACHETTO, P. F.; BRANDÃO, H. D. M.; BRITO, M. A. V. P.; FERREIRA, M. D. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; MARTINS, M. F. Gene expression profile in zebu dairy cows (*Bos taurus indicus*) with mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*. **Livestock Science**, v.180, p. 47-57, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.07.012>.
- KRÖMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment: reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S3, p. 21-29, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13032>.
- LHERMIE, G.; GRÖHN, Y. T.; RABOISSON, D. Addressing antimicrobial resistance: an overview of priority actions to prevent suboptimal antimicrobial use in food-animal production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2114, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02114>.
- LI, Z.; HU, Y.; YANG, Y.; LU, Z.; WANG, Y. Antimicrobial resistance in livestock: antimicrobial peptides provide a new solution for a growing challenge. **Animal Frontiers**, v. 8, n. 2, p. 21-29, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/af/vfy005>.

PEREIRA, H. P.; VERARDO, L. L.; WELLER, M. M. D. C. A.; SBARDELLA, A. P.; MUNARI, D. P.; DAIBERT, R. M. de P.; CARVALHO, W. A.; MACHADO, M. A.; MARTINS, M. F. Going further post-RNA-seq: in silico functional analyses revealing candidate genes and regulatory elements related to mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 88, n. 3, p. 286-292, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029921000571>.

PINTO, I. S. B.; FONSECA, I.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; GUIMARÃES, A. S.; CARVALHO, W. A.; BRITO, M. A. V. P.; VICCINI, L. F.; MARTINS, M. F. Evaluation of perfused bovine udder for gene expression studies in dairy cows. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, gmr16019637, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16019637>.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, n. 12, p. 10381-10397, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; THOMSEN, B.; HOLM, L. E.; PANITZ, F.; BRØNDUM, R. F.; BENDIXEN, C.; LUND, M. S. Genome-wide association study using high-density single nucleotide polymorphism arrays and whole-genome sequences for clinical mastitis traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 7258-7275, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8141>.