

POLIMORFISMOS NO GENE DA TRANSFERRINA EQUINA NAS RAÇAS BRASILEIRO DE HIPISMO E PURO SANGUE DE CORRIDA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À PNEUMONIA POR *Rhodococcus equi*

J Magdiél A. Reghelin¹, Agueda P. C. Vargas², Bibiana P. Silveira³, Letícia T. Gressler⁴, Valessa L. Ely³, Igor Dumaszk ¹, Adriana R. de Vasconcelos¹.

1. Estudante de IC no Departamento De Medicina Veterinária Preventiva e Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
2. CCR-UFSM, Departamento De Medicina Veterinária Preventiva / Orientador.
3. Discente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva da UFSM.
4. Docente em Instituto Federal Faropilha - Campus Frederico Westphalen.

Resumo:

Rodococose equina está entre as principais causa de morte em potros em todo o mundo (Muscatello et al., 2007). Diferenças de susceptibilidade à pneumonia por *Rhodococcus equi* tem sido associada à genes relacionados à resposta imune. O gene da Tranferrina (Tf) equina é um dos genes candidatos a esta associação.

A Tf é uma proteína presente no plasma de mamíferos e tem por função regular a disponibilidade de ferro (Fe), micro-nutriente fundamental para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Em equinos, já foram descritos mais de 15 alelos de Tf decorrentes de polimorfismos genéticos. A existência de um grande número de variantes para Tf equina sugere a ocorrência de pressão de seleção nesta proteína, relacionada à infecção por bactérias detentoras de sistemas de captação de Fe a partir da Tf.

Diante disso, buscou-se avaliar a relação entre alelos de Tf equina e a predisposição à infecção por *R. equi* em equinos da raça Puro Sangue de Corrida (PSC) e Brasileiro de Hipismo (BH).

Autorização legal: Todos os procedimentos para este estudo foram avaliados e aprovados pelo Comitê de ética de uso animal (protocolo 133/2014), Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

Palavras-chave: Potros; Alelos; Ferro.

Apoio financeiro: PROBITI - Programa Institucional de Bolsas De Iniciação Tecnológica e Inovação.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSM - Universidade Federal de Santa Maria.

Introdução:

No Brasil, a criação de equinos está em constante crescimento, gera muitos empregos e traz um grande retorno econômico. Uma doença conhecida mundialmente por ser a principal responsável pela morte de potros é a pneumonia. Além dos prejuízos econômicos, seja em tratamento ou na perda de um animal produtivo, a rodococose, causada pela bactéria *Rhodococcus equi*, é significativa quanto à saúde pública por representar uma zoonose, acometendo principalmente imunodepressivos, crianças e idosos.

Rhodococcus equi é uma bactéria Gram positiva, intracelular facultativa, que aproveita o sistema imune imaturo do potro para se desenvolver. Diferenças de susceptibilidade à pneumonia por *R. equi* tem sido associada à genes relacionados à resposta imune. Existem também grandes evidências de que há uma base genética de susceptibilidade à infecção por *R. equi* em potros, devido a disponibilidade de ferro na circulação sanguínea destes animais.

O gene da Tranferrina (Tf) equina é um dos genes candidatos a esta associação (Mousel et al., 2003). A Tf é uma proteína presente no plasma de mamíferos (Brandon et al., 1999; Carpenter and Broad, 1993) e dentre as suas funções está a regulação da disponibilidade de ferro (Fe) na corrente sanguínea, micro-nutriente este, fundamental para o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos. Apesar disso, algumas bactérias desenvolveram um modo de se ligarem às transferrinas, conseguindo sobreviver a partir delas. Baseado no tipo de transferrina de um animal, podemos afirmar se ele é mais susceptível ou resistente a uma infecção por *R. equi*.

Polimorfismos bioquímicos de transferrina foram identificados em várias espécies, incluindo humanos, bovinos, ovinos e equinos. Além disso, a expressão de fatores de virulência em *R. equi* é fortemente dependente de Fe, sendo este um determinante na sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos. Em equinos, já foram descritos mais de 15 alelos de Tf decorrentes de polimorfismos genéticos (Brandon et al., 1999). A existência de um grande número de variantes para Tf equina sugere a ocorrência de pressão de seleção nesta proteína, que pode estar relacionada à infecção por bactérias detentoras de sofisticados sistemas de captação de Fe a partir da Tf.

O objetivo deste trabalho é avaliar a relação entre alelos de Tf equina e a predisposição à infecção por *R. equi* em equinos da raça Puro Sangue de Corrida (PSC) e Brasileiro de Hipismo (BH).

Metodologia:

Foram coletadas amostras de sangue total de 76 equinos, 47 amostras da raça Brasileiro de Hipismo (BH) e 29 de Puro Sangue de Corrida (PSC), oriundos de fazendas endêmicas para rodococose da região central do estado do Rio Grande do Sul. A partir de levantamento, observou-se que dos 79 animais avaliados, 44 não possuíam histórico clínico de pneumonia por *R. equi*, e 32 possuíam.

Sangue venoso foi coletado a partir da jugular por venopunção em tubos de Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo EDTA. O DNA foi isolado a partir de leucócitos por DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante e armazenado em -20° C até o uso.

Foram usadas amostras de DNA com relação A_{260}/A_{280} entre 1.7 e 1.9. As amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para quatro éxons do gene da Tf equina (éxon 13, 14, 15 e 16). Estes exons corresponderam aos exons 12 (cDNA 1466-1610 BP), 13 (cDNA 1611-1675 BP), 14 (cDNA 1676-1860 BP), e 15 (cDNA 1865-2050 BP), de acordo com a base de dados Ensemble. Todos os exons são situados no correspondente da transcrição do cDNA ao domínio 2 do gene TF, que codificam o lobo-C da proteína do TF.

Resultados e Discussão:

A análise dos sequenciamentos realizados foi capaz de cobrir 79,2% (n=14) do total de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) descritos anteriormente (n=24). A partir de SNPs observados na posição 1678 (CGT/TGT) do éxon 15 foi realizada a classificação dos animais em três variantes: FF, DD e FD. As demais SNPs encontradas nos exons 13, 14 e 16 não tiveram poder discriminatório entre as variantes conhecidas.

Sendo assim, as sequências contendo o códon CGT foram classificadas como variante FF, as que continham o TGT como DD e as sequências heterozigotas como variante FD. A variante FF foi predominante no PSC e a FD no BH, no entanto a frequência da variante DD foi similar entre as raças. O alelo D foi o menos comum em ambas as raças. O acúmulo do alelo F parece estar relacionado à maior sensibilidade a rodococose.

Conclusões:

A variante FF foi predominante no PSC e a FD no BH, no entanto a frequência da variante DD foi similar entre as raças. O alelo D foi o menos comum em ambas as raças. O acúmulo do alelo F parece estar relacionado à maior sensibilidade a rodococose.

Nossos resultados corroboram com a hipótese de susceptibilidade genética à rodococose devido ao excesso de alelo F, diferentemente da sugestão de estudos prévios em que a resistência estaria baseada no alelo D. É difícil estabelecer a real importância de polimorfismos genéticos na susceptibilidade às enfermidades, portanto são necessários estudos que expliquem os mecanismos biológicos e diferenças funcionais dos polimorfismos da Tf.

Referências bibliográficas

Brandon, R.B., Giffard, J.M., Bell, K., 1999. Single nucleotide polymorphisms in the equine transferrin gene. *Animal genetics* 30, 439-443.

Carpenter, M.A., Broad, T.E., 1993. The cDNA sequence of horse transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1173, 230-232.

Mousel, M.R., Harrison, L., Donahue, J.M., Bailey, E., 2003. *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 15, 470-472.

Muscattello, G., Leadon, D.P., Klayt, M., Ocampo-Sosa, A., Lewis, D.A., Fogarty, U., Buckley, T., Gilkerson, J.R., Meijer, W.G., Vazquez-Boland, J.A., 2007. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. *Equine veterinary journal* 39, 470-478.