

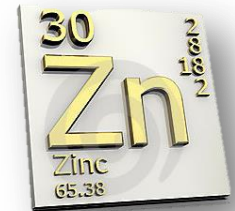


*Suplementação materna com microminerais orgânicos altera a expressão de mRNA e microRNA nos neutrófilos e marcadores sistêmicos de inflamação e estresse oxidativo no bezerro*

*Patrícia Mattei*

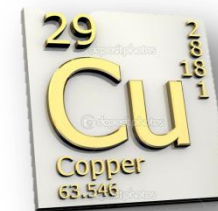
# Introdução

➤ **Microminerais:** necessários em pequenas quantidades, expressos em ppm - mg/kg

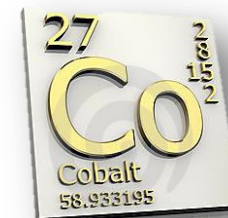


➤ **Papel importante na imunidade**

- Funcionamento de metaloenzimas;
- Estudos com deficiência de microminerais: prejuízo da resposta imune e suscetibilidade à doenças
- Zn orgânico: aumento da resposta imune e prod. leiteira



➤ **Quantidades adequadas para cada estágio produtivo**

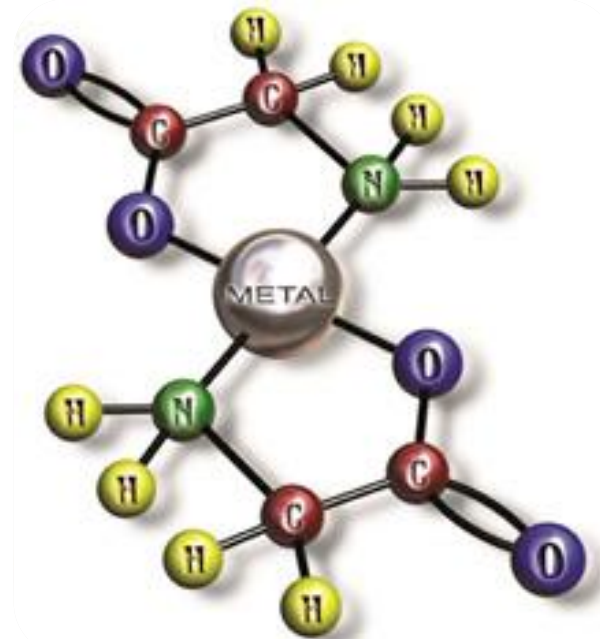


# Introdução

## ➤ Suplementação como sais inorgânicos

## ➤ Vantagens da utilização de minerais orgânicos

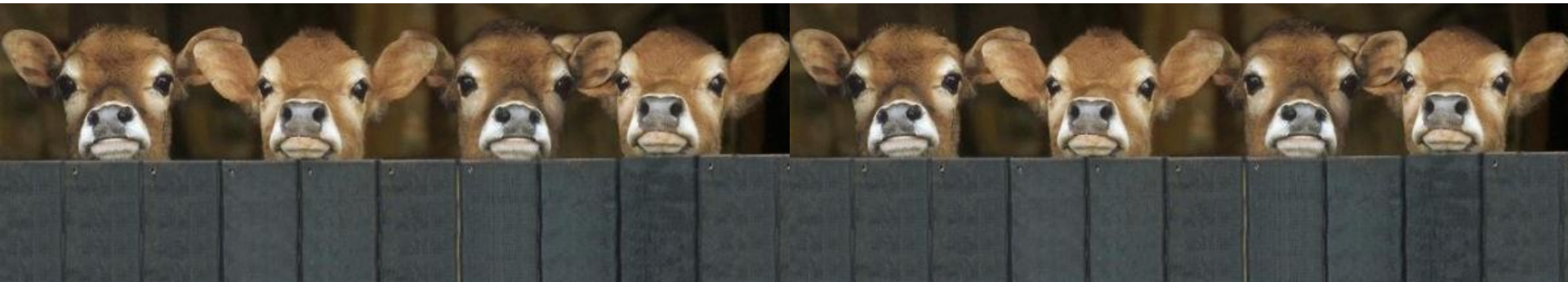
- Aumento da eficiência de absorção;
- Maior biodisponibilidade;
- Não sofrem interações com outros minerais;
- Redução do nível de inclusão na dieta;
- Redução da poluição ambiental.



# Introdução

- **790 bezerros**
- **Injeções subcutâneas com microminerais nos dias 3 e 30:**
  - Aumento da atividade da glutathione peroxidase em duas semanas;
  - Menor incidência de diarreia, pneumonia e/ou otite;
  - **Melhora na atividade dos neutrófilos → modulação da imunidade inata**

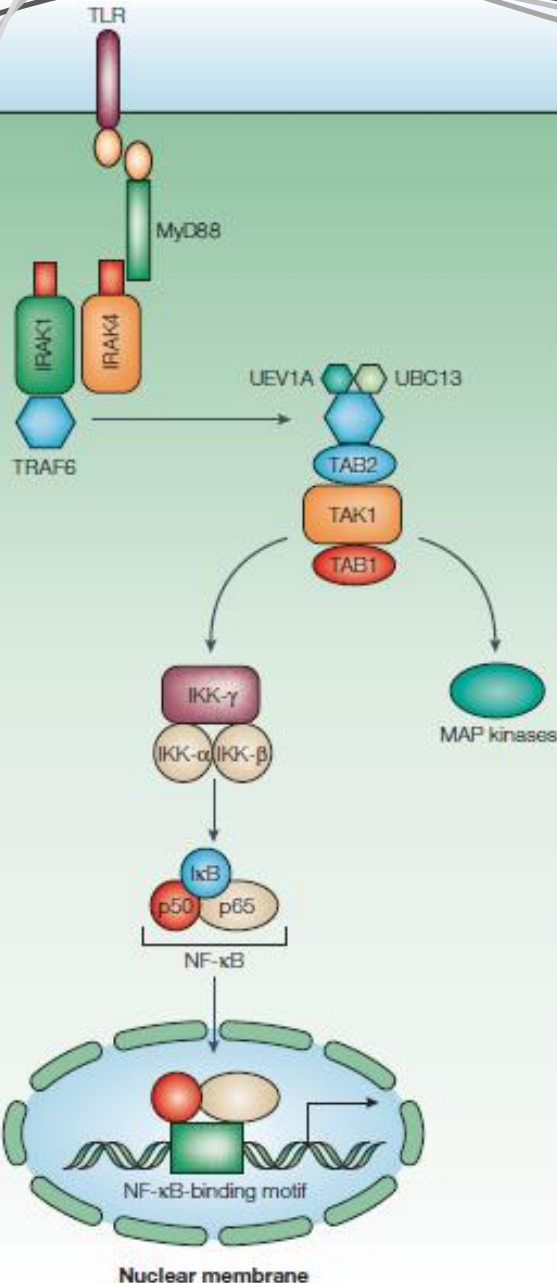
Teixeira et al., 2014







# Introdução



➤ Transcrição

➤ mRNA

➤ RNA polimerase

➤ Fator de transcrição

- Proteína/complexo proteico que se liga a sequências específicas do DNA, controlando a taxa de transcrição dessas sequências
- Ligam-se à sequências reforçadoras/promotores do DNA, próx aos genes que regulam – promove ou bloqueia o recrutamento/ligação da RNA polimerase

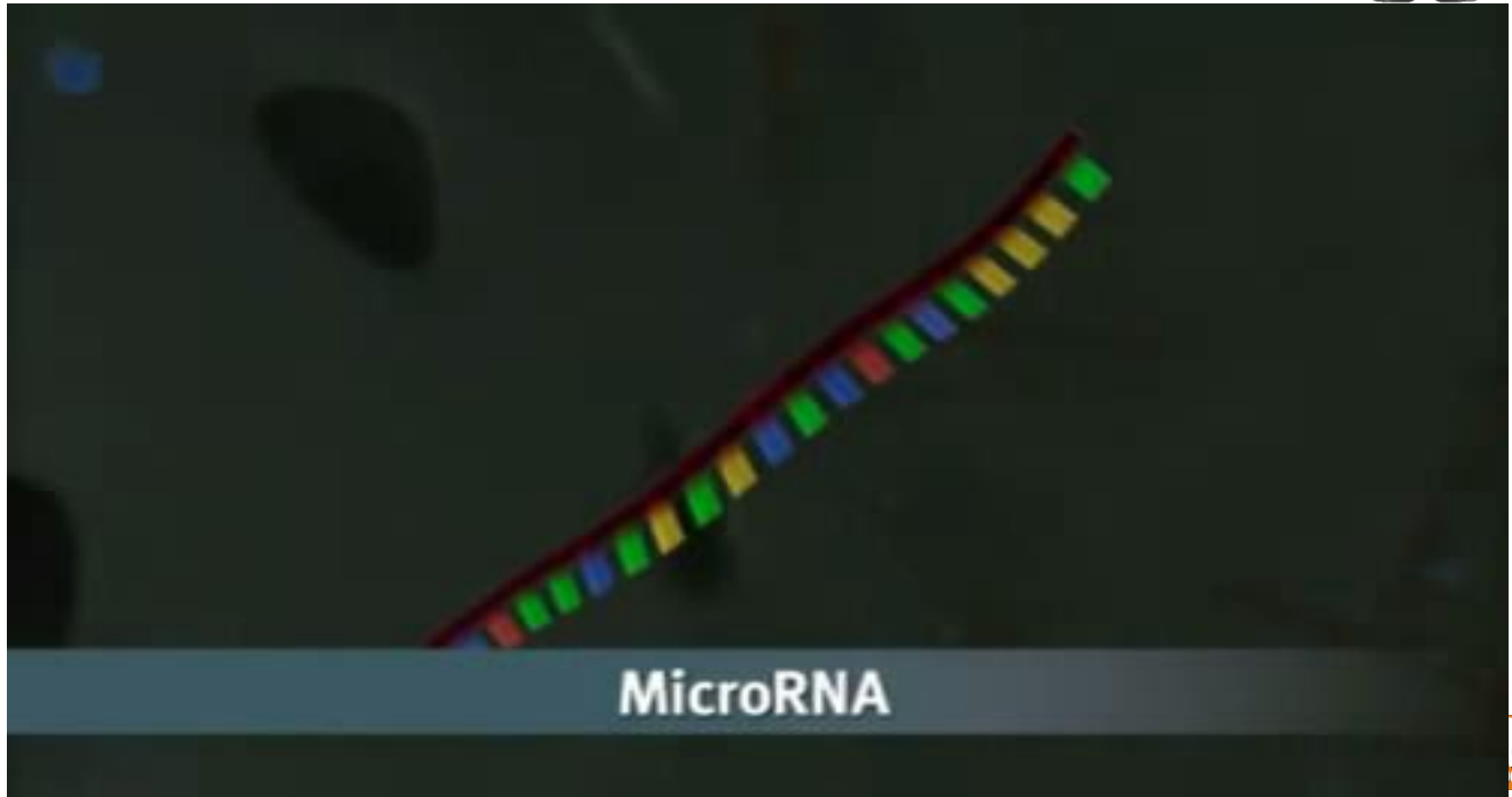


# Introdução

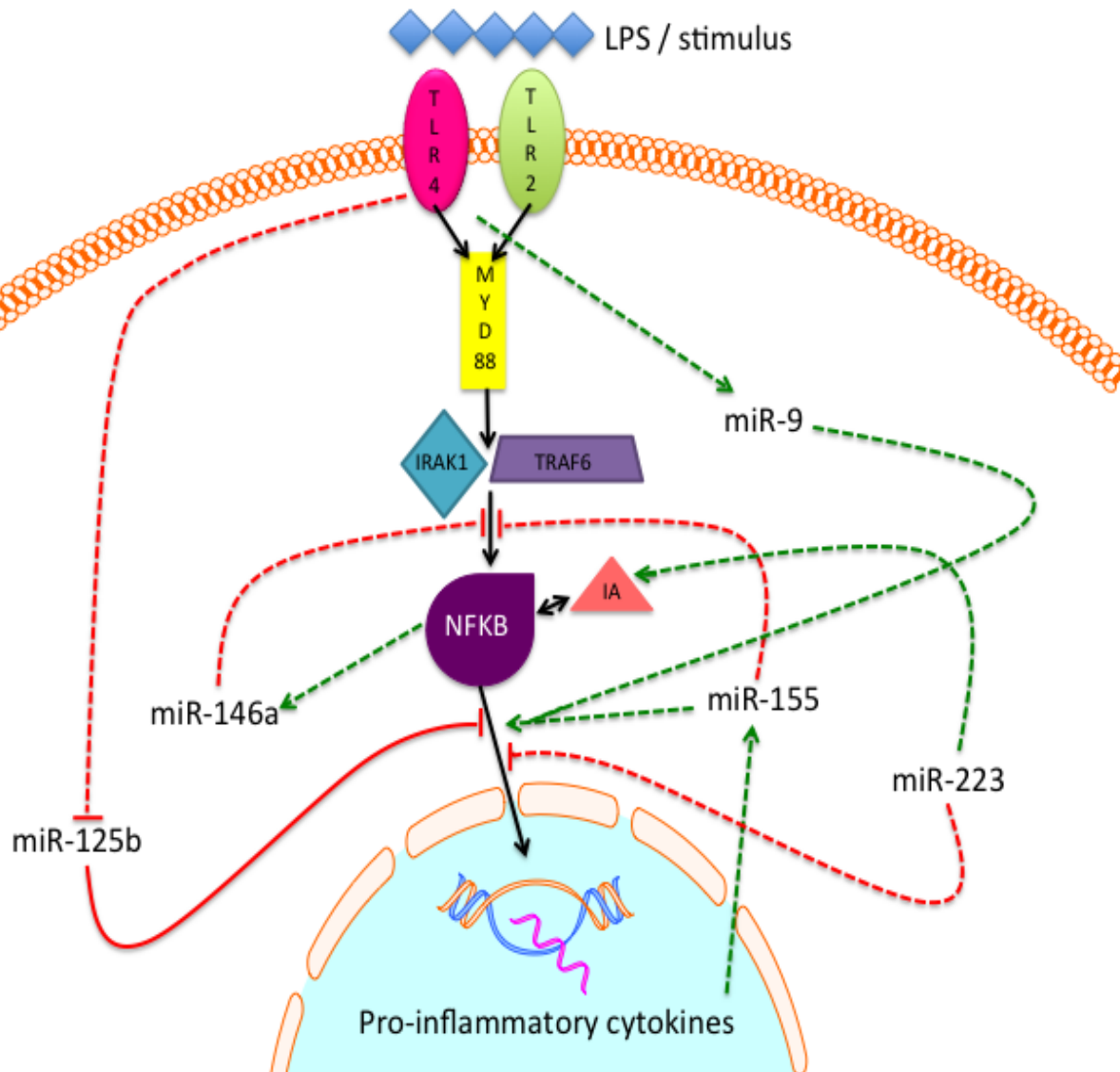
## ➤ Micro-RNA



- Pequena sequência de RNA (~ 20 nucl.)
- Ligam-se à uma região anterior ao gene alvo, regulando sua tradução.



# Introdução



➤ Fosforilações em série:  
alta exigência energética

➤ ↑ Expressão miRNA:  
aumenta repressão

➤ ↓ Expressão miRNA:  
diminui repressão





## Objetivo

Investigar os efeitos da suplementação com microminerais orgânicos durante o final da gestação no sistema imune e crescimento de neonatos bovinos.

## Hipótese

A suplementação materna com microminerais orgânicos melhora a função imune e o metabolismo de neonatos bovinos, refletido no perfil de marcadores sanguíneos sistêmicos, mRNA e microRNA em polimorfonucleados e medidas de crescimento e performance, do nascimento ao desmame.

# Escolha do artigo



J. Dairy Sci. 98:7717–7729

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9359>

© American Dairy Science Association®, 2015.

## Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress



Carolina B. Jacometo,\*† Johan S. Osorio,† Michael Socha,‡ Marcio N. Corrêa,\* Fiorenzo Piccioli-Cappelli,§ Erminio Trevisi,§ and Juan J. Loo†<sup>1</sup>

\*NUPEEC (Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Pecuária), Departamento de Clínicas Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000 Pelotas, RS, Brazil

†Mammalian NutriPhysioGenomics, Department of Animal Sciences and Division of Nutritional Sciences, University of Illinois, Urbana 61801

‡Zinpro Corporation, 10400 Viking Drive, Eden Prairie, MN 55344

§Istituto di Zootecnica, Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, 29122 Piacenza, Italy

### NOTÍCIAS

## Paper Published by UFPel PhD Student Gets International Recognition

The paper entitled *Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress*, part of Carolina Bespallhok Jacometo's doctoral thesis, was chosen the best doctoral work published in the Journal of Dairy Science in 2015.

Carolina was advised by professor Marcio Nunes Correa, from the Graduate Program in Biotechnology (UFPel), and co-advised by Professor Juan Loo, from the University of Illinois. This partnership between the American university and NUPEEC (Center for Research Education and Extension in Livestock), a research group coordinated by Professor Corrêa, has contributed to the strengthening of the research line in NutriPhysioGenomics.

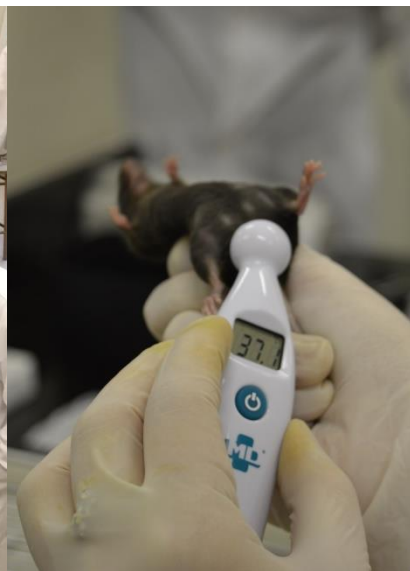
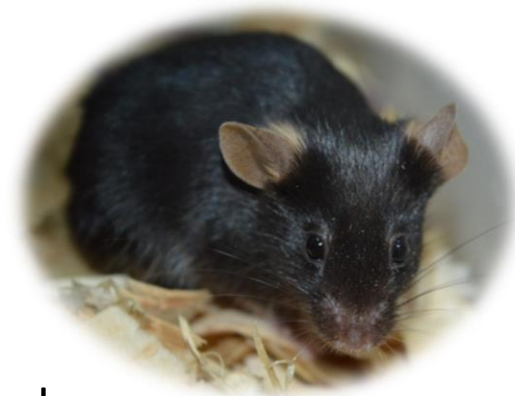




# Efeito da administração de butafosfan sobre marcadores pró-inflamatórios e da atividade de neutrófilos em camundongos desafiados com LPS

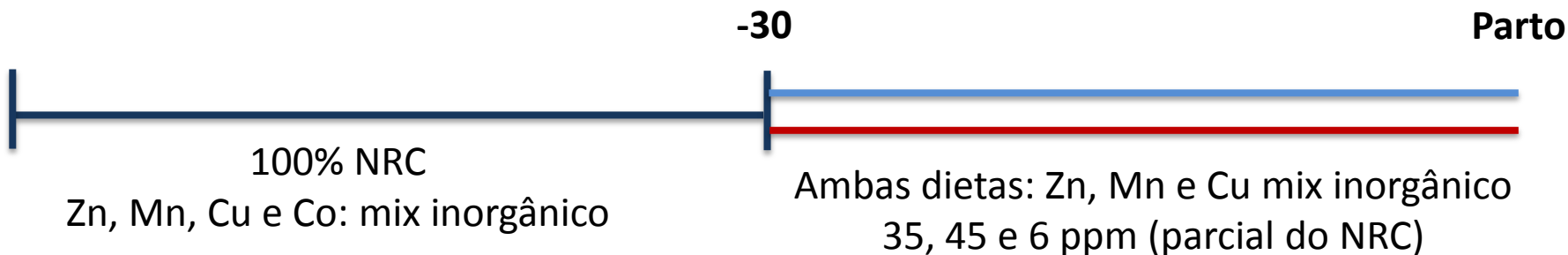


- 2 doses
- 2 injeções subcutâneas/dia por 8 dias
- Dia 8: desafio com LPS (7 animais/grupo)
- Resultados...  
Saudáveis + but: > nº de leucócitos e segmentados



# Materiais e Métodos - Artigo

- 40 vacas da raça Holandês
- Mesma dieta de lactação e período seco



+ Suplementação  
**INO (bolus)**  
**ORG (misturada à ração)**

**ORG:** 40 ppm Zn, 30 ppm Mn, 5 ppm Cu e 1 ppm Co – 4-Plex® - Zinpro Corporation  
**INO:** 40 ppm Zn, 30 ppm Mn, 5 ppm Cu e 1 ppm Co – Bolus inorgânico



# Materiais e Métodos

## Pós parto

- Até duas horas: ordenha, mensuração do volume e conteúdo de IgG do colostro e fornecimento ao terneiro

## Critérios de seleção de terneiros (8/tratamento)

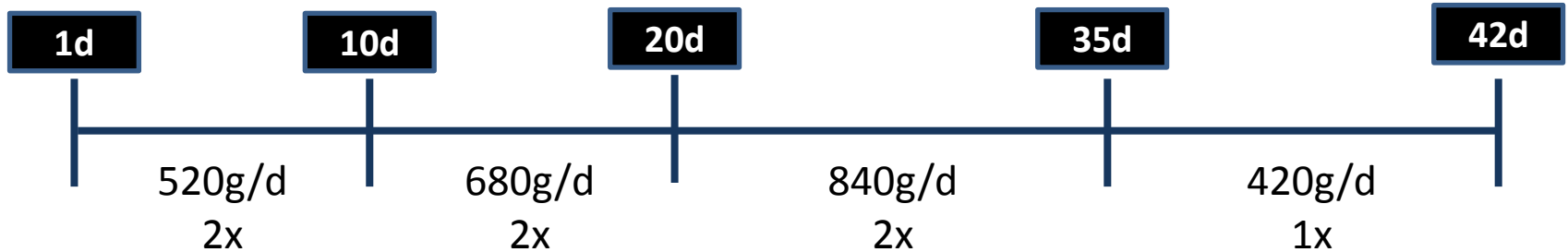


1. Não ser parto gemelar;
2. Dificuldade ao parto  $< 3$ ;
3. Colostro  $> 60$  mg/L de IgG;
4. Colostro  $> 3,8$ L de volume;
5. Peso vivo do terneiro  $> 36$  Kg.

# Materiais e Métodos

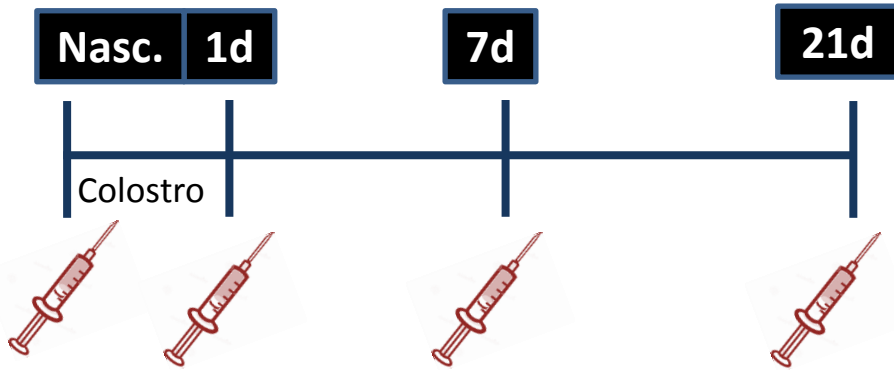
## Manejo dos terneiros

- Acesso ad libitum mix de grãos



# Materiais e Métodos

## Coleta de amostras de sangue



- **Temperatura retal registrada diariamente até 21d**
- **Registro semanal do peso e altura de cernelha**

# Materiais e Métodos

## Metabólitos sanguíneos avaliados

### PFA, função e integridade hepática

- Bilirubina
- GGT
- GOT
- Colesterol
- Albumina
- Ceruloplasmina
- Paraoxonase
- Haptoglobina
- Amiloide sérica A
- IL-6

### Metabolismo energético

- Glicose
- NEFA
- BHBA

### Estresse oxidativo

- NOx (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)
- FRAP – poder antioxidante da redução de Fe sérico
- ROM – metabólitos reativos de O<sub>2</sub>
- MPO - Mieloperoxidase
- ORAC - Capacidade de absorvência de radicais O<sub>2</sub>
- Retinol
- Tocoferol

### Metabolismo muscular

- Ureia
- Creatinina

### Status mineral

- Cu
- Mn
- Fe
- Zn





# Materiais e Métodos

## Metabólitos sanguíneos avaliados

### Metabolismo energético

- Glicose

### Estresse oxidativo

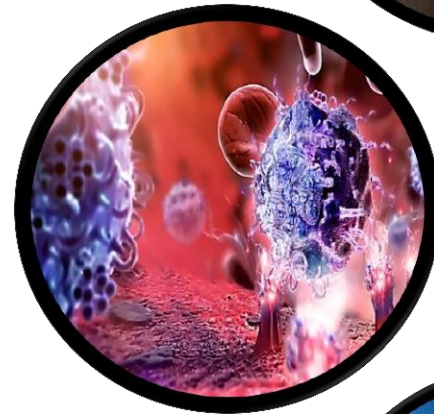
- FRAP – poder antioxidante da redução de Fe sérico
- ROM – metabólitos reativos de O<sub>2</sub>
- MPO - Mieloperoxidase

## Análises moleculares

- Isolamento de neutrófilos do sangue

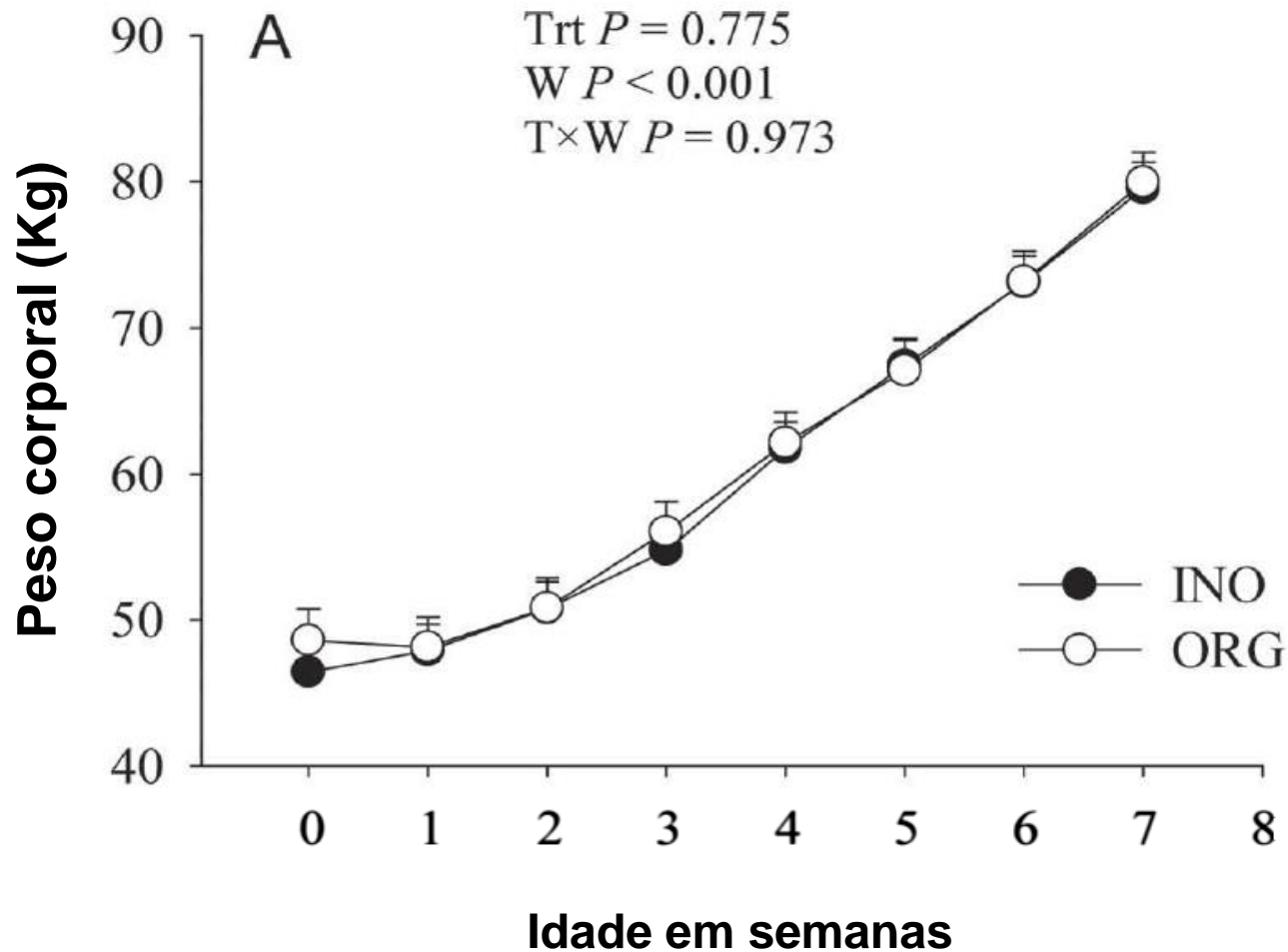
### Genes avaliados

- Rota pro-inflamatória mediada por *toll-like* receptors;
- Adesão celular
- Metabolismo oxidativo



# Resultados e discussão

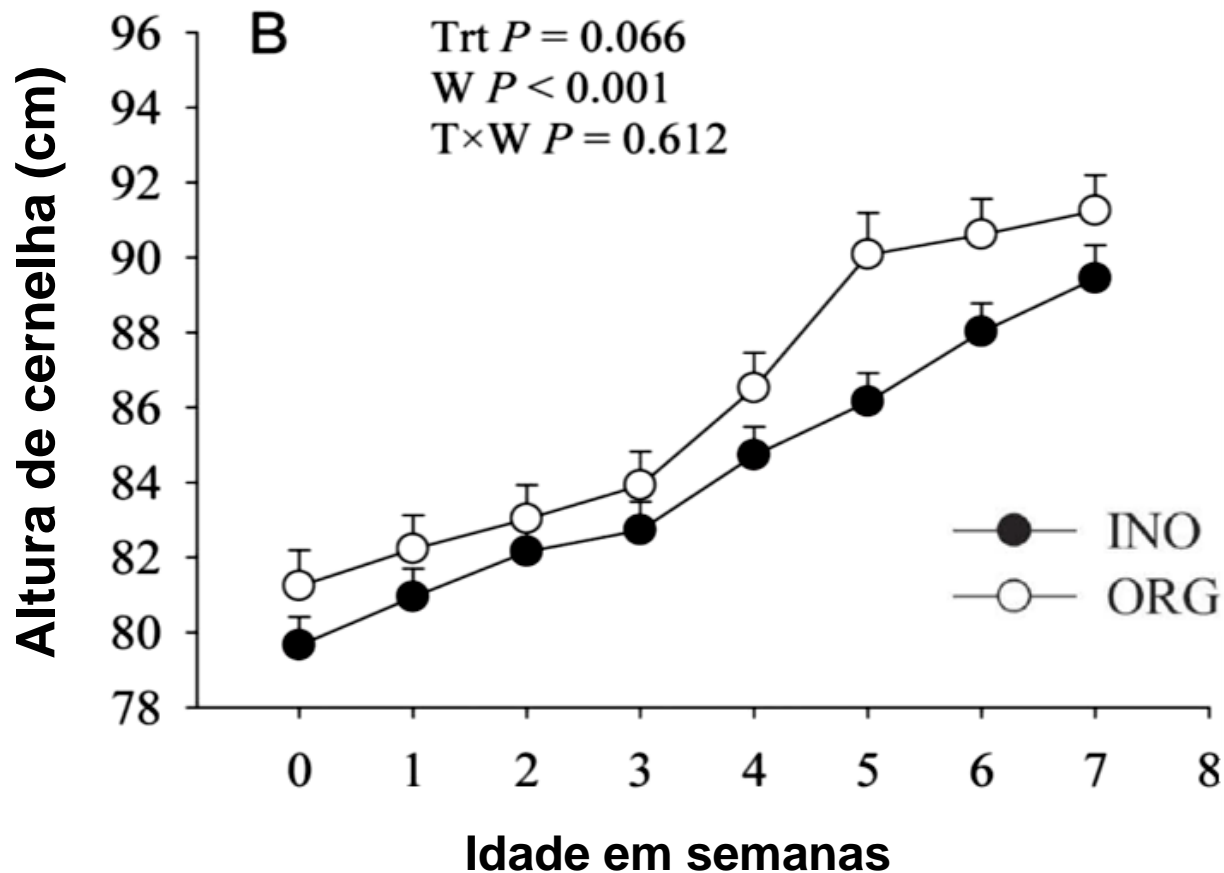
A suplementação com ORG não afetou o peso ao nascimento/durante o experimento



Mas...

# Resultados e discussão

...a altura da cernelha apresentou tendência em ser maior em bezerros ORG



# Resultados e discussão

## Suplementação ORG em frangos de corte

- Fortalecimento do crescimento ósseo

*Bao et al., 2010* – Zn ↑ consumo, ganho de peso e compr. tíbia

*Rao et al., 2013* – Mix: ↑ eficiência alimentar



## Mesmo mecanismo em terneiros?



- Manganês

*Tomlinson et al., 2004*: cofator de enzimas que sintetizam cadeias laterais de sulfato condroitina de proteoglicano

- ✓ Componente estrutural de cartilagem
- ✓ Rigidez à matriz
- ✓ Resistência à compressão

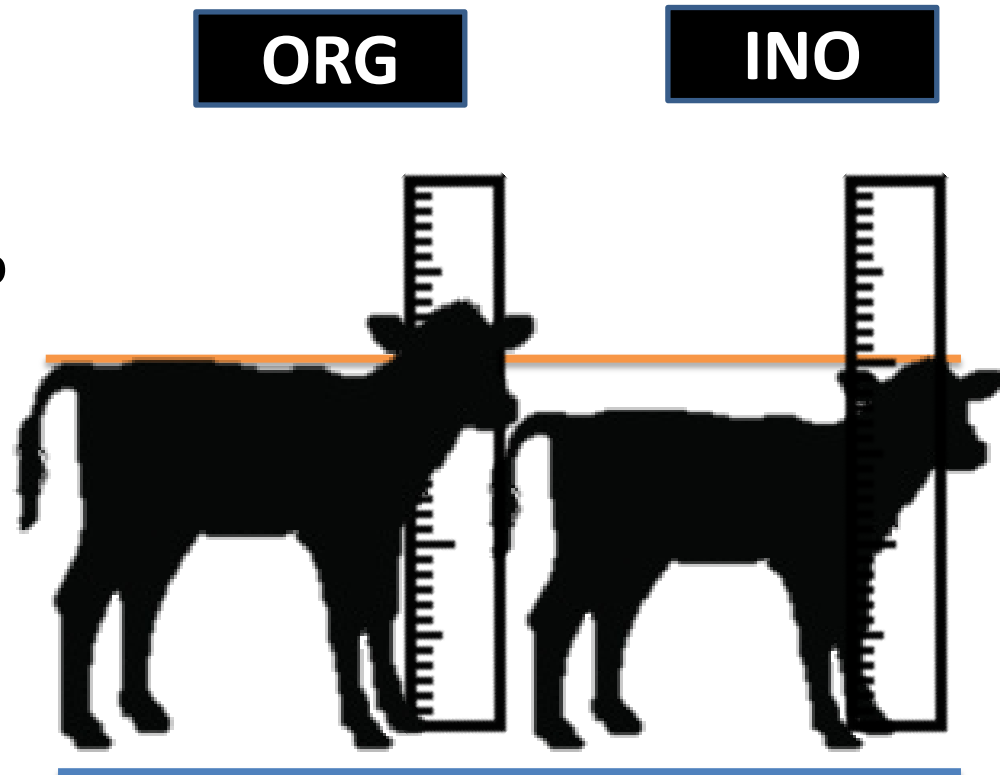


# Resultados e discussão

## Bezerros INO

- **↑ 0,5°C**  
Tendência em INO , fisiológico
- **TNF maior ao longo do tempo**
- **↑ NFKB1**

**Resposta inflamatória  
transitória**



- **↑ Glicose INO**

↑ Necessidade de energia para o sistema imune, ↑ glicose disponível na cor. sanguínea  
Prejuízo do crescimento ósseo normal

# Resultados e discussão

## Marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes sanguíneos de bezerros

| Metabólito                                     | Trat | Dias de idade |      |      |      | Valor de P |
|--|------|---------------|------|------|------|------------|
|  |      | 0             | 1    | 7    | 21   |            |
| Mieloperoxidase -<br>MPO U/L                   | ORG  | ND            | 4,62 | 5,04 | 5,86 | 0,003      |
|  | INO  | ND            | 5,38 | 5,83 | 6,28 |            |
| ROM mg<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /100mL | ORG  | ND            | 0,09 | 2,08 | 2,22 | < 0,001    |
|  | INO  | ND            | 0,40 | 2,57 | 2,40 |            |
| FRAP µmol/L                                    | ORG  | 256           | 198  | 165  | 165  | < 0,001    |
|  | INO  | 293           | 220  | 218  | 213  |            |

MPO: enzima ação microbicida – ROM: metabólitos reativos de O<sub>2</sub> – FRAP: poder antioxidante da redução do ferro sérico (férrico p/ ferroso)

Ativação da resposta ao estresse oxidativo

ORG ↓: MPO, FRAP e tend. ROM → efeito positivo da suplementação com ORG

# Resultados e discussão

## Expressão de mRNAs

### Rota dos TLR

↑ TLR2 em bezerros ORG

↓ IRAK1

↓ NFKB1

↓ NFKB2

↓ MYD88 (tend)

↓ IL1B (tend)

### Citocinas

TNF não alterou

Suplementação materna com ORG:  
sistema imune mais eficiente!!!



Bezerros mantiverem uma alta expressão de TLR sem a necessidade de “upregular” a expressão de genes sinalizadores pro-inflamatórios

# Resultados e discussão

## Expressão de miRNA e relações com a via dos TLRs

miRNA 146a

miRNA 9

miRNA 223

miRNA 155

miRNA 125b

**↑ miRNA 155 em INO**

**Expressão fortemente induzida TLR ativado por patóg. e citocinas pro-inflamatórias (TNF)**

- Maior expressão do miRNA: Maior repressão do TNF
  - TNF ↑ em INO???
- Indução de miRNA 155 por LPS fortalece a transcrição de TNF
- Fortalecer a síntese de mRNA: contrabalanço do efeito inibitório :  
Produz mais mRNA pois vai ter uma maior repressão da tradução



# Resultados e discussão

## Expressão de miRNA e relações com a via dos TLRs

↑ miRNA 125 ORG  
↓ miRNA 125 em INO

Alvo molecular: TNF

miRNA 125 bloqueia a tradução de TNF

- TNF: em ORG não alterou, em INO aumentou  
Há algum outro mecanismo atuando

miRNA 146 não alterou

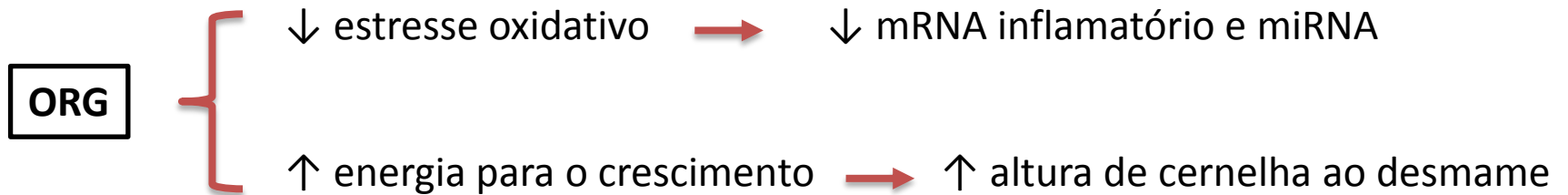
Alvos moleculares: IRAK1 e TRAF6

- IRAK1 e TRAF6: expressão diminuída em ORG
- miRNA 146 é necessário para prevenir a inflamação



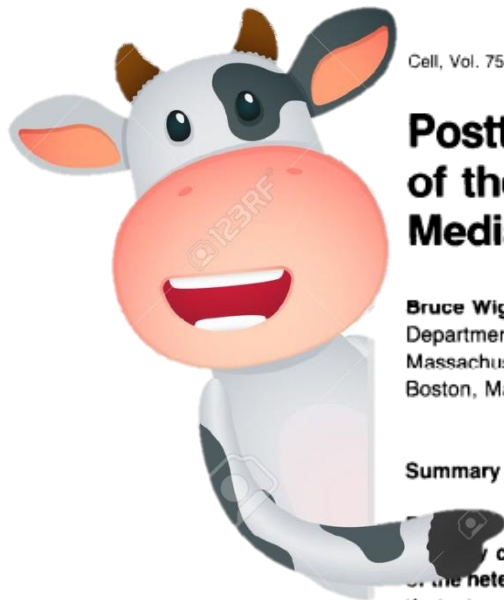
## Conclusões

A suplementação de vacas gestantes com ORG no final da gestação pode influenciar o crescimento e a resposta imune dos bezerros.



# Impactos

- 1º estudo em bovinos demonstrando a expressão de miRNAs em neutrófilos no período neonatal, bem como a dieta materna suplementada com minerais orgânicos influenciando o crescimento e resposta imune dos bezerros



Cell, Vol. 75, 855–862, December 8, 1993 Copyright © 1993 by Cell Press

## Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*

Bruce Wightman,<sup>††</sup> Ilho Ha,<sup>\*</sup> and Gary Ruvkun  
Department of Molecular Biology  
Massachusetts General Hospital  
Boston, Massachusetts 02114

### Summary

*C. elegans* development, the temporal pattern of cell lineages is specified by graded activity of the heterochronic gene *Lin-14*. Here we demonstrate that a temporal gradient in *lin-14* protein is associated

with stage-specific cell lineage patterns. *lin-14* site phenotypes (Ambros and Horvitz, 1987). *lin-14(lf)* alleles cause larvae stage 2 (L2) patterns of cell lineage in a variety of tissues to be executed precociously during the L1 stage (Ambros and Horvitz, 1987). Two *lin-14(gf)* alleles cause the opposite transformation in temporal cell fate, reiterations of early cell fates at later stages. For instance, at the L2 stage, *lin-14(gf)* mutants repeat patterns of cell lineage appropriate for the L1 stage (Ambros and Horvitz, 1984).

*lin-14* controls these stage-specific cell lineages by generating a temporal gradient of Lin-14 nuclear protein (Lin-14<sup>n</sup>). *lin-14* mutants are distinguished by their altered



Obrigada pela atenção!