

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ÚBERE
EXTRACORPÓREO DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-
ZEBU INFECTADO POR *Streptococcus agalactiae***

**Ana Paula Sbardella
Médica Veterinária**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ÚBERE
EXTRACORPÓREO DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-
ZEBU INFECTADO POR *Streptococcus agalactiae***

Ana Paula Sbardella

Orientador: Prof. Dr. Danísio Prado Munari

Coorientador: Dr. Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

2016

Sbardella, Ana Paula
S276e Expressão gênica diferencial em úbere extracorpóreo de vacas mestiças Holandês-Zebu infectado por *Streptococcus agalactiae* / Ana Paula Sbardella. -- Jaboticabal, 2016
vi, 67 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Danisio Prado Munari
Banca examinadora: Marta Fonseca Martins, Daniel Guariz Pinheiro
Bibliografia

1. Bovinos de leite. 2. Expressão diferencial. 3. Mastite. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.291

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ÚBERE EXTRACORPÓREO DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU INFECTADO POR *Streptococcus agalactiae*

AUTORA: ANA PAULA SBARDELLA

ORIENTADOR: DANISIO PRADO MUNARI

CO-ORIENTADOR: MARCOS VINÍCIUS GUALBERTO BARBOSA DA SILVA

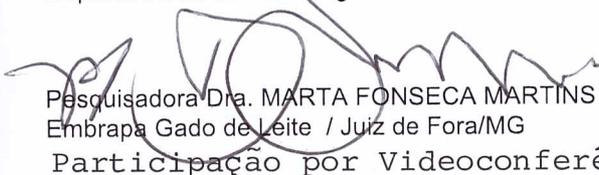
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANISIO PRADO MUNARI
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. MARTA FONSECA MARTINS
Embrapa Gado de Leite / Juiz de Fora/MG
Participação por Videoconferência

Jaboticabal, 29 de julho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Paula Sbardella, filha de Vilmar Antonio Sbardella e de Elisete Maria Dal' Pizzol Sbardella, nasceu em 16 de janeiro do ano de 1989, na cidade de Concórdia, estado de Santa Catarina, onde viveu até o ano de 2009, quando ingressou na faculdade. Obteve o título de Médica Veterinária, pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, na cidade de Palotina – PR, onde concluiu o curso em 2009 a 2014. Desde então, é mestranda do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal/SP, com previsão para término em julho de 2016.

Com amor, dedico aos meus pais Elisete e
Vilmar Sbardella e ao meu irmão Maicon
Sbardella.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus pais Elisete Maria Dal Pizzol Sbardella e Vilmar Antonio Sbardella, pessoas de bem e de uma honestidade incomparável, que não medem esforços para realizarem os sonhos de seus filhos, que se tornaram seus próprios sonhos. Que lutaram e tiveram sabedoria para construir uma família linda, unida e cheia de amor. Perdoem a minha ausência. Obrigada pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado, saibam que eu vou estar sempre ao lado de vocês. Amo vocês.

Ao meu irmão, Dr. Maicon Sbardella, pelo afeto e cuidado tão grande que tem por mim, mesmo eu não merecendo. Repito: Obrigada por ser meu irmão, meu amigo, confidente, conselheiro e muitas vezes terapeuta. Sinto um orgulho imenso do homem e do profissional que és. Se um dia eu for 1% da pessoa que tu és, me sentirei satisfeita. Te amo.

Ao meu Eduardinho, que mesmo tão pequenino enche meu coração de amor, o que me faz uma pessoa melhor.

Ao Lucas, pelo companheirismo e pelo sucesso da nossa sociedade.

A todos meus familiares que sempre me apoiaram nessa caminhada.

Ao meu orientador, Dr. Danísio Prado Munari, por ter me guiado durante esses dois anos.

Ao meu co-orientador Dr. Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva e demais pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, envolvidos neste trabalho.

A todos meus colegas e amigos do EAGMA, pela colaboração na realização das análises e principalmente pelos momentos de descontração durante o café.

A todos os professores e funcionários da UNESP/FCAV.

A FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS	iii
LISTAS DE FIGURAS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Mastite	3
2.2 Modelo de úbere extracorpóreo de vacas.....	4
2.3 Tecnologias para estudo de transcritos	4
2.4 Estudo de transcritos em diferentes espécies e tecidos	5
2.5 RNA-seq	7
2.6 RNA-seq em diferentes espécies e tecidos	8
2.7 Sequenciamento de RNA e métodos computacionais para análise da expressão gênica diferencial.....	9
3. Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO 2 - Expressão gênica diferencial em úbere extracorpóreo de vacas leiteiras mestiças Holandês-Zebu, infectado experimentalmente por <i>Streptococcus agalactiae</i> analisada por diferentes métodos computacionais	19
1. Introdução	19
2. Material e Métodos.....	21
2.1 Delineamento experimental	21
2.2 Isolamento e manutenção da glândula mamária	21
2.3 Inoculação com o patógeno <i>S. agalactiae</i>	22
2.4 Colheita de tecido mamário	22
2.5 Extração do RNA.....	23

2.6	Sequenciamento de RNA	23
2.7	Controle de qualidade e alinhamento	24
2.8	Análises estatísticas	25
2.8.1	Método edgeR.....	25
2.8.2	Método baySeq.....	26
2.8.3	Método Cuffdiff	27
2.9	Análise da ontologia gênica e identificação de vias metabólicas para o total de genes identificados e aqueles comuns aos três métodos computacionais.....	28
3.	Resultados e Discussão.....	28
4.	Conclusão	48
5.	Referências Bibliográficas.....	49
APÊNDICES.....		61
Apêndice A – Qualidade de sequência por base.		62
Apendice B – KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways		66

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Número e porcentagem de “reads” mapeadas por biblioteca (“Left”, “Right” and “aligned pairs”).....	29
Tabela 2 - Número de genes diferencialmente expressos para os contrastes nos métodos computacionais estudados.	31
Tabela 3 - Anotação gênica funcional (Processo biológico, Componente celular ou Função molecular) e enriquecimento de termos do Gene Ontology (GO) dos genes diferencialmente expressos no tecido da glândula mamária na presença e ausência de infecção pelo patógeno <i>S. agalactiae</i>	36
Tabela 4 - Principais KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) vias biológicas.	42

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 – Dispersão das amostras obtida por análise multivariada de escalonamento multidimensional. Identificação da amostra: G7 à G10 (número da amostra); T0 e T3 (tempo após a perfusão do tecido); Azul e Vermelha (Quarto do úbere controle e inoculado, respectivamente).30
- Figura 2 - Intersecção entre as quantidades de genes diferencialmente expressos reportados pelos três métodos computacionais (EdgeR, baySeq e Cuffdiff) por Diagrama de Venn.33

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ÚBERE EXTRACORPÓREO DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS-ZEBU INFECTADO POR *Streptococcus agalactiae*

RESUMO – A mastite é responsável por grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira e necessita de maior compreensão de suas bases genéticas para que métodos de melhoramento genético possam ser desenvolvidos. Neste sentido, estudos de expressão gênica têm sido empregados. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: 1. Detectar, por meio de três métodos computacionais distintos, a expressão gênica diferencial de dados obtidos por sequenciamento de RNA extraído de glândula mamária mantida em um sistema extracorpóreo de bovinos de leite mestiços Holandês-Zebu e infectada experimentalmente com *Streptococcus agalactiae*; 2. Estudar o perfil de expressão do total de genes identificados e aqueles comuns aos três métodos relacionados ao desenvolvimento da mastite, a fim de contribuir para melhor entendimento de processos biológicos, de componente celular e função molecular e vias biológicas envolvidas com a expressão desta característica. Quatro vacas foram abatidas e os úberes foram colhidos, perfundidos e inoculados com *S. agalactiae*. Para cada úbere, dois quartos foram inoculados (anterior esquerdo - AE; e posterior esquerdo - PE) e dois quartos foram utilizados como controle (anterior direito - AD; e posterior direito - PD). Biópsias foram feitas do tecido alveolar nos tempos 0 e 3 horas após a perfusão do tecido. O RNA das amostras foi extraído e sequenciado com a plataforma HiSeq2000 (Illumina). A partir das leituras obtidas os transcritos foram montados utilizando como referência a anotação do genoma bovino UMD 3.1 e então foram avaliadas quanto à sua expressão diferencial e funcionalidade. Métodos que assumem distribuição binomial negativa executados pelos métodos computacionais edgeR e baySeq e o método que assume distribuição beta binomial negativa executado pelo Cuffdiff, foram utilizados para análise de expressão gênica diferencial. Foram identificados 5.158 genes provenientes da união dos resultados obtidos com os três métodos computacionais. Esses genes foram investigados pela plataforma DAVID revelando o enriquecimento de termos de ontologia gênica, dentre os quais destacaram-se os processos de resposta a estímulos, sistema imune e processos apoptóticos. O perfil de genes diferencialmente expressos em amostras afetadas foi associado com a diferenciação, proliferação, migração e apoptose celular, desempenhando importante papel no local da inflamação por células do sistema imune, além de ativar vias de sinalização relacionadas ao sistema imune que são importantes nas primeiras três horas de infecção. Foram identificados apenas 122 genes com expressão diferencial em comum pelos três métodos utilizados. A restrição causada pelo uso da intersecção dos resultados obtidos com os três métodos não se mostrou adequada para realizar o enriquecimento funcional pois muitos genes de interesse foram desconsiderados e perdeu-se suporte estatístico nas análises de enriquecimento funcional. Assim, sugerimos que para esse tipo de estudo é mais adequado a utilização dos resultados de um dos métodos ou a união dos resultados dos três métodos. Este estudo permitiu maior entendimento das bases genéticas do desenvolvimento da mastite em úbere extracorpóreo de bovinos leiteiros mestiços holandês-Zebu, infectado experimentalmente por *S. agalactiae*, durante as primeiras horas de infecção.

Palavras chave: bovinos de leite, expressão diferencial, mastite

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN MAMMARY TISSUE EXTRACORPÓREO OF HOLANDÊS-ZEBU COWS INFECTED BY *Streptococcus agalactiae*

ABSTRACT - Mastitis is responsible for huge economic losses in dairy cattle production which requires a better understanding of its genetic bases in order that genetic breeding methods could be developed. Therefore, some gene expression studies have been developed. The aims of this study were: 1. To detect, through three different computational methods, the differential gene expression data obtained by RNA sequencing from mammary glands of Holstein-Zebu crossbred dairy cattle, kept in an extracorporeal system and experimentally infected with *Streptococcus agalactiae*; 2. To study the total gene expression profile and those genes common to the three methods, related with mastitis, in order to contribute to a better understanding of biological processes, cellular components, molecular functions and metabolic pathways related with the expression of this trait. Four cows were slaughtered and its udders were perfused and inoculated with *S. agalactiae*. For each udder, 2/4 were inoculated (front left - AE, and rear left - PE) and 2/4 were used as control (front right - AD, and rear right - PD). Biopsies were obtained from the alveolar tissue at 0 and 3 hours after the tissue perfusion. The RNA sample was extracted and sequenced with HiSeq 2000 platform (Illumina). From the reads obtained transcripts were assembled using as the reference the bovine genome annotation UMD 3.1, and then were evaluated for differential expression and functionality. Methods that assumes negative binomial distribution performed by edgeR and baySeq and the method that assumes beta negative binomial distribution performed by Cuffdiff were used for differential gene expression analysis. From the union of the results obtained with all computational methods, a total of 5,158 genes were identified. These genes were investigated by DAVID platform showing the enrichment of gene ontology terms, which were highlighted the response processes stimuli, immune response and apoptotic processes. The profile of differentially expressed genes identified in the affected samples was associated with differentiation, proliferation, migration and apoptosis, playing a major role in the inflammation site by immune system cells and in the activation of signaling pathways related to the immune system, which are important in the early three hours of infection. Only 122 differentially expressed genes were identified in common by the three methods. The restriction caused by the use of the intersection of the results obtained with the three methods was not interesting to perform functional enrichment analysis because there is loss of many interesting genes and the functional enrichment analysis has no statistical support. Thus, for this kind of study, we suggest that could be most appropriate the use of the results obtained with one method or the union of the results obtained with more than one method. This study allowed a better understanding of the genetic basis of mastitis developing in extracorporeal udder of Holstein-Zebu crossbred dairy cattle, during the early hours of experimentally infection by *S. agalactiae*.

Keywords: dairy cattle, differential expression, mastitis

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por microrganismos patogênicos que é responsável por importantes perdas econômicas na bovinocultura leiteira (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). A glândula mamária concentra as vias biológicas relacionadas ao desenvolvimento e ocorrência da mastite e a resposta imunológica do hospedeiro (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ et al., 2009). Assim, a investigação de genes transcritos nesse tecido que codificam componentes de diversas vias biológicas e processos celulares pode prover maior entendimento dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento dessa enfermidade e a influência da mesma em diversos processos fisiológicos importantes para a produção animal. A associação do padrão de expressão gênica com determinados fenótipos, como a presença e a ausência de doenças, é uma importante ferramenta para a geração de estratégias de manejo e de seleção que priorizem a utilização de animais mais resistentes à mastite.

A investigação da expressão gênica, não só relacionada à mastite, mas de forma abrangente, é possível com o uso da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq), uma vez que a mesma viabiliza a análise de todo o conjunto de transcritos de um tecido (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Vários métodos computacionais estão disponíveis para análise de expressão diferencial dos genes envolvidos (ROBINSON et al., 2010; HARDCASTLE; KELLY, 2010), sendo que estes apresentam grandes diferenças e nenhuma metodologia isoladamente é ótima para todos os delineamentos experimentais (SEYEDNASROLLAH et al., 2013). Sendo assim, a análise por mais de um método é importante para confirmação da expressão gênica diferencial, podendo indicar genes candidatos para análises de PCR em tempo real, para validação dos mesmos.

Um dos patógenos causadores da mastite é o *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria gram-positiva que é contagiosa dentro do rebanho (NEAVE et al., 1969) e resulta em perdas na qualidade e quantidade de leite produzido (KEEFE, 1997). Em adição, há evidências que muitos genes relacionados à resposta imune são

diferencialmente expressos, obtidos pela técnica de microarranjo nas primeiras horas após a inoculação de *S. agalactiae* em animais da raça Gir Leiteiro (FONSECA et al., 2015). Tal fato despertou o interesse de investigar o padrão de expressão gênica em animais mestiços Holandês-Zebu, por serem animais mais adaptados e de alta produção leiteira (FILHO, 2015), além de muito utilizados no Brasil.

Assim, este trabalho teve como objetivos detectar, por meio de três métodos computacionais distintos, a expressão gênica diferencial de dados de contagem, obtidos por RNA-seq, de glândula mamária de animais mestiços Holandês-Zebu mantida em um sistema extracorpóreo e infectada com *S. agalactiae*; e estudar o perfil de expressão do total de genes identificados e aqueles comuns aos três métodos relacionados ao desenvolvimento da mastite, a fim de contribuir para melhor entendimento de processos celulares e vias biológicas envolvidas com o desenvolvimento da doença.

2. Revisão de Literatura

A produção leiteira é uma atividade de suma importância para o agronegócio brasileiro, sendo responsável pela disponibilidade de um produto de alto valor nutricional para população. O Brasil possui o quarto maior rebanho leiteiro quando comparada com os demais países produtores de leite, mas sua produção total de leite ocupa a oitava posição (USDA, 2015). Conhecendo-se a grande demanda pelo produto e a premência de um alimento de qualidade é necessário buscar alternativas que visem o aumento da produção leiteira concomitantemente à melhora de sua qualidade.

Na busca por animais mais adaptados e de maior produtividade, constatou-se o cruzamento de animais da raça Gir (*Bos taurus indicus*), por sua rusticidade, com animais da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), que apresentam alta produção de leite, é indicado para obtenção de animais adaptados e com alta capacidade de produção de leite a pasto (FILHO, 2015). Além disso, animais provenientes deste cruzamento apresentam melhor desempenho quanto à precocidade, fertilidade e longevidade em comparação com outros mestiços (Associação Brasileira da Raça Girolando, 2016). Animais mestiços Holandês-Zebu, tem relevante importância na

produção leiteira brasileira, uma vez que grande parte do rebanho leiteiro no país é composto por animais mestiços.

A eficiência produtiva, a qual é almejada pelo melhoramento genético, é resultante não só do potencial genético do animal, mas também das condições ambientais-sanitárias e nutricionais nas quais os animais estão submetidos. A produção leiteira enfrenta vários problemas de origem sanitária, dos quais, doenças infectocontagiosas como a mastite causam grande impacto para a produção leiteira.

2.1 Mastite

A inflamação da glândula mamária é classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica apresenta edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, com alterações no leite, como a presença de grumos e pus. Quando a mastite se apresenta na forma subclínica não são observadas alterações macroscópicas, somente alterações na composição do leite (RIBEIRO et al., 2003). As causas podem ser por mudanças metabólicas e fisiológicas, trauma ou presença de microrganismos patogênicos (OVIDO-BOYSO et al., 2007), podendo ser classificada como causa contagiosa e ambiental.

Agentes infecciosos, incluindo cocos gram-positivos, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, bastonetes gram-negativos, *Corynebacterium*, *Mycoplasma* e leveduras são relatados como agentes causadores da mastite (RIET-CORREA et al., 2001). O *S. agalactiae* está associado a mastite subclínica, sendo transmitido dentro do rebanho (NEAVE et al., 1969) e causa substancial impacto na qualidade e quantidade do leite produzido (KEEFE, 1997). Tal patógeno é aeróbio (anaeróbio facultativo), imóvel e não forma esporos. A inflamação causada por *S. agalactiae* ocorre principalmente por contato com as mãos do ordenhador e teteiras contaminadas, causando mastite crônica. O influxo de células inflamatórias caracteriza-se pelo envolvimento inicial de neutrófilos, seguido principalmente de macrófagos. Na fase final, fibroblastos predominam causando fibrose e levando a involução da glândula. A identificação de *S. agalactiae* é feita por meio de análise microbiológica, com base na aparência das colônias, nas suas características hemolíticas e na produção de esculina (RIET-CORREA et al., 2001).

2.2 Modelo de úbere extracorpóreo de vacas

Para realização de estudos, tanto para análise de transcriptoma, quanto para outros experimentos, há uma importante preocupação com o bem-estar animal, uma vez que animais sadios precisam ser infectados com um patógeno para as colheitas de material. Alternativas que utilizem menos animais para pesquisa devem ser levadas em consideração, pois do ponto de vista do bem-estar animal, é injustificável causar uma infecção em um animal saudável para realizar estudos sem levar em consideração o seu bem-estar.

Um sistema viável de manutenção da glândula mamária extracorpórea, após o abate de animais de descarte, possibilita uma variedade de estudos, bem como a avaliação da expressão gênica em larga escala, relacionados a doenças mamárias, como a mastite, que só seriam possíveis infectando animais saudáveis. Com a utilização do modelo *ex sito* de úbere extracorpóreo de vacas é possível estudar a penetração dérmica, metabolismo, absorção de diferentes drogas e viabilidade tecidual (KIETZMANN et al., 1993), bem como a distribuição de antibióticos no tecido perfundido isolado (EHINGER; KIETZMANN 2000a, b). Em útero bovino, o modelo de perfusão extracorpórea também é utilizado para estudos *in vitro* de reações inflamatórias (BÄUMER et al., 2002). No entanto o modelo extracorpóreo pode ser limitado para alguns estudos, uma vez que a manutenção do sistema visa manter apenas a homeostase hidroeletrolítica do animal não possuindo aporte celular nas veias e artérias canuladas que mimetizem o animal “in vivo”.

2.3 Tecnologias para estudo de transcritos

O melhoramento genético com base na seleção de fenótipos e em estimativas de valores genéticos é muito utilizado. No entanto, com a chegada de novas tecnologias, as quais permitem conhecimento ao nível molecular dos indivíduos, tornou-se possível o melhor entendimento sobre o genoma dos animais, permitindo aplicar novas metodologias estatísticas para o aumento da acurácia da seleção.

Por meio de técnicas de detecção e análise de mRNA (RNA mensageiro), é possível associar a expressão gênica em diferentes estágios de desenvolvimento fisiológico (PEREIRA, 2012) resultante do processo de transcrição. O mRNA,

intermediário entre DNA e proteína, codifica a informação necessária para a formação da proteína (GRIFFITHS et al., 2013).

O conjunto de todos os possíveis RNAs transcritos de um tecido em termos de tipo e quantidade é denominado transcriptoma (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010). A partir do transcriptoma é possível conhecer parcialmente os constituintes do genoma e entender seus elementos funcionais, bem como compreender os mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças em determinado tecido. Análises a partir do transcriptoma permitem registrar todas as formas de transcritos, possibilitando a determinação da estrutura transcricional dos genes e quantificar as mudanças nos níveis de expressão em determinado estágio de desenvolvimento ou durante diferentes condições fisiológicas (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Tecnologias baseadas em hibridização, como por exemplo os microarranjos, são utilizadas para análise de transcriptoma. No entanto, essa técnica apresenta limitações, como a necessidade de conhecimento prévio da sequência gênica presente nos microarranjos, a hibridização cruzada entre transcritos e sequências-alvo e a restrita sensibilidade para transcritos poucos frequentes (COUTINHO; ROSÁRIO, 2010).

2.4 Estudo de transcritos em diferentes espécies e tecidos

Para evitar perdas causadas pela ocorrência da mastite, devem ser tomadas medidas sanitárias para o controle da infecção, bem como visar a seleção de animais resistentes. Estudos de análise do transcriptoma do tecido mamário permitem a caracterização da expressão gênica por meio da identificação de genes e suas variáveis transcritas capazes de conferir resistência a mastite.

Gilbert et al. (2013) verificaram o aparecimento diferencial da resposta inflamatória inata com recrutamento de leucócitos para a glândula mamária em amostras de células mamárias epiteliais bovinas estimuladas por *E.coli* e *S. aureus*, por meio de microarranjos. Células epiteliais mamárias bovinas, estimuladas pela presença de bactéria e avaliadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), liberam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas mobilizando neutrófilos, sugerindo que essas células contribuam para resposta imune e

inflamatória na glândula mamária. A determinação das características clínicas e de resolução da mastite podem ser obtidas pela resposta das células mamárias epiteliais de acordo com estirpes de *S. aureus* e bactérias gram-positivas (LAHOUASSA et al., 2007).

Em uma linhagem de células epiteliais mamárias de bovinos (MAC-T), avaliadas por qRT-PCR, foi possível detectar a quantidade de transcritos e inferir uma menor abundância de proteínas de defesa de *E. coli* e *S. aureus* em soro de leite com mastite. A bactéria *E. coli* é mais potente do que *S. aureus* para causar a ativação de proteínas de resposta imune do hospedeiro, além da via de sinalização de resposta aguda ser mais enriquecida nas análises funcionais (IBEAGHA-AWEMU et al., 2010).

A resposta da mama à infecção por *E. coli* e *S. aureus* é patógeno-específica, causando graves sinais inflamatórios quando estimuladas por *E. coli* e sinais clínicos mais brandos quando desafiadas por *S. aureus*. Em células desafiadas por *E. coli*, analisadas por qRT-PCR, ocorre expressão precoce de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), sendo as prováveis causas das graves lesões inflamatórias, que não são observados em células desafiadas por *S. aureus*, que induz a ligeira expressão de interleucina 6 (IL-6), predominando a resposta imune secundária fraca (GÜNTHER et al., 2011).

Existem indícios de diferença no perfil de expressão de genes associados a ocorrência de mastite clínica em animais das raças Holandesa, Gir e seus cruzamentos pela técnica de microarranjo (FONSECA, et al 2009; FONSECA et al., 2011). A caracterização do perfil de expressão de genes associados a mastite está mais avançada apenas para animais da raça Holandesa, que pela técnica de microarranjos revela a expressão de citocinas e mediadores inflamatórios em úberes infectados (BANNERMAN et al., 2004a, 2004b; LUTZOW et al., 2008; GUINTER et al., 2009; GUINTER et al., 2010;).

Em animais da raça Gir com infecção intramamária causada por *S. agalactiae* os genes AATK, CCL2, CCL20, CD40, CSF2, GRO- α , IL-12, IL-17, IL-1 β , INHBA, NOS2A, TGF- β 1, TLR-2 e TLR-4 foram relacionados com a resposta imune 24 horas após a infecção, por meio da técnica de microarranjo (FONSECA, et al., 2015). A análise da interação dos genes durante a mastite causada por *S. agalactiae*

utilizando a tecnologia de RNA-seq pode contribuir com melhor esclarecimento da regulação da resposta imune em úbere de animais acometidos, uma vez que essa tecnologia permite detectar todos os transcritos presentes no tecido. Artigos em que se analisam especificamente o perfil da resposta inflamatória em mestiços Holandês-Zebu infectados por *S. agalactiae* não foram encontrados na literatura consultada.

2.5 RNA-seq

A tecnologia de sequenciamento de RNA tem revolucionado análises de transcriptomas devido sua alta capacidade de detecção de novos transcritos, bem como a identificação de diferentes isoformas do transcrito, provenientes do “splicing” alternativo, o que torna essa técnica promissora para medir níveis de expressão e identificar genes que são diferencialmente expressos (MARIONI et al., 2008). Além disso, permite detectar polimorfismos nas regiões transcritas de forma eficiente e com custo relativamente baixo (CÁNOVAS et al., 2010). Define-se “splicing” alternativo como as diferentes combinações de éxons que podem ser recompostas a partir da transcrição do DNA em mRNA, o que explica o fato de um gene codificar mais de uma proteína (GRIFFITHS et al., 2013).

Entre as abordagens existentes para análise de transcriptoma, a tecnologia RNA-seq destaca-se nas análises de expressão gênica diferencial em diferentes tecidos, sendo um poderoso método para mapear e quantificar transcriptomas (CÁNOVAS et al., 2010). Considerada uma tecnologia de alta resolução, por não apresentar um limite superior ou inferior para quantificação de níveis de expressão, o RNA-seq permite o sequenciamento e quantificação da máxima gama dinâmica dos transcriptomas com precisão, permitindo a construção de vias metabólicas e sua comparação em diferentes tecidos. Devido sua sensibilidade a diferentes tamanhos de transcritos e sua capacidade ilimitada de detecção de transcritos correspondentes a sequências genômicas já conhecidas, a técnica pode revelar os limites 5' e 3' de transcrição, variações de sequência em regiões transcritas e, conseqüentemente, permite a análise de transcriptomas complexos. Adicionalmente, apresenta melhor relação custo–benefício quando comparada com outras tecnologias (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; MARGUERAT; BÄHLER, 2010; WICKRAMASINGHE et al., 2014).

Mesmo diante de vantagens, alguns desafios são encontrados no uso da tecnologia de RNA-seq, geralmente associados a necessidade de ferramentas de bioinformática, disponibilidade de maior demanda computacional para armazenar os dados e recursos para análise e processamento de dados. Além disso, é preciso diminuir o viés causado pela construção das bibliotecas e aumentar a cobertura dos genes com menor custo (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; WICKRAMASINGHE et al., 2014).

2.6 RNA-seq em diferentes espécies e tecidos

A tecnologia de RNA-seq tem sido utilizada para análise do transcriptoma em diferentes tecidos de várias espécies. O sequenciamento de RNA mostrou-se eficiente na identificação de novos eventos de “splicing” e “splicing” alternativo não detectados por métodos como o de microarranjos (MORTAZAVI et al., 2008).

Analisando transcriptoma em três tipos de tecido adiposo em bovinos, Lee et al. (2013) sugeriram que as interações entre componentes da matriz extracelular e os receptores transmembranares de células de gordura dependem dos depósitos específicos de adipogênese. O poder do RNA-seq também foi demonstrado por estudo do desenvolvimento embrionário inicial em bovinos, o qual resultou em maior compreensão desta fase (HUANG; KHATIB, 2010). Na avaliação dos genes expressos nas papilas ruminais de novilhos com diferentes fenótipos de eficiência alimentar, as redes de genes identificadas apresentaram associação com ganho de peso, ingestão e eficiência dos alimentos (KERN et al., 2014).

Em ovinos, estudo de expressão gênica diferencial em um padrão de cicatrização óssea retardada resultou na identificação de genes inéditos (JÄGER et al., 2011). Jaeger et al. (2015), estudando a síndrome da disgalactia em suínos por meio da técnica de microarranjos para analisar células epiteliais mamárias desafiadas pelos patógenos causadores da mastite *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, identificaram que um núcleo de resposta imune inata é parcialmente compartilhado por *E. coli* e *S. aureus*. A infecção por *E. coli* induz a resposta inflamatória muito mais rápida e forte do que a infecção por *S. aureus*. A dimensão e eficácia da defesa imune celular após a infecção é determinada pelo reconhecimento do hospedeiro aos diferentes perfis estruturais e patogênicos

(JAEGER et al., 2015). Assim, como em diferentes espécies, diferentes raças também podem apresentar variação no transcriptoma, uma vez que o transcriptoma difere entre indivíduos. Isso é demonstrado no estudo de Suárez-Vega et al. (2014) no qual, comparando transcriptoma do leite de duas raças de ovinos por meio de RNA-seq, detectaram um conjunto de genes com expressão diferencial.

Em estudo realizado com vacas em lactação submetidas a moderado e alto balanço energético negativo, a técnica de RNA-seq mostrou-se eficiente para detectar transcritos em amostras de fígado (MCCABE et al., 2012). O impacto de estudos do transcriptoma utilizando a abordagem de RNA-seq em amostras de fígado de vacas alimentadas com diferentes níveis de energia foi avaliado por Shahzad et al. (2014), que identificaram maiores níveis de transcrição de genes no fígado quando os animais recebiam maior proporção de energia na dieta pré-parto. Para a seleção de animais com alta produção de leite, é de suma importância associar os resultados obtidos por estudos utilizando a tecnologia de RNA-seq, uma vez que permitem a investigação da expressão gênica em animais acometidos com doenças como a mastite, que altera a produção de leite.

O envolvimento de células do epitélio mamário que contribuem com a resposta imune contra infecção pelos patógenos *E. coli* e *S. aureus*, também causadores da mastite em bovinos, foi confirmado por RNA-seq, bem como o potencial de miRNAs (microRNAs) como biomarcadores para diagnóstico e desenvolvimento de medida de controle desses patógenos (JIN et al., 2014). Em transcriptoma de glândula mamária de vacas holandesas com alta e baixa porcentagem de proteína e de gordura no leite, foram detectados genes diferencialmente expressos por meio de RNA-seq. Isto permitiu a identificação de genes candidatos que possam contribuir para caracterização de qualidade do leite, bem como o conhecimento da complexidade do transcriptoma da glândula mamária (CUI et al., 2014).

2.7 Sequenciamento de RNA e métodos computacionais para análise da expressão gênica diferencial

O sequenciamento de RNA utilizando a plataforma HiSeq 2000 (Illumina, CA, EUA), é altamente acurado, o que resulta em baixa taxa de erros e permite o

sequenciamento de um maior número de dados com menor custo. Após o sequenciamento, a análise dos dados de RNA-seq pode ser realizada por softwares livres e comerciais de fácil utilização, com os quais podem ser realizados todo o trabalho de análise de expressão gênica (WICKRAMASINGHE et al., 2014).

TopHat (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) é um programa utilizado para o alinhamento das “reads” obtidas a partir do sequenciamento com um genoma referência. O programa Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) era muito utilizado para alinhamento das “reads”, no entanto, devido sua incapacidade de alinhar “reads” que se encontram nas junções de éxons, foi desenvolvido o programa TopHat que não apresenta essa limitação e por isso é mais indicado para fazer o alinhamento. Em seguida, a montagem individual do transcriptoma a partir das “reads” alinhadas com o genoma referência pode ser feita com o programa Cufflinks, que após a fase de montagem, quantifica os níveis de expressão de cada sequência obtida em determinada amostra (TRAPNELL et al., 2013).

A acurada detecção de mudança na expressão gênica entre duas condições experimentais é afetada pela abundância (número de contagem por amostra) e pelo número de replicatas. Tendo em vista a variabilidade técnica e biológica, o número de contagem por amostra deve ser grande o suficiente para obter variâncias precisas em amostras idênticas para cada condição do experimento, sendo que quanto maior o número de “reads” por amostra, maior a capacidade de detecção de genes diferencialmente expressos pelos métodos estatísticos. O número de replicatas ideal depende da variância entre as replicatas, sendo que quanto maior a variância entre as replicatas, maior número de replicatas é necessário (BROWN; GOECKS, 2013).

O limiar para identificar a expressão diferencial de genes de forma acurada para dados de RNA-seq é dada pela profundidade de cobertura, que indica que o total de “reads” é muitas vezes maior do que o tamanho da sequência estudada. Até certo ponto o aumento da profundidade de cobertura aumenta o número de genes identificados, a partir de então, seu aumento mostra um decréscimo constante na detecção de genes diferencialmente expressos (BROWN; GOECKS, TAYLOR, 2013).

Os métodos para análise de expressão diferencial dos dados de contagem replicados são variáveis, bem como seus resultados. Métodos bastante utilizados e que reportam bons resultados são os implementados nos pacotes edgeR (ROBINSON; McCARTHY; SMYTH, 2010) e baySeq (HARDCASTLE; KELLY, 2010), do repositório Bioconductor de pacotes de softwares desenvolvidos em R (R Development Core Team, 2015), e o algoritmo Cuffdiff (TRAPNELL et al., 2010a) implementado no programa Cufflinks. Ambos têm a mesma finalidade, porém são baseados em diferentes parâmetros, permitindo assim, a obtenção de resultados diferentes.

Pelo método edgeR, um modelo de Poisson para dados sobredispersos é usado para explicar a variabilidade biológica e técnica (variabilidade presente nas diferentes tecnologias de sequenciamento), sendo que métodos empíricos de Bayes são usados para moderar o grau de sobredispersão por meio dos transcritos e podem melhorar a confiabilidade da inferência. Tem capacidade menos conservadora com experimentos realizados com amostras pequenas (SONESON; DELORENZI, 2013). Essa metodologia assume distribuição binomial negativa dos dados e pode ser utilizada com número mínimo de replicações, com pelo menos uma condição experimental replicada (ROBINSON; McCARTHY; SMYTH, 2010). Esta estima expressão diferencial para cada gene usando um teste exato análogo ao teste de Fisher ou usando um modelo baseado em GLM (“Generalized Linear Model”), ambos adaptados para sobredispersão dos dados (ROBINSON; SMYTH, 2008).

O algoritmo baySeq também utiliza a abordagem de Bayes empírica para detectar os padrões de expressão diferencial dentro de um conjunto de amostra oriunda do sequenciamento. O algoritmo assume distribuição binomial negativa para os dados e obtém distribuição prévia empiricamente determinada a partir de todo o conjunto de dados (HARDCASTLE; KELLY, 2010).

O algoritmo Cuffdiff2 (TRAPNELL et al., 2013) utiliza o teste t para avaliar a significância estatística. O mesmo estima a expressão ao nível de transcriptoma controlando a variabilidade dos dados, com capacidade para detectar ambiguidades do mapeamento, por meio de uma medida de incerteza. As estimativas de incerteza e a variabilidade ao redor das replicatas são combinadas sob um modelo beta

binomial negativo, para estimar a variância das estimativas de contagem. O modelo assume que o número de “reads” produzidas por cada transcrito é proporcional a sua abundância, mas flutua devido a variabilidade técnica durante a preparação das bibliotecas, o sequenciamento e a variabilidade biológica entre as replicações do experimento (TRAPNELL et al., 2012).

Tecnologias de sequenciamento de alto rendimento são incorporadas no campo de estudos de níveis de expressão em dados de transcriptoma com aplicação na genômica funcional. A análise desses dados em estudo de expressão gênica envolve a verificação de que a contagem de transcritos é diferente estatisticamente em diferentes condições experimentais. Assim, a aplicação dessa tecnologia e dos diferentes métodos de análise diferencial, permite o maior entendimento de características importantes para o progresso genético animal, possibilitando a identificação de genes funcionalmente relacionados com o desenvolvimento da mastite.

3. Referências Bibliográficas

Associação Brasileira da Raça Girolando. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>>. Acesso em 21/03/2016.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, p. 463-472, 2004a.

BANNERMAN, D.; PAAPE, M. J.; GOFF, P. P.; KIMURA, K.; LIPPOLIS, J. D.; HOPE, J. C. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary Research**, v. 35, p. 681-700, 2004b.

BÄUMER, W.; MERTENS, A.; BRAUN, M.; KIETZMANN, M. The Isolated Perfused Bovine Uterus as a Model for Mucous Membrane Irritation and Inflammation. **Altex**, v. 19, p. 57–63, 2002.

BROWN, S. M.; GOECKS, J.; TAYLOR, J. RNA sequencing with NGS. In: **Next-generation DNA sequencing informatics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013. p. 171-186.

CÁNOVAS, A.; QUINTANILLA, R.; AMILLS, M.; PENA, R. N. Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. **BMC Genomics**, v. 11, n. 372, 2010.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p.1934–1943, 2009.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. Animal Biotechnology. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123–147, 2010.

CUI, X.; HOU, Y.; YANG, S.; XIE, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; LU, X.; LIU, G. E.; SUN, D. Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 226, 2014.

EHINGER, A. M.; KIETZMANN, M. Tissue Distribution of Oxacillin and Ampicillin in the Isolated. **Journal of Veterinary Medicine**, Verlag, Berlin, v. 47, p. 157–168, 2000a.

EHINGER, A. M.; KIETZMANN, M. Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 303–310, 2000b.

FILHO, 2015. Tudo sobre a raça girolando na pecuária leiteira. **Entrevista**. Disponível em: <<http://iepec.com/tudo-sobre-a-raca-girolando-na-pecuaria-leiteira/>>. Acesso em 21/03/2016.

FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; WELLER, M. M. D. C. A.; SOUSA, K. R. S.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S. E. F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 776-781, 2009.

FONSECA, I.; ANTUNES, G. R.; PAIVA, D. S.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, S. E. F.; MARTINS, M. F. Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbred dairy cows. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1295-1303, 2011.

FONSECA, I.; CARDOSO, F. F.; HIGA, R. H.; GIACHETTO, P. F.; BRANDÃO, H. M.; BRITO, M. A. V. P.; FERREIRA, M. B. D.; 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.

GILBERT, F. B.; CUNHA, P.; JENSEN, K.; GLASS, E. J.; FOUCRAS, G.; ROBERT-GRANIÉ, C.; RUPP, R.; RAINARD, P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. **Veterinary Research**, v. 44, p. 40, 2013.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. Tradução Idilia Vanzellotti. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.248, 257.

GÜNTHER, J.; KOCZAN, D.; YANG, W.; NURNBERG, G.; REPSILBER, D.; SCHUBERTH, H. J.; PARK, Z.; MAQBOOL, N.; MOLENAAR, A.; SEYFERT, H. M. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 40, p. 31-39, 2009.

GÜNTHER, J.; SHUZHEN, L.; ESCH, K.; SCHUBERTH, H. J.; SEYFERT, H. M. Stimulated ex-pression of TNF- α and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Immunology and Pathology**, v. 135, p. 152-157, 2010.

GÜNTHER, J.; ESCH, K.; POSCHADEL, N.; PETZL, W.; ZERBE, H.; MITTERHUEMER, S.; BLUM, H.; SEYFERT, H-M. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor Alpha. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 695–707, 2011.

HARDCASTLE, T. J.; KELLY, K. A. baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 422, 2010.

HUANG, W.; KHATIB, H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**, v. 11, n. 711, 2010.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; IBEAGHA, A. E.; MESSIER, S.; ZHAO, X. Proteomics, genomics, and pathway analyses of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infected milk whey reveal molecular pathways and networks involved in mastitis. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 9, p. 4604–4619, 2010.

JAEGER, A.; BARDEHLE, D.; OSTER, M.; GÜNTHER, J.; MURÁNI, E.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; KEMPER, N. Gene expression profiling of porcine mammary epithelial cells after challenge with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in vitro. **Veterinary Research**, v. 46, n. 50, 2015.

JÄGER, M.; OTT, C-E.; GRÜNHAGEN, J.; HECHT, J.; SCHELL, H.; MUNDLOS, S.; DUDA, G. N.; ROBINSON, P. N.; LIENAU, J. Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing. **BMC Genomics**, v. 12, n. 158, 2011.

JIN, W.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LIANG, G.; BEAUDOIN, F.; ZHAO, X.; GUAN, L. L. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. **BMC Genomics**, v. 15, n. 181, 2014.

KEEFE, G. P. Streptococcus agalactiae mastitis : A review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 429-437, 1997.

KERN, R. J.; LINDHOLM-PERRY, A. K.; FREETLY, H. C.; SNELLING, W. M.; MILES, I. R.; LUDDEN, P. A. Surface enlargement factor of rumen papillae and expression of genes involved in dermatological diseases and their relationships with feed intake in beef steers. In: ASAS MIDWESTERN SECTION, 2014. **Anais eletrônicos...** Des Moines, IA: Scientific Sessions and Business Meeting, 2014. Disponível em: <
https://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?seq_no_115=303395>. Acesso em: 21 março 2016.

KIETZMANN, M.; LIISCHER, W.; ARENS, D.; MAAL, P.; LUBACH, D. The Isolated Perfused Bovine Udder as an in vitro Model of Percutaneous Drug Absorption Skin Viability and Percutaneous Absorption of Dexamethasone, Benzoyl Peroxide, and Etofenamate. **Journal Pharmacol Toxicol Methods**, v. 30, n. 2, p. 75–84, 1993.

LAHOUASSA, H., MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Cytokine**, v. 38, p. 12–21, 2007.

LEE, H. J.; JANG, M.; KIM, H.; KWAK, W.; PARK, W.; HWANG, J. Y.; LEE, C-K.; JANG, G. W.; PARK, M. N.; KIM, H-C.; JEONG, J. Y.; SEO, K. S.; KIM, H.; CHO, S.; LEE, B-Y. Comparative Transcriptome Analysis of Adipose Tissues Reveals that ECM-Receptor Interaction Is Involved in the Depot-Specific Adipogenesis in Cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

LUTZOW, Y.; DONALDSON, L.; GRAY, C.; VUOCOLO, T.; PEARSON, R.; REVERTER, A.; BYRNE, K.; SHEEHY, P.; WINDON, R.; TELLAM, R. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 18-25, 2008.

MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: From technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 569–579, 2010.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, p. 1509–1517, 2008.

MCCABE, M.; WATERS, S.; MORRIS, D.; KENNY, D.; LYNN, D.; CREEVEY, C. RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. **BMC Genomics**, v. 13, n. 193, 2012.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; McCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, (SUPPL. 89), p. 1-13, 2010.

NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G.; WESTGARTH, D. R. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 5, p. 696–707, 1969.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, M. V. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399–409, 2007.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 6.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2012. p. 642-643.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A, L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. Varela: São Paulo, 2001. Vol. I, p. 294-295

ROBINSON, M. D.; McCARTHE, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321–332, 2008.

SEYEDNASROLLAH, F.; LAIHO, A.; ELO, L.L. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. **Briefings in Bioinformatics**, 2013. Disponível em: <<http://bib.oxfordjournals.org/content/16/1/59>>

SHAHZAD, K.; BIONAZ, M.; TREVISI, E.; BERTONI, G.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; LOOR, J. J. Integrative analyses of hepatic differentially expressed genes and blood biomarkers during the peripartal period between dairy cows overfed or restricted-fed energy prepartum. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SUÁREZ-VEGA, A.; GUTIERREZ-GIL, B.; ESTEBAN, C.; ARRANZ, J. J. Initial RNA-seq analysis on the milk transcriptional profiling of two sheep breeds. In: 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. **Anais eletrônicos...** Vancouver, Canada, 2014. Disponível em: <https://www.asas.org/docs/default-source/wcgalp-posters/610_paper_8980_manuscript_340_0.pdf?sfvrsn=2>. Acesso em 17 fev 2016.

TRAPNELL, C.; HENDRICKSON, D.; SAUVAGEAU, M.; GOFF, L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 46-53, 2013.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562-578, 2012.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, ALI.; KWAN, G.; BAREN, M. J. V.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010a.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Dairy: World Markets and Trade. 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em 18/03/2016 às 17:11hs.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WICKRAMASINGHE, S.; CÁNOVAS, A.; RINCÓN, G.; MEDRANO, J. F. RNA-Sequencing: A tool to explore new frontiers in animal genetics. **Livestock Science**, v. 166, p. 206-216, 2014.

CAPÍTULO 2 - Expressão gênica diferencial em úbere extracorpóreo de vacas leiteiras mestiças Holandês-Zebu, infectado experimentalmente por *Streptococcus agalactiae* analisada por diferentes métodos computacionais

1. Introdução

Mastite é a inflamação da glândula mamária que pode ser causada por mudanças metabólicas e fisiológicas, trauma ou presença de microrganismos patogênicos ambientais ou contagiosos (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). A mastite é responsável por importantes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, uma vez que provoca alterações no volume e qualidade do leite produzido.

A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica, dependendo da sua causa. O influxo de células inflamatórias no hospedeiro em resposta a mastite caracteriza-se pelo envolvimento inicial de neutrófilos, seguido principalmente de macrófagos e na fase final por fibroblastos, que juntos resultam em aumento da celularidade no tecido, evoluindo para fibrose e causando a involução mana (RIET-CORREA et al., 2001). O agente patogênico *Streptococcus agalactiae* está associado à mastite subclínica, com alta taxa de transmissão no rebanho (NEAVE et al., 1969).

A glândula mamária concentra as vias biológicas relacionadas à ocorrência da mastite e a resposta imunológica contra o patógeno (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009). Assim, a investigação de genes transcritos nesse tecido, que codificam componentes de diversas vias biológicas e processos celulares, pode viabilizar maior entendimento de mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e ocorrência dessa enfermidade e a influência da mesma em diversos processos fisiológicos de importância para a produção animal. A associação do padrão de expressão gênica com determinados fenótipos, como a presença e a ausência de doenças, é uma importante ferramenta para a geração de estratégias de manejo e de seleção que priorizem a utilização de animais mais resistentes à mastite.

A necessidade de buscar animais mais adaptados e de maior produtividade, levou a utilização de mestiços Holandês-Zebu, que é indicado para obtenção de

animais rústicos e com alta capacidade de produção de leite a pasto, quando comparada com outros mestiços e raças compostas (FILHO, 2015). Em adição, a utilização de raças compostas Holandês-Zebu permite o aproveitamento de características de alto desempenho quanto à precocidade, fertilidade e longevidade (Associação Brasileira da Raça Girolando, 2016).

A investigação da expressão gênica da mastite de forma abrangente é possível com o uso da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq), uma vez que a mesma viabiliza a análise de todo o conjunto de transcritos de um tecido (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Métodos computacionais disponíveis para análise de expressão gênica (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010a; HARDCASTLE; KELLY, 2010; TRAPNELL et al., 2010a) apresentam grandes diferenças e nenhuma metodologia isoladamente é considerada ideal para todas os delineamentos experimentais (SEYEDNASROLLAH; LAIHO; ELO, 2013).

Estudos de análise do transcriptoma do tecido mamário permitem a caracterização do perfil da expressão gênica, pela identificação de genes e suas variáveis capazes de conferir resistência/susceptibilidade à mastite. A caracterização do perfil de expressão de genes associados à mastite está mais avançada apenas para animais da raça Holandesa (BANNERMAN et al., 2004a, 2004b; LUTZOW et al., 2008; GUINTER et al., 2009; GUINTER et al., 2010). Existem indícios de diferenças no perfil de expressão de genes associados a ocorrência de mastite clínica em animais das raças Holandesa, Gir e seus cruzamentos pela técnica de microarranjo (FONSECA, et al 2009; FONSECA et al., 2011), porém nestes estudos não foi utilizado sequenciamento de RNA das amostras.

Sabe-se da participação do *S. agalactiae* como um dos causadores de mastite. Existem evidências que em animais da raça Gir leiteiro com infecção intramamária causada por *S. agalactiae*, por meio da técnica de microarranjos, muitos genes relacionados à resposta imune são diferencialmente expressos nas primeiras horas após a inoculação deste agente patogênico (FONSECA et al., 2015). A análise da interação dos genes durante a mastite causada por *S. agalactiae*, utilizando RNA-seq, pode aumentar o conhecimento sobre a regulação da resposta imune em úbere de animais acometidos, uma vez que é possível a identificação de novos genes associados à resposta imune a esse patógeno.

Assim, este trabalho teve como objetivo detectar, por meio de três métodos computacionais distintos, a expressão gênica diferencial de dados de contagem de transcritos, obtidos por RNA-seq de glândula mamária de vacas leiteiras mestiças Holandês-Zebu, mantida em um sistema extracorpóreo, infectada experimentalmente com *S. agalactiae* e estudar o perfil de expressão do total de genes identificados e aqueles comuns aos três métodos relacionados ao desenvolvimento da mastite, a fim de contribuir para melhor entendimento dos processos celulares e vias biológicas envolvidos com a expressão desta característica.

2. Material e Métodos

2.1 Delineamento experimental

Quatro vacas mestiças Holandês-Zebu foram abatidas no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG, Brasil. Os úberes foram perfundidos e inoculados experimentalmente com *S. agalactiae*. Para cada úbere, dois quartos foram inoculados (anterior esquerdo - AE; e posterior esquerdo - PE) e dois foram utilizados como controle (anterior direito - AD; e posterior direito - PD). As biópsias foram feitas do tecido alveolar nos tempos 0 e 3 horas após a perfusão do tecido. Portanto, ao todo, foram obtidas 16 amostras para as reações de RNA-seq (4 vacas x 2 amostras por vaca em cada tempo x 2 tempos por amostra). As comparações T0C x T0I e T3C x T3I foram realizadas, em que T0 e T3 indicam os tempos de colheita 0 e 3 horas após a perfusão do tecido, e C e I indicam o quarto controle e Inoculado dos úberes, respectivamente. O experimento foi realizado com apoio da FAPEMIG e do CNPq.

2.2 Isolamento e manutenção da glândula mamária

O sistema extracorpóreo foi preparado como descrito por Kietzmann et al. (1993) e Ehinger e Kietzmann (2000a, b) com algumas modificações. Úberes saudáveis de vacas em lactação abatidas foram colhidos. Os úberes foram examinados visualmente e por palpação e o leite foi colhido para realização de testes microbiológicos e contagem de células somáticas antes do abate. Entre 10 a

15 minutos após o abate, foi administrado via artéria pudenda uma solução de Tyrode (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; CaCl₂·2H₂O 1,36 mM; MgCl₂·6H₂O 0,5 mM; NaH₂PO₄·H₂O 0,36 mM; NaHCO₃ 11,9 mM; Glicose 5,5 mM) e heparina 1% para impedir a formação de coágulos dentro dos vasos e consequentes obstruções. As glândulas foram então transportadas em caixas isotérmicas refrigeradas para o Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, Brasil, onde os úberes foram fixados em suporte mimetizando a posição ortostática. As artérias e veias maiores foram canuladas e perfundidas com solução de Tyrode gaseificada com uma mistura de gás (CO₂ 5% e O₂ 95%), através de tubos de silicone com o auxílio de bomba peristáltica. A pressão constante de 50 mmHg foi mantida para assegurar um fluxo de perfusato de 100 a 120 mL/min, necessário para homeostase hidroeletrolítica mimetizando o que ocorre “in vivo”.

2.3 Inoculação com o patógeno *S. agalactiae*

Para os quartos inoculados, foi preparado inóculo de uma cepa de *S. agalactiae* isolada de uma cultura pura do leite de uma vaca com mastite subclínica, pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Causadores de Mastite, mantida na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Para preparo do inóculo, a cultura foi diluída em tampão fosfato salino 1X (PBS: KCl 2,7 mM; K₃PO₄ 2 mM; NaCl 137 mM e NaH₂PO₄ 10 mM), em concentração final de 100 unidades formadoras de colônia (CFU)/mL. A suspensão bacteriana foi inoculada em um volume final de 10 mL. Os outros quartos (controle) foram inoculados com PBS 1X estéril. O procedimento de perfusão da glândula mamária, biópsia e inoculação do patógeno é parte da tese de doutorado de Isabella Silvestre Barreto Pinto (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora).

2.4 Colheita de tecido mamário

Amostras de tecido alveolar de cada glândula mamária foram colhidas assepticamente por biópsia nos tempos 0 e 3 horas após a perfusão do tecido, com

a utilização de agulha Tru-Cut, e conservadas em RNAlater® (Ambion, Austin, TX, EUA) até a extração do RNA.

2.5 Extração do RNA

A extração de RNA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. O RNA total de cada uma das amostras foi extraído com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante, o qual se baseia na lise celular, seguida por tratamento com DNase para eliminar possíveis contaminações por DNA, ligação do RNA à membrana de sílica-gel, purificação e eluição do RNA total. O RNA foi extraído dos quatro tetos (2 inoculados e 2 controles). Cada extração foi realizada em duplicata. O RNA total isolado foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop®, Wilmington, DE, EUA) e a sua qualidade avaliada pelo índice RIN (RNA Integrity Number), após corrida em Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA), em que a média do RIN e respectivo desvio-padrão foram 6,69 e 0,46. Um “pool” das amostras de RNA dos dois tetos inoculados e outro “pool” com as duas amostras de RNA dos dois tetos controles foram feitos, totalizando duas amostras por animal em cada tempo (0 e 3 horas) para análise de sequenciamento.

2.6 Sequenciamento de RNA

Os procedimentos relacionados ao RNA-seq foram realizados no Laboratório Multiusuário Centralizado – Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia - Laboratório de Biotecnologia Animal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba - SP.

O kit “TruSeq RNA sample preparation” (Illumina, CA, EUA) foi utilizado para preparar uma biblioteca para cada amostra e adicionar o “barcode” para identificação das mesmas, seguindo as especificações do fabricante. Os cálculos para o sequenciamento foram realizados, esperando-se obter cerca de 19 milhões de sequências curtas por amostra, com 100 pares de base cada. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR e o sequenciamento “paired-end” foi realizado

utilizando o “SBS sequencing kit v.3” (Illumina, CA, EUA), em duas “lanes” por 100 ciclos, com a plataforma HiSeq 2000 (Illumina, CA, EUA) e os adaptadores foram removidos das “reads”.

2.7 Controle de qualidade e alinhamento

A qualidade dos dados foi verificada com a ferramenta FastQC (Galaxy tool version 0.65) disponível na plataforma Galaxy (AFGAN et al., 2016) (<https://usegalaxy.org/>). O alinhamento das “reads” foi realizado sem fazer o “trimming” por qualidade e descarte das “reads” de baixa qualidade ou ambiguidade, uma vez que durante o alinhamento, “reads” de baixa qualidade não são alinhadas. Para confirmar que a mesma qualidade de mapeamento foi obtida, o “trimming” foi realizado e, como esperado, não aumentou a porcentagem do mapeamento quando comparado ao mapeamento sem “trimming”.

As sequências curtas de cada amostra foram alinhadas com a versão do genoma bovino referência UMD 3.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=bos%20taurus>), com o algoritmo TopHat (Galaxy tool version 2.1.0) (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009), conforme protocolo descrito por Trapnell et al. (2012), seguindo as configurações padrão do TopHat. As “reads” não alinhadas com o genoma referência bovino foram submetidas ao algoritmo de alinhamento local blast (“Basic Local Alignment Search Tool) para identificar as bibliotecas de sequências que se assemelham a essas “reads”. Esse processo foi realizado na plataforma Galaxy, na qual utilizou-se o programa NCBI BLAST + blastx (Galaxy tool version 0.1.07) com a opção de proteínas não redundantes.

A partir dos resultados do alinhamento das “reads” com o genoma referência bovino, a montagem individual dos transcritos para cada amostra foi realizada utilizando o programa Cufflinks (Galaxy tool version 2.2.1.0) (TRAPNELL et al., 2010b). As configurações padrão do “software” foram utilizadas, sendo que a anotação de referência foi utilizada como guia. O Cufflinks pode estimar as abundâncias pela unidade FPKM (fragmentos por kilobase de transcritos por milhão de fragmentos mapeados), ou seja, o nível de expressão, quantificando as “reads”

que mapearam para cada transcrito e normalizando essas contagens para o rendimento total do equipamento.

Em seguida, a expressão gênica foi calculada por meio das contagens dos fragmentos alinhados que foram mapeados aos éxons, utilizando o software Htseq-count (Galaxy tool version 0.6.1galaxy1) (ANDERS; PYL; HUBER, 2014). Esse processo de contagem, também denominado sumarização, permite detectar os genes expressos, organizando-os em uma matriz de expressão.

Para verificar o nível de similaridade entre as amostras, a técnica multivariada denominada escalonamento multidimensional (MDS) foi utilizada. O algoritmo calcula a distância entre as amostras com base em uma matriz de distância em um espaço multidimensional, em dimensão reduzida, construída a partir das variáveis escolhidas para agrupar as amostras (HAIR et al., 2009).

2.8 Análises estatísticas

2.8.1 Método edgeR

O método da máxima verossimilhança condicional ajustada pelos quantis (qCML) foi utilizado em um teste exato análogo ao teste exato de Fisher (ROBINSON; SMYTH, 2008). Para determinar a expressão diferencial pelo método implementado no pacote edgeR (Galaxy tool version 0.0.2) (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010a) considerou-se o parâmetro de comparação “pair wise” para tipo de análise e assumiu-se que os dados de contagem seguem distribuição binomial negativa. O modelo sob distribuição Binomial Negativa (NB) utilizado em blocos casualizados incompletos equilibrados para modelar os dados, é descrito por:

$$Y_{gi} \sim NB(M_i p_{gj}, \phi_g)$$

em que g é o gene e i é a amostra, M_i é o tamanho da biblioteca (número total de “reads”), ϕ_g é a dispersão e p_{gj} é a abundância relativa do gene g no grupo experimental j para o qual a amostra i pertence. Para a parametrização da NB, a média é $\mu_{gi} = M_i p_{gj}$ e a variância é $\mu_{gi}(1 + \mu_{gi} \phi_g)$. Para proceder a análise, o fator de normalização, chamado TMM (“trimmed mean of M-values”) entre cada par de amostras foi estimado (ROBINSON; OSHLACK, 2010b). A expressão de cada gene foi calculada como média de expressão de todas as amostras para cada grupo e

apresentada como média da função logarítmica das contagens por milhões (CPM - “counts per million”). O procedimento de Benjamini e Hochberg (1995) foi utilizado para indicar a proporção esperada de hipóteses nulas rejeitadas erroneamente, possibilitando o controle da taxa de falsas descobertas (“False Discovery Rate” - FDR) e valores de significância ajustadas para $FDR < 1\%$ foram utilizados para identificar os genes diferencialmente expressos.

2.8.2 Método baySeq

O baySeq (HARDCASTLE; KELLY, 2010) implementado como um pacote do repositório R/Biocondutor (R package version 1.16.0), baseado em Inferência Bayesiana, utiliza informações a priori para ajustar um modelo não linear aos dados, visando quantificar perturbações e incertezas em suas estimativas (LIU; LOGVINENKO, 2003). O método assume distribuição binomial negativa e por iterações até a convergência, obtém-se pela máxima verossimilhança uma distribuição de probabilidade prévia empiricamente determinada a partir do conjunto de dados inteiros (HARDCASTLE; KELLY, 2010).

$$Y_{ij} \sim NB(M_{q_i}, \phi_q)$$

em que Y_{ij} é o número de “reads” do gene i na j -ésima amostra, M_{q_i} é a média e ϕ_q é a dispersão. Os dados de contagem do conjunto com $n=16$ amostras $A = \{A_1, \dots, A_{16}\}$ em que os dados observados para um gene em particular, c , é dado por (u_{1c}, \dots, u_{nc}) em que u_{ic} é a contagem para determinado gene c para amostra i . Então, para cada amostra A_i , o tamanho da biblioteca foi obtido como um fator de escala l_i . Assim, para cada gene (c), considerou-se que os dados (D) eram:

$$Dc = \{(u_{1c}, \dots, u_{nc}), (l_1, \dots, l_{16})\}$$

Após, os modelos foram definidos para o conjunto de dados, considerando os tratamentos inoculado (P) e controle (C). Modelo 1, geral, considerando os dados como se fossem de um único tratamento, sem diferença:

$$D_{PC} = \{(u_{P_1}, u_{P_2}, u_{P_3}, u_{P_4}, u_{C_1}, u_{C_2}, u_{C_3}, u_{C_4}), (l_{P_1}, l_{P_2}, l_{P_3}, l_{P_4}, l_{C_1}, l_{C_2}, l_{C_3}, l_{C_4})\}$$

Modelo 2, alternativo, considerando as diferenças entre os tratamentos:

$$D_P = \{(u_{P_1}, u_{P_2}, u_{P_3}, u_{P_4}), (l_{P_1}, l_{P_2}, l_{P_3}, l_{P_4})\}$$

$$D_C = \{(u_{C_1}, u_{C_2}, u_{C_3}, u_{C_4}), (l_{C_1}, l_{C_2}, l_{C_3}, l_{C_4})\}$$

Por fim, fez-se a comparação entre os modelos 1 e 2, estimando o fator de normalização “Relative log expression” (RLE), descrito por Anders e Huber (2010). Desta forma, o método produz probabilidades posteriores em vez de valores de significância e possui controle da FDR. O critério de $p < 1\%$, sendo p a probabilidade posterior, foi utilizado para determinar genes diferencialmente expressos.

2.8.3 Método Cuffdiff

Um modelo de distribuição binomial negativa beta para leitura dos dados de contagem e teste t para diferencial de expressão foi utilizado pelo método Cuffdiff (TRAPNELL et al., 2013), que está implementado no pacote Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010a; b), desenvolvido para identificação de genes diferencialmente expressos e “splicing” diferencial. Procedimento geométrico para normalização, semelhante ao DESeq e classificado pelo FPKM, foi utilizado para explicar as diferentes profundidades, ou seja, quantas leituras são necessárias para observar toda a sequência em estudo. Outros parâmetros utilizados foram: “Dispersion estimation method” = “pooled”; “Min Alignment Count” = 10 e “apply length correction” = “cufflinks effective length correction”.

$$x_t^j \sim NB(\mu_t^j, \sigma_t^{j^2})$$

em que, x_t^j é o número de fragmentos na replicata j a partir do transcrito t , μ é a média e σ^2 é a variância. Para controle de FDR, foi utilizado o procedimento de Benjamini e Hochberg (1995), também usado pelo método edgeR, sendo que valores de significância ajustadas por $FDR < 1\%$ foram utilizados para identificar os genes diferencialmente expressos.

2.9 Análise da ontologia gênica e identificação de vias metabólicas para o total de genes identificados e aqueles comuns aos três métodos computacionais

As inferências sobre o papel funcional dos genes foram realizadas com o total de genes identificados pelos três métodos. As inferências foram realizadas utilizando o software DAVID Bioinformatic Resources 6.8 Beta (HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A., 2009a; b). Para análise das vias e processos biológicos, os genes com expressão diferencial foram submetidos ao DAVID, e anotados como “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) e termos de ontologia gênica.

Os genes com expressão diferencial em função do tempo e tratamento foram identificados de acordo com sua função biológica e, posteriormente, categorizados e hierarquizados em grupos funcionais. Esse agrupamento gênico permite investigar padrões de expressão dos grupos funcionais, podendo-se chegar à identificação de processos celulares, de componente celular, função celular e vias biológicas diferencialmente reguladas. A análise do perfil transcricional foi associada aos cenários caracterizados pela infecção causada pela inoculação de *S. agalactiae*.

3. Resultados e Discussão

O número total de “reads” geradas pelo RNA-seq foi de 842.604.108, sendo o número médio de “reads” por amostra de 26.331.378,38. O controle de qualidade das “reads”, realizado por meio do software FastQC (Apêndice A - Qualidade de sequência por base) permitiu uma visão geral da variação de qualidade em todas as bases sequenciadas em cada posição no arquivo de entrada fastq. As amostras foram consideradas de boa qualidade, uma vez que a média para cada base sequenciada está acima do ponto 25 do eixo y, que representa os índices de qualidade Phred (probabilidade de determinada base ter sido lida incorretamente).

A boa qualidade das bibliotecas de cDNA, em conjunto ao conhecimento que programas de mapeamento conseguem trabalhar com possíveis variações de qualidade, não mapeando “reads” com bases erradas, proveu segurança na tomada da decisão de continuar as análises sem realizar o “trimming” das “reads”. O alinhamento sem “trimming” das bibliotecas resultou em uma média de 88,89% de “reads” mapeadas por biblioteca (Tabela 1). Valores próximos foram encontrados

por Cui et al. (2014), que também alinharam amostras de tecido mamário com auxílio do software TopHat.

Quando foi realizado o mapeamento com “trimming” das bibliotecas, em média 88,91% de “reads” foram mapeadas por biblioteca. Essa pequena diferença na porcentagem média de mapeamento é explicada uma vez que o número de “reads” de entrada no alinhamento é menor, já que foi realizado o “trimming” das bibliotecas.

Tabela 1 – Número e porcentagem de “reads” mapeadas por biblioteca (“Left”, “Right” and “aligned pairs”)

Amostra	Identificação da Amostra	Alinhamento							
		Número		%		Número		%	
		"Left reads"		"Right reads"		"Aligned pairs"			
Controle	G7T0	30692458	89,9	30419535	89,1	29164959	84,2		
Controle	G7T3	23756098	87,9	23934459	88,6	22638978	82,6		
Controle	G8T0	21164058	90,4	21137250	90,3	20248224	85,3		
Controle	G8T3	23096338	89,0	23253768	89,6	21943088	83,9		
Controle	G9T0	23054518	87,5	23235820	88,2	21811906	82,3		
Controle	G9T3	22784883	90,2	22690679	89,9	21607226	85,0		
Controle	G10T0	21290821	88,6	21216345	88,3	20123296	82,6		
Controle	G10T3	19639786	89,2	19736210	89,7	18642344	83,9		
Inoculada	G7T0	22510799	86,3	22658924	86,9	21280138	80,9		
Inoculada	G7T3	23227834	89,8	23142353	89,5	22129511	84,2		
Inoculada	G8T0	21707055	88,3	21809049	88,7	20653152	82,8		
Inoculada	G8T3	22543993	89,5	22395590	88,9	21408569	83,8		
Inoculada	G9T0	33428420	90,4	33434970	90,4	31943198	85,1		
Inoculada	G9T3	22334160	88,4	22479819	89,0	21294357	83,2		
Inoculada	G10T0	21647272	86,5	21777734	87,0	20470883	80,5		
Inoculada	G10T3	21589981	89,5	21473579	89,0	20466780	83,8		

Identificação da amostra: G7 à G10 (número da amostra); T0 e T3 (tempo após a perfusão do tecido).

As “reads” não alinhadas com o genoma referência bovino que foram submetidas ao algoritmo de alinhamento local blast são sequências semelhantes a diversas outras espécies, incluindo espécies pertencentes à família dos bovídeos. Muitas dessas sequências estão relacionadas a processos do sistema imune, sugerindo que esses alelos, por serem muito polimórficos, ainda não foram identificados e anotados no genoma de *Bos taurus*.

Por meio da análise multivariada de escalonamento multidimensional - MDS, verificou-se que a amostra controle do animal 7 no tempo de colheita de 3 horas após a perfusão do tecido, agrupou-se com as amostras inoculadas (Figura 1). Essa similaridade com as amostras inoculadas pode ser indicativa de algum trauma neste quarto, que é uma das causas da mastite ou indicativa de contaminação. Não foram feitas análises para confirmar a causa desse resultado inesperado e, por esse motivo, essa amostra foi excluída das análises.

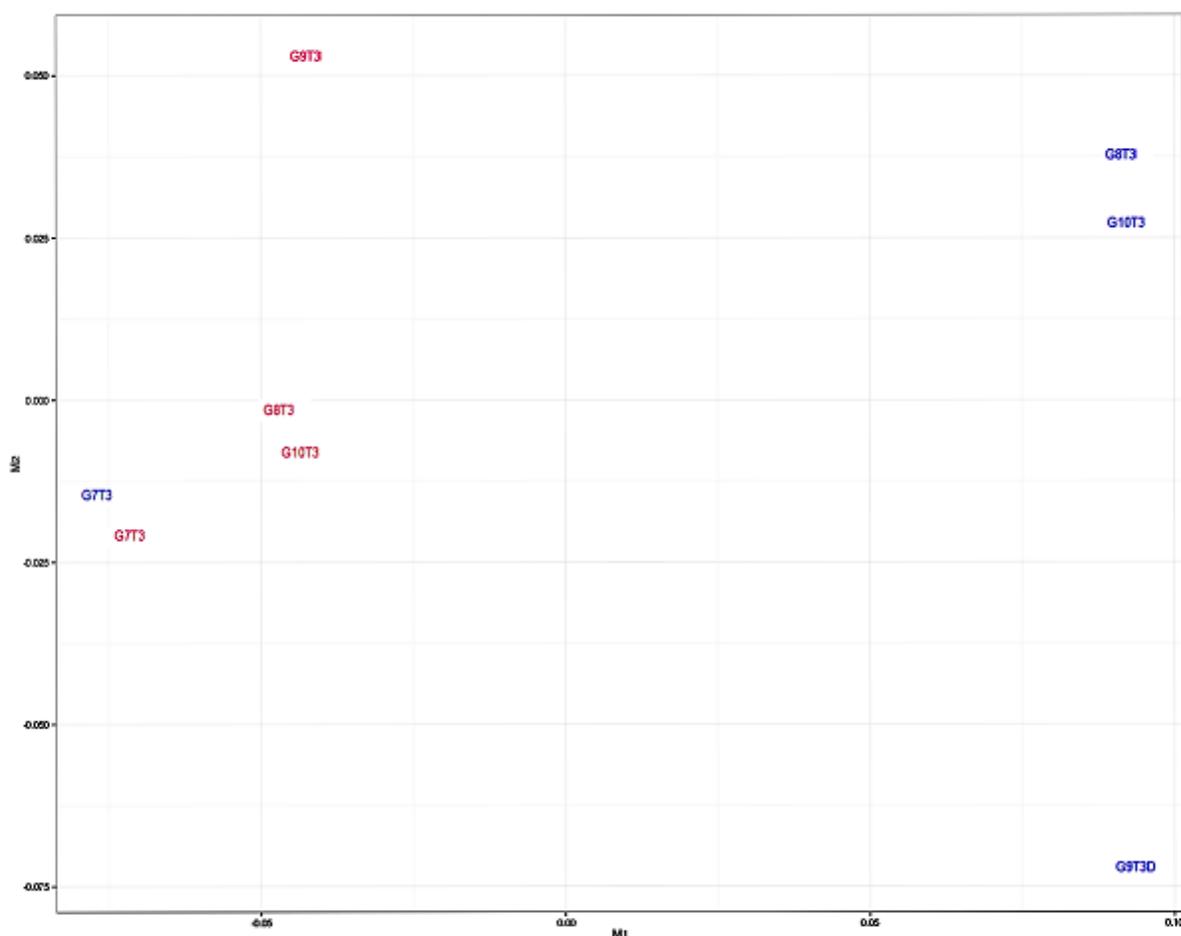


Figura 1 – Dispersão das amostras obtida por análise multivariada de escalonamento multidimensional. Identificação da amostra: G7 à G10 (número da amostra); T0 e T3 (tempo após a perfusão do tecido); Azul e Vermelha (Quarto do úbere controle e inoculado, respectivamente).

Foram encontradas 27.404 sequências expressas no tecido mamário, das quais 21.691 foram identificadas como genes e 5.821 como sequências expressas ainda não descritas, que foram denominadas “XLOC”. No genoma bovino, 26.453

genes estão anotados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=bos%20taurus>. Acesso em 07 de março de 2016). Os números de genes diferencialmente expressos encontrados de acordo com o método estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de genes diferencialmente expressos para os contrastes nos métodos computacionais estudados.

Contraste*	Métodos		
	edgeR	baySeq	Cuffdiff
Inoculado T0 x Controle T0	0	0	0
Inoculado T3 x Controle T3	1756	1161	3389

*T0 e T3: Tempos 0 e 3 horas após a perfusão do tecido, respectivamente.

O método frequentista, implementado pelo edgeR, utiliza estimativa de Bayes empírico e teste exato baseado em distribuição binomial negativa e foi desenvolvido para analisar experimentos com poucas repetições. Este é utilizado para ajustar a sobre dispersão ao redor de genes pelo uso da informação de outros genes (SMYTH; VERBYLA, 1996; ROBINSON; SMYTH, 2007; ROBINSON; SMYTH, 2008). A estratégia padrão implementada por esta metodologia converge estimativas de dispersão de genes em direção a uma estimativa comum (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010a) encontrando o máximo da função.

O método implementado no baySeq também assume distribuição de dados binomial negativa e estima probabilidades posteriores da expressão diferencial por métodos bayesianos empíricos em vez de níveis de significância (HARDCASTLE; KELLY, 2010), encontrando-se as distribuições dos parâmetros. Esse método é teoricamente mais restrito comparado com os demais, o que pode ser comprovado pelos resultados obtidos, dado que foi verificado um número menor de genes diferencialmente expressos para esta metodologia. Uma vantagem da metodologia bayesiana é que o resultado esperado em termos de número de genes significativamente expressos é ponderado pelas informações a priori.

O método implementado pelo Cuffdiff mede a expressão de um transcrito assumindo distribuição beta binomial negativa para os dados de contagem, sendo que a mudança nessa contagem é considerada para identificar genes diferencialmente expressos (TRAPNELL et al., 2013). Para controlar a variabilidade em profundidade do sequenciamento (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010), o

modelo de Poisson é o mais simples e estima a variabilidade por cálculo de contagem média entre réplicas (TRAPNELL et al., 2013).

Os métodos implementados por edgeR e Cuffdiff apresentam suporte para análise pareada dos fatores experimentais e para detecção de genes diferencialmente expressos sem amostras replicadas. Todavia, o baySeq não apresenta suporte para esses experimentos (RAPAPORT et al., 2013). BaySeq tem sua performance igual ao método edgeR para pequeno número de bibliotecas, já para um número maior de bibliotecas, baySeq demonstra melhora na performance sobre o edgeR (HARDCASTLE; KELLY, 2010).

Existem diferenças entre os resultados obtidos pelas metodologias utilizadas para diferencial de expressão gênica (Figura 2), sendo que apenas 122 genes identificados foram comuns aos três métodos. O método edgeR e baySeq são mais próximos na detecção de genes uma vez que 900 genes encontrados coincidem pelos dois métodos. Quando analisados os métodos edgeR e baySeq em relação ao método Cuffdiff, apenas 221 e 145 genes coincidem, respectivamente. Nenhum método é provável de ser ótimo para todas as circunstâncias, pois cada um tem suas particularidades. Assim, não podemos concluir que uma metodologia é mais eficiente do que as demais na detecção de genes, mas os três métodos demonstraram ser adequados para análise de genes diferencialmente expressos nos dados gerados nesse estudo.

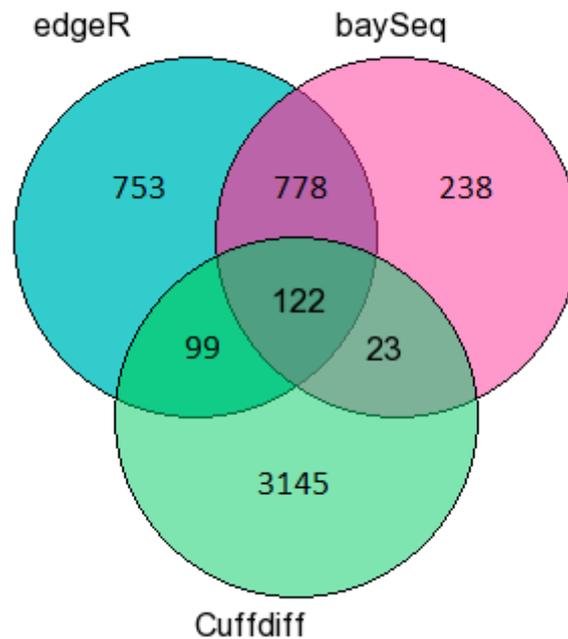


Figura 2 - Intersecção entre as quantidades de genes diferencialmente expressos reportados pelos três métodos computacionais (EdgeR, baySeq e Cuffdiff) por Diagrama de Venn.

Em estudo comparando métodos de diferencial de expressão de genes, o edgeR, que necessitou de tempo computacional intermediário, demonstrou-se pouco exigente reportando um número maior de genes falsos positivos e genes diferencialmente expressos verdadeiros em relação aos demais métodos (SONESON; DELORENZI, 2013). No mesmo estudo, o baySeq, com maior demanda de tempo computacional, apresentou bom desempenho no controle de falsos genes diferencialmente expressos (FDR) quando analisadas amostras maiores e na ausência de “outliers”, mas os resultados foram variáveis.

Rapaport et al. (2013) também visualizaram diferença na detecção de FDR comparando os métodos edgeR, baySeq e Cuffdiff. O método implementado pelo baySeq se apresentou mais conservador e com maior demanda de tempo computacional em comparação ao edgeR, porém ambos apresentaram baixo número de falsos positivos. O Cuffdiff apresentou especificidade reduzida, mostrando inflação na detecção de genes diferencialmente expressos. Esse caráter conservador do baySeq em comparação com o edgeR e Cuffdiff, bem como a

possível inflação na detecção de genes diferencialmente expressos pelo Cuffdiff pode ser observada nos resultados apresentados nesse estudo, dada a menor quantidade de genes diferencialmente expressos obtidos pelo método baySeq comparado aos demais (Tabela 2). Em contrapartida, Seyednasrollah, Laiho e Elo (2013), referem-se ao Cuffdiff como mais conservador quando comparado com os outros métodos, detectando menor número de falsos positivos.

Soneson e Delorenzi (2013), utilizando a tecnologia RNA-seq em dados sintéticos e os métodos implementados pelo edgeR e baySeq, reportaram 1.160 e 195 genes, respectivamente, corroborando novamente o caráter conservador do baySeq. Seyednasrollah, Laiho e Elo (2013), trabalhando com 4 repetições de dados reais e simulados de camundongos obtidos por RNA-seq, obtiveram em média 219 e 1.388 genes diferencialmente expressos, respectivamente, quando analisados pelo edgeR. Pelo baySeq, os autores reportaram 14 e 388 genes diferencialmente expressos para dados simulados e reais, e pelo método Cuffdiff2.1, um e 1.209 genes, respectivamente. Ainda com 4 repetições, mas com dados reais de humanos, as médias dos genes diferencialmente expressos pelos métodos baySeq, edgeR e Cuffdiff foram, 18, 54 e 149 genes, respectivamente. Maior número de genes diferencialmente expressos também foram detectados pelo método Cuffdiff, seguido pelo edgeR e baySeq no presente estudo.

Utilizando o método implementado pelo Cuffdiff, em dados de RNA-seq de glândula mamária de vacas holandesas com alta e baixa porcentagem de proteína e de gordura no leite, seis genes foram detectados pelo Cuffdiff (CUI et al., 2014), número bem menor do que o encontrado pelo mesmo método em outros experimentos. As metodologias utilizadas não podem ser comparadas, uma vez que são baseadas em parâmetros diferentes para execução, tendo assim resultados diferentes dependentes da caracterização experimental.

Foram identificados apenas 122 genes com expressão diferencial em comum pelos três métodos utilizados (Figura 2). Talvez utilizar apenas esses genes para continuação das análises poderia evitar o uso de possíveis genes falsos positivos, uma vez que seria obtido um suporte maior de que esses genes apresentaram real expressão diferencial no tecido mamário. No entanto, não pôde ser concluído que os genes que foram identificados por apenas um ou dois métodos são falsos positivos,

uma vez que dependendo do delineamento experimental, altera-se a eficácia dos métodos na detecção de genes. Assim, muitos genes de interesse seriam desconsiderados e o suporte estatístico nas análises de enriquecimento funcional seria perdido. A restrição causada pelo uso da intersecção dos resultados dos métodos não se mostrou interessante para realizar o enriquecimento funcional. Sugerimos estes 122 genes comuns aos três métodos computacionais sejam os eleitos para posterior validação, por meio de PCR em tempo real.

O total de 5.158 genes identificados com os três métodos foi comparado com o genoma bovino referência, encontrando 4.214 genes anotados, sendo que os 945 genes não encontrados concernem em sequências que foram expressas de forma diferenciada no tecido mamário infectado por *S. agalactiae*, mas que ainda não foram descritas. Os genes com função biológica anotada foram alocados em 25 grupos conforme seus processos celulares, de componente celular e função molecular (Tabela 3) e enriquecidos em 41 vias metabólicas (Apêndice B).

Tabela 3 - Anotação gênica funcional (Processo biológico, Componente celular ou Função molecular) e enriquecimento de termos do Gene Ontology (GO) dos genes diferencialmente expressos no tecido da glândula mamária na presença e ausência de infecção pelo patógeno *S. agalactiae*

Número de acesso	Termo	N*	P-value	Bonferroni	Benjamini
Processo Biológico					
GO:0045087	Resposta imune inata	45	5,70E-05	0,01	0,01
GO:0006954	Resposta inflamatória	42	5,00E-05	0,14	0,07
GO:0008284	Regulação positiva da proliferação celular	33	6,70E-04	0,87	0,50
GO:0042493	Resposta à droga	15	9,80E-04	0,95	0,53
GO:0019433	Catabolismo de triglicerídeos	7	1,40E-03	0,99	0,58
GO:0050729	Regulação positiva da resposta inflamatória	13	3,10E-03	1,00	0,79
GO:0006749	Metabolismo de glutationa	10	4,40E-03	1,00	0,86
GO:0007229	Via de sinalização mediada por integrina	10	4,40E-03	1,00	0,86
GO:0032760	Regulação positiva de produção do fator de necrose de tumor	10	4,40E-03	1,00	0,86
GO:0030199	Organização de fibrilas de colágeno	9	5,90E-03	1,00	0,90
GO:0007155	Adesão celular	34	6,90E-03	1,00	0,91
GO:0045766	Regulação positiva da angiogênese	13	7,70E-03	1,00	0,91
Componente Celular					
GO:0070062	Exossomo extracelular	232	4,50E-07	2,60E-04	2,60E-04
GO:0005578	Matriz extracelular proteica	36	7,50E-05	0,04	0,02
GO:0005615	Espaço extracelular	123	1,20E-04	0,06	0,02
GO:0001725	Fibras de estresse	10	2,20E-03	0,72	0,27
GO:0005886	Membrana plasmática	176	2,80E-03	0,80	0,28
GO:0005856	Citoesqueleto	37	3,70E-03	0,88	0,30
GO:0016021	Componente integral de membrana	299	4,10E-03	0,91	0,29
GO:0016324	Membrana plasmática apical	24	0,01	10,00	0,52
Função Molecular					
GO:0008201	Ligação à heparina	24	3,70E-04	0,33	0,33
GO:0042803	Atividade de homodimerização	64	1,60E-03	0,82	0,58
GO:0005201	Constituinte estrutural da matriz extracelular	9	3,00E-03	0,96	0,65
GO:0003779	Ligação à actina	33	3,90E-03	0,98	0,64
GO:0051015	Ligação aos filamentos de actina	16	9,10E-03	1,00	0,86

*número de genes diferencialmente expressos ($P \leq 0,01$)

Os processos obtidos pela anotação gênica funcional com interesse maior para o estudo em questão são os que envolvem resposta imune inata, resposta inflamatória, regulação positiva da proliferação celular, regulação positiva da resposta inflamatória, via de sinalização mediada por integrina, regulação positiva de

produção do fator de necrose de tumor, organização de fibrilas de colágeno e adesão celular (Tabela 3). Esses resultados estão relacionados à resposta inflamatória contra agentes patogênicos invasores, que se inicia com a ativação da resposta imune inata, possibilitando resposta adaptativa humoral subsequente (JUNO; KEYNAN; FOWKE, 2012). A defesa do hospedeiro contra microrganismos depende de interação entre as respostas imune inata e adaptativa sendo que, de imediato, infecções por bactérias desencadeiam a imunidade inata exigindo a ação de macrófagos, neutrófilos e células natural killer. A subsequente ativação da resposta imune adaptativa humoral durante a infecção persistente envolve linfócitos T CD4 que induzem resposta pró-inflamatória (MEDZHITOV; JANEWAY JR, 1998).

A limitação do sistema extracorpóreo em relação a não existência de aporte celular nas veias e artérias impede que a resposta imune humoral ocorra, uma vez que é dependente do recrutamento de células e imunoglobulinas sistêmicas. O modelo extracorpóreo permite apenas ação e recrutamento de células presentes no tecido e sinalização para recrutamento celular e processos sistêmicos, consequentes da resposta imune local. As células presentes no tecido por sua capacidade fagocitária tentam remover o patógeno permitindo o reparo da lesão.

Os receptores TLR (“Toll-like receptors”) são uma classe de receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos bacterianos pelas estruturas conservadas PAMP (“pathogen-associated molecular patterns”), sendo cruciais nesse reconhecimento e na construção da resposta imune inata e adquirida (RAINARD; RIOLLET, 2006; NETEA et al., 2004). O reconhecimento por TLR é patógeno-específico. O receptor TLR-2 (“Toll-like receptor 2”) agrupou-se no processo de resposta imune inata e teve sua expressão aumentada neste trabalho. Este é ligante para peptidoglicano e ácido lipoteicóico (LTA) de bactérias gram-positivas, como *S. agalactiae*. O receptor TLR-4 (“Toll-like receptor 4”) reconhece ácido lipoteicóico e lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (VAN AMERSFOORT; VAN BERKEL; KUIPER, 2003; RAINARD; RIOLLET, 2006; OVIEDO-BOYSO et al, 2007).

Goldammer et al. (2004) sugeriram que esses os genes TLR-2 e TLR-4 são regulados juntos no início da resposta imune no úbere, uma vez que o nível de expressão desses receptores foi aumentado em úberes infectados com

Staphylococcus aureus (bactéria gram-negativa) e por *S. agalactiae*. Fonseca et al. (2015) observaram em animais da raça Gir infectados com *S. agalactiae* o aumento gradual na expressão de TLR-2 e TLR-4 até 24 horas após a inoculação. No presente trabalho, observou-se maior nível de expressão do receptor TLR-2 em 3 horas após a inoculação de *S. agalactiae* em úberes extracorpóreos de animais mestiços Holandês-Zebu, mas o receptor TLR-4 não apresentou diferença de expressão. Isso pode ser indicativo de que a expressão do gene TLR-4 é mais tardia quando comparada a expressão do gene TLR-2 em tecido mamário infectado por *S. agalactiae*. Os receptores TLR são indispensáveis iniciadores da expressão de quimiocinas pró-inflamatórias necessárias para a quimiotaxia de leucócitos que irão destruir os patógenos invasores da mama bovina (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

Após o reconhecimento do patógeno, ocorre a sinalização o recrutamento e proliferação de células de defesa. SRF (“serum response factor”) é um fator de transcrição ainda não caracterizado em bovinos, mas em camundongos é essencial para indução de TGFB111 mediada por TGF- β , com papel na inibição da proliferação celular de músculo liso (WANG et al., 2011). Os genes TGHB111 e SRF tiveram sua expressão diminuída em nossos estudos, permitindo que ocorra a proliferação celular, como é esperado nessa fase da resposta imune.

O gene CD46 (“CD46 molecule”) é uma glicoproteína transmembranar que ancora células nucleadas, tais como granulócitos, linfócitos T, linfócitos B e células NK (WANG et al., 2014). A glicoproteína transita entre as respostas imune inata e adquirida, controlando a infecção por meio da ativação do sistema complemento e resposta celular mediada por linfócitos T (CATTANEO, 2004). Wang et al. (2014) sugerem que CD46 tem papel crítico no risco de mastite causada por *Streptococcus* em vacas leiteiras, por mecanismo de “splicing” alternativo, causado por uma mutação funcional no íntron 8. Em nossos resultados, o gene CD46 apresentou aumento da sua expressão, indicando seu importante papel no risco do desenvolvimento da mastite causada por *S. agalactiae*.

O gene TCIRG1 (“T-cell, immune regulator 1, ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3”) em humanos tem função central na ativação dos linfócitos T e, quando a expressão de sua proteína é inibida, ocorre a inibição de linfócitos Th1 (UTKU et al., 1998). Como o gene TCIRG1 apresentou expressão aumentada em

nossas análises, sugerimos que esse gene também apresenta função na sinalização para ativação da resposta Th1, durante a infecção por *S. agalactiae* em animais mestiços Holandês-Zebu.

O gene PTX3 (“pentraxin 3”) teve sua expressão aumentada em nossos resultados. Este gene tem papel descrito em camundongos, na ativação de um ciclo de amplificação humoral dependente de complemento da resposta inata, contra um agente microbiano (COTENA et al., 2007). Em humanos, esse gene contribui para evitar a ativação excessiva do sistema complemento, exercendo sua função no controle da inflamação causada pela lesão tecidual (DEBAN et al., 2008).

Foi observada a diminuição na expressão do gene CD40 (“CD40 molecule”), o qual codifica um receptor de proteína de membrana celular com papel na sinalização desencadeada por receptores TLR. Este resultado difere dos encontrados por Fonseca et al. (2015) e Estes et al. (1998), que observaram aumento da expressão desse gene em estudos “in vivo”. Fonseca et al. (2015) observaram o aumento da expressão de CD40 em até 24 horas após a inoculação de *S. agalactiae* em animais da raça Gir. CD40 é um coestimulador de linfócitos, pois interagindo com seu ligante desempenha importante papel na ativação e sobrevivência de linfócitos B, sendo que a proliferação de linfócitos B é iniciada por linfócitos T e mantida por linfócitos B (WYKES, 2003). Sugerimos que o aumento de sua expressão seja mais tardio, superando as 3 primeiras horas de infecção por *S. agalactiae*, ou, que o aumento da expressão desse gene seja dependente de células dendríticas, que são apresentadoras de antígeno aos linfócitos T e então, não é possível que ocorra no modelo utilizado neste trabalho. Ainda, outra possível explicação para expressão de CD40 estar diminuída é que este possa estar sendo alvo de algum regulador da bactéria, para burlar o sistema imune do hospedeiro.

Os receptores EFNA3 (“ephrin-A3”) e EFNA1 (“ephrin-A1”), que apresentaram expressão diminuída em nosso estudo, fazem parte da família dos Ephrins. Esses dois receptores podem ser utilizados para ativar todos os receptores EphA-A, que são importantes reguladores da adesão de linfócitos T. O aumento da expressão de ephrin-A3 aumenta a sensibilidade para adesão de células T (SHARFE et al., 2008). A interação entre receptores EphA tem papel na migração transendotelial de linfócitos T CD4 e sua correspondência na expressão de ephrin-A1, em células

endoteliais, sugere aumento da quimiotaxia (AASHEIM; DELABIE; FINNE, 2005). Esses genes parecem ser dependentes de algum outro componente possivelmente presente em células sanguíneas para então conseguir desencadear o aumento da quimiotaxia, uma vez que tem papel na migração de linfócitos T, as quais fazem parte da imunidade humoral e isso não ocorre no modelo de úbere extracorpóreo.

O gene ALOX5 (“arachidonate 5-lipoxygenase”), que catalisa o primeiro passo na biossíntese de leucotrienos, com papel anti-inflamatório e na resolução da inflamação (SERHAN, 2007; LEVY; VACHIER; SERHAN, 2012) teve sua expressão diminuída em nosso trabalho. Leucotrienos são mediadores lipídicos, derivados do ácido araquidônico, que iniciam e aumentam a resposta inflamatória tecidual, tanto inata quanto adaptativa, regulando a ativação e recrutamento de leucócitos (OTT et al., 2003; TAGER et al., 2003). A construção da resposta por meio dos leucotrienos inclui resposta a estímulos contra agentes bacterianos (MANDAL et al., 2008). Assim, sugerimos que o gene ALOX5 está envolvido na ativação da resposta inflamatória tecidual em resposta a bactéria *S. agalactiae* em tecido mamário de vacas mestiças Holandês-Zebu. Sua expressão diminuída pode ocorrer em resposta à algum mecanismo de defesa bacteriana. O possível aumento da expressão desse gene pode ser mais tardio e dependente de fatores sanguíneos não presentes em nosso cenário. Ainda que todos os fatores necessários para o aumento da sua expressão estivessem presentes, o período de 3 horas após infecção pode ser pequeno para a observação de recrutamento de leucócitos.

Como sabemos, a resposta inflamatória na presença de patógenos ativa processos apoptóticos como forma de controlar a infecção e eliminar o agente causador. O gene DRAM1 (“DNA damage regulated autophagy modulator 1”) em células de camundongos, promove disfunção mitocondrial pela acidificação lisossomal, fusão dos lisossomos com autofagossomos e apuramento de autofagosomos, ativando a autofagia (ZHANG et al., 2013). O gene INHBA (“inhibin beta A”) é ligante da superfamília de TGF- β (GADDY-KURTEN; TSUCHIDA; VALE, 1995) e, assim como o gene TGFB1 (“transforming growth factor beta 1”), tem função relatada em processos de apoptose induzidos pela alteração do nível desses genes em tecido mamário acometido com mastite, podendo ser importantes em processos que ocorrem durante a infecção, como proteção contra danos teciduais,

reparação e recuperação do tecido (SHEFFIELD, 1997), podendo evitar que a resposta inflamatória se prolongue e cause danos irreversíveis podendo afetar a capacidade de produção.

O gene TGFB111 (“transforming growth factor beta 1 induced transcript 1”) é da mesma família do gene TGFB1, para o qual Fonseca et al. (2015) observaram que os níveis de expressão se mantêm elevados até 24 horas após inoculação de *S. agalactiae* em animais da raça Gir, apresentando leve declínio nove horas após inoculação. Em nossas análises, os genes DRAM1, INHBA e TGFB111 tiveram sua expressão diminuída no tecido estudado. Sugerimos três possíveis causas para diminuição da expressão desses genes: (1) Como estes genes estão ligados a processos apoptóticos que ocorrem em fases mais avançadas da resposta imune, as primeiras 3 horas após inoculação de *S. agalactiae* são insuficientes para que esses genes tenham sua expressão aumentada; (2) Bactérias como *S. agalactiae* requerem recrutamento de anticorpos opsonizantes e neutrófilos do sangue durante aproximadamente 12 a 18 primeiras horas após a infecção, para então apurar a resposta imunológica no leite (BURTON; ERSKINE, 2003), ou seja não temos o substrato sanguíneo necessário para que ocorra esses mecanismos avançados de defesa; (3) Esses genes podem estar sendo alvo de reguladores bacterianos na tentativa da bactéria de impedir sua própria destruição.

As principais vias biológicas (Tabela 4) identificadas no presente estudo permitiram melhor caracterização da resposta imune no hospedeiro quando acometido pelo patógeno *S. agalactiae*. Muitas vias relacionadas a processos que dependem de aporte sanguíneo foram enriquecidas neste trabalho, isso não significa que esses processos estão ocorrendo neste tecido, uma vez que não temos o aporte sanguíneo celular necessário para isso. Essas vias podem estar sendo sinalizadas por células teciduais ou ainda, os genes com expressão diferencial no tecido são apenas pertencentes a essas vias e estão em número suficiente para dar aporte estatístico para análise de vias biológicas.

A matriz extracelular (ECM) consiste em macromoléculas estruturais e funcionais, relativamente estáveis com papel na modulação da morfogênese do tecido e do organismo e na manutenção da estrutura e função das células e tecidos. Assim, esta pode alterar atividades celulares específicas intimamente ligadas a

resposta imune do hospedeiro, como diferenciação, adesão, proliferação e migração celular. A via de interação ECM-receptor, que foi enriquecida com 41 genes em nosso estudo, foi encontrada por Lee et al. (2013) nos tecidos adiposo intramuscular, subcutâneo e visceral de bovinos, sendo que essa via apareceu também como uma sub-via de outras vias enriquecidas, como a via do câncer, que também foi enriquecida em nossos resultados. Gao et al. (2013) reportaram que a via de interação ECM-receptor é transcricionalmente regulada durante o início da lactação em vacas da raça Holandesa.

Tabela 4 - Principais KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) vias biológicas.

Termos	N*	P-value	Bonferroni	Benjamini
Adesão focal	80	1,10E-07	3,10E-05	1,60E-05
Interação ECM-receptor	41	6,10E-07	1,70E-04	3,50E-05
Cascatas de coagulação e do complemento	34	1,30E-05	3,70E-03	5,30E-04
Via de sinalização PI3K-Akt	109	4,30E-05	1,20E-02	1,00E-03
Migração transendotelial de leucócitos	46	6,70E-05	1,90E-02	1,40E-03
Via de sinalização Wnt	50	1,30E-04	3,80E-02	2,00E-03
Fagossomo	57	1,40E-04	3,90E-02	2,00E-03
Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	25	2,90E-04	8,00E-02	3,90E-03
Moléculas de adesão celular (CAMs)	52	9,90E-04	0,25	1,00E-02
Via de sinalização PPAR	28	1,30E-03	0,31	1,30E-02
Interação receptor de citocina-citocina	69	9,60E-03	0,94	6,50E-02

*número de genes diferencialmente expressos presentes na via metabólica

Quando ocorre algum estímulo, tanto externo quando interno, as células do sistema imune são ativadas por sinais de quimiocinas e migram por células endoteliais e tecidos até os locais de inflamação ou infecção para executar a defesa do hospedeiro. O ponto que controla a resposta imune é a interação de adesão de células imune com o endotélio, componentes da matriz extracelular e células teciduais. Sinais de migração mediados por receptor de adesão celular devem afluir para pontos intracelulares comuns para envolver a maquinaria de migração celular (HAUCK et al., 2000; HUANG et al., 2014). A via de adesão focal neste trabalho foi enriquecida por 80 genes.

As citocinas são polipeptídeos que medeiam reações imunológicas em resposta a antígenos, pela diferenciação de linfócitos e ativação de células efetoras. Os macrófagos residentes no tecido infectado liberam citocinas inflamatórias, sendo

as interleucinas, citocinas produzidas por leucócitos e que atuam também em leucócitos. O papel das citocinas é bem conhecido na resposta imune contra agentes infecciosos (RAMBEAUD et al., 2003; LAD et al., 2005; GRIESBECK-ZILCH et al., 2009), mas sua expressão é patógeno-dependente (LEE et al., 2006; LAHOUASSA et al., 2007; GUTIÉRREZ-BARROSO et al., 2008). A via de interação receptor citocina-citocina foi identificada significativamente ($P \leq 0,01$) em nossos dados com 69 genes. Tiezzi et al. (2015), em estudos de GWAS em animais da raça Holandesa com mastite clínica no primeiro parto, também identificaram essa via contendo os genes do hormônio do crescimento (GHR) e interleucina 7 (IL7). Também encontramos o gene GHR nesta via e 14 tipos de interleucinas, dentre as quais IL8, IL18 e IL34. Buitenhuis et al. (2011), analisando genes e vias da glândula mamária afetada com mastite por *E. coli* também encontraram a expressão dessa via alterada. Nosso trabalho parece ser o primeiro a identificar a via de interação citocina-citocina com expressão alterada em úbere extracorpóreo de animais mestiços Holandês-Zebu infectado por *S. agalactiae*.

A via de migração transendotelial de leucócitos foi enriquecida por 46 genes em nosso estudo com mastite induzida por *S. agalactiae*. Buitenhuis et al. (2011) encontraram aumento da expressão de genes regulando esta via em tecido mamário acometido com mastite induzida por *E. coli*. Esses genes são mediadores da resposta imune de fase aguda local contra *E. coli*, sugerindo que esses genes também sejam mediadores da resposta imune local contra *S. agalactiae*.

A via de sinalização Wnt (“Wingless”), significativamente ($P \leq 0,01$) expressa em nossos resultados por 50 genes, tem papel essencial em processos celulares e biológicos em mamíferos. A transdução de sinais Wnt tem sido aplicada na inflamação, imunidade inata e homeostase via receptores TLR (UMAR et al., 2009; SUN et al., 2005; DUAN et al., 2007; ADJEI-FREMAH et al., 2016). Noyes et al. (2011) identificaram genes candidatos na via de sinalização Wnt em resposta a infecção por *Trypanosoma congolense* em fígado, rim e linfonodos bovinos.

A família de moléculas de sinalização Wnt regula vários processos no desenvolvimento animal, como estimulação da mitose para diferenciação celular e adesão celular diferencial (NUSSE, 2005). Wnts se ligam a receptores Frizzled e induzem a oligomerização dos co-receptores de lipoproteína de baixa densidade,

para ativar a transcrição, promovendo proliferação celular durante a mitose (KALDIS; PAGANO, 2009). Em adição, moléculas Wnt são indutoras da transição de células epiteliais para células mesenquimais durante o desenvolvimento mamário (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010). Sugerimos que, em glândula mamária de animais mestiços Holandês-Zebu induzida experimentalmente por *S. agalactiae*, a via de sinalização Wnt está envolvida na inflamação e resposta imune inata proliferando células do sistema imune e na posterior retomada da homeostase.

Diversas vias de sinalização são requeridas de forma ordenada para defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. Essas vias são ativadas pelo reconhecimento do agente microbiano pelo sistema imune inato e ativação de cascatas inflamatórias, tais quais a cascata complemento e de coagulação, que envolvem o recrutamento de células leucocitárias para o local da inflamação, bem como ativação de mecanismos antimicrobianos efetores e posteriormente a indução da resposta imune adaptativa (BRODSKY; MEDZHITOV, 2009; OIKONOMOPOULOU et al., 2012).

Muitos componentes da cascata complemento e de coagulação são alterados em vacas em lactação submetidas a estresse por calor quando comparado com vacas controle (MIN et al., 2016). A via de cascatas de coagulação e complemento que foi enriquecida por 34 genes no presente estudo, também foi enriquecida no trabalho de Huang et al. (2014), associada com proteínas expressas em tecido mamário de vacas com mastite clínica causada pela infecção natural por *S. aureus*. Encontramos nessa via 10 componentes de complemento, incluindo C3 e C4, receptores bradykinin (BDKRB1 e BDKRB2) e o inibidor A5 (SERPINA5). Tiezzi et al. (2015), em um estudo de associação genômica ampla (GWAS) para mastite clínica no primeiro parto de vacas holandesas, identificaram essa via utilizando o DAVID, contendo os componentes de complemento C6, C7 e C9, bem como o receptor bradykinin e inibidores “serin peptidase” (SERPINA1 e SERPINA5). Altos níveis de bradykinin são associados com mastite causada por *S. aureus* em vacas Holandesa em lactação (ESHRAHGI et al., 1999). Os processos finais dessa via que envolvem os genes pelos quais esta foi enriquecida são degranulação, quimiotaxia e fagocitose, que são necessários para dar continuidade ao recrutamento de células de defesa e início do processo de fagocitose, para combater o agente patogênico.

A via de sinalização PI3K-Akt foi enriquecida significativamente ($P \leq 0,01$) em nossas análises por 109 genes. Os receptores TLR (“Toll-like receptors”) e a via de adesão focal, enriquecidas nesse trabalho podem ser reguladores da via PI3K-Akt, que termina em processos de apoptose celular. Essa via é importante na regulação da resposta inflamatória por meio da fagocitose (DEANE; FRUMAN, 2004; UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Vários estudos têm relatado a ativação da via PI3K-Akt por diferentes bactérias ou fatores de virulência de bactérias (BEUREL et al., 2010; COSSART; ROY, 2010) como *Helicobacter pylori* (ALLEN et al., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (KIERBEL et al., 2005), *Legionella pneumophila* (TACHADO et al., 2008) e *S. aureus* (OVIEDO-BOYSO et al., 2011). Nosso estudo documenta a expressão da via PI3K-Akt também em úbere extracorpóreo inoculado experimentalmente por *S. agalactiae*.

A capacidade fagocitária dos neutrófilos é estimulada pelos receptores TLR, que mantêm o patógeno dentro de fagossomos, que são vacúolos que se formam durante o processo de fagocitose. A fusão de fagossomos e lisossomos degrada bactérias em fragmentos pela liberação de toxinas. A via fagossomal foi significativamente ($P \leq 0,01$) enriquecida em nossos resultados por 57 genes, dos quais 4 genes são do tipo BoLA (antígeno leucocitário bovino) classe I e 12 genes do tipo BoLA classe II, os quais pertencem ao MHC (Complexo principal de histocompatibilidade bovina). Moléculas MHC de classe II apresentam peptídeos exógenos ou extracelulares para as células T CD4+ (MORSE, 2012; BROWN, 2002). Células do sistema imune sinalizam para ativação da imunidade inata e adaptativa, por fragmentos de proteínas ligadas a moléculas MHC classe II, que então são reconhecidas pelo sistema de linfócitos T CD4. As células imunitárias produzem toxinas que são embaladas em lisossomos e então liberadas no alvo (WATTS, 2012).

Os genes do complexo BoLA estão associados à susceptibilidade a mastite (PARK, 2004; KELM, 1997; LUNDÉN, 1990), que aparece geralmente associada com haplótipos MHC que tem somente um único conjunto de genes DQ (PARK, 2004; LUNDÉN, 1990). Os genes BoLA-DR conferem susceptibilidade a mastite (KELM, 1997) causada por *Staphylococcus spp* (SHARIF, 2000).

Há uma relação entre a elevada contagem de células somáticas refletindo no aumento da probabilidade de ocorrência de mastite e o alelo DRB3.2 do complexo BoLA (PASHMI, 2009) em vacas Holandesas. Efeitos de substituição do alelo DRB3*54 do complexo BoLA estão associados com a redução na produção de gordura e proteína do leite. O rendimento menor de proteína no leite também está associado ao alelo DRB3*6, enquanto que a presença do alelo DRB3*7 tem efeito positivo sobre a produção de proteína em animais da raça Gir (NASCIMENTO et al., 2006).

A “PPAR signaling pathway” significativamente ($P \leq 0,01$) enriquecida em nosso estudo com 28 genes, atua na regulação do desenvolvimento do tecido adiposo, diferenciação e ativação da lipogênese e metabolismo de lipídios em músculo esquelético (EHRENBORG; KROOK, 2009, CÁNOVAS et al., 2010) em diferentes espécies. Os receptores de peroxissomo ativados pelo proliferador (PPARs) são receptores nucleares dependentes de ligantes de uma família de fatores de transcrição com três membros, PPAR α , PPAR β e PPAR γ , que podem controlar um grande número de funções, principalmente o metabolismo de lipídeos. PPAR α tem participação na inflamação; PPAR β na implantação do embrião, regulação da proliferação celular e cicatrização de feridas; e PPAR γ na maturação de macrófagos e controle da inflamação em ratos, camundongos e humanos e parece controlar a síntese da gordura do leite em vacas lactantes (BIONAZ et al., 2013; ABBOTT, 2009).

O papel funcional dos PPARs é bem conhecido em monogástricos e pode variar em ruminantes, mas, como em monogástricos, os isotipos PPAR controlam a expressão de genes envolvidos na resposta anti-inflamatória, desenvolvimento e crescimento (BIONAZ et al., 2013). Moyes et al. (2009) relataram a ativação da proliferação celular e inibição concomitante da sinalização de PPAR γ como um mecanismo de relação negativa entre resposta imune inata e metabolismo de lipídeos em tecido mamário de bovino desafiado com *Streptococcus uberis*, levando a ativação de vias pró-inflamatórias associadas com acentuada inibição da síntese de lipídeos e sinalização por PPAR γ . Este último efeito pode ser uma explicação da inversa relação entre resposta imune e síntese de gordura do leite. Posteriormente, utilizando a tecnologia RNA-seq, Moyes et al. (2016) estudaram a resposta biológica

e a relação entre fígado e glândula mamária de vacas durante a primeira lactação desafiadas por *E. coli* e identificaram somente a via de sinalização PPAR enriquecida, corroborando os estudos anteriores em relação ao papel dessa via no decréscimo da síntese de gordura do leite devido a infecção por *E. coli*. PPAR α é o isotipo mais abundante de PPAR no fígado e o aumento da sua ativação durante a resposta a infecção intramamária é esperado devido o papel anti-inflamatório das PPARs via aumento do catabolismo de ácido aracdônico e modulação da resposta de fase aguda no fígado pela transrepressão de fatores inflamatórios de transcrição (VARGA et al., 2011)

A descrição do papel dos receptores PPAR está mais avançada em outras espécies. PPAR β em camundongos é ativado em diferentes células, como macrófagos, que após lesão tecidual, são regulados para promover a remoção de células apoptóticas pelo aumento de moléculas ligadas à fagocitose e para diminuir a expressão de TNF- α , que atua como quimiorreceptor, recrutando macrófagos e melhorando a reparação tecidual e atenuando a infecção (CHEN et al., 2015; TAN et al., 2004; LEE et al., 2003). Durante a reparação de feridas, envolvendo PPAR, fatores de crescimento e citocinas são secretados ativando numerosas cascatas de sinalização tais como o TGF α , que é produzido durante o processo de reparação de feridas (TAN et al., 2004).

Sugerimos que a expressão das vias fagossomal, Wnt, e PI3K-Akt, têm função na resposta inflamatória celular, regulando processos apoptóticos, como resposta à mastite induzida por *S. agalactiae* em animais mestiços Holandês-Zebu.

Na tentativa de impedir a destruição pelo sistema imune, os microrganismos possuem mecanismos capazes de manipular a resposta imune do hospedeiro. Em bactérias, como *S. aureus*, uma toxina alfa é inserida na membrana celular da célula alvo do hospedeiro, tornando-a permeável a íons (WEINRAUCH; ZYCHLINSKY, 1999) e desencadeando a morte celular programada (BAYLES et al., 1998). Os fatores de virulência de *S. aureus* capacitam esse microrganismo para manipular as respostas imune inata e adaptativa do hospedeiro, por meio da inibição da ativação do sistema complemento, bloqueio e destruição de células fagocíticas e modificando a resposta dos linfócitos B e T (THAMMAVONGSA et al., 2015). A via de infecção por *S. aureus* foi enriquecida por 25 genes em nossos resultados. Como já descrito,

a resposta imune contra agentes bacterianos causadores de mastite é patógeno-específica (GÜNTHER et al., 2011), bem como os mecanismos do patógeno para resistência a infecção (WEINRAUCH; ZYCHLINSKY, 1999). No entanto, a resistência à resposta imune do hospedeiro por *S. aureus* e *S. agalactiae*, aparentemente apresenta mecanismos de resistência em comum.

4. Conclusão

O presente estudo é um importante passo para o entendimento das bases genéticas da ocorrência de mastite em úbere extracorpóreo de bovinos leiteiros mestiços Holandês-Zebu infectados experimentalmente por *S. agalactiae*. O perfil de genes diferencialmente expressos em amostras afetadas está associado com a diferenciação, proliferação, migração e apoptose celular, tendo importante papel no local da inflamação por células do sistema imune, além de ativar vias de sinalização e relacionadas ao sistema imune que são importantes nas primeiras três horas de infecção.

Foram identificados apenas 122 genes com expressão diferencial em comum pelos três métodos utilizados. A restrição causada pelo uso da intersecção dos resultados dos métodos não se mostrou interessante para realizar o enriquecimento funcional, pois muitos genes de interesse são desconsiderados e perde-se suporte estatístico nas análises de enriquecimento funcional. Assim, o ideal pode ser a utilização dos resultados de um dos métodos ou a união dos resultados dos três métodos.

Futuros estudos utilizando PCR em tempo real são sugeridos para confirmação desses genes como participantes do desenvolvimento dessa patologia, e associação genômica (GWAS) para identificar potenciais genes como fatores principais na participação de *S. agalactiae* na ocorrência de mastite em animais mestiços Holandês-Zebu.

5. Referências Bibliográficas

AASHEIM, H. C.; DELABIE, J.; FINNE, E. F. Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2869–2876, 2005.

ABBOTT, B. D. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α), beta (PPAR β), and gamma (PPAR γ) in rodent and human development. **Reproductive Toxicology**, v. 27, p. 246-257, 2009.

ADJEI-FREMAH, S.; ASIAMA, E. K.; EKWEMALOR, K.; JACKAI, L.; KEITH, S.; WORKU, M. Modulation of Bovine Wnt Signaling Pathway Genes by Cowpea Phenolic Extract. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 3, p. 21-35, 2016.

AFGAN, ENIS; BAKER, DANNON; VAN DEN BEEK, MARIUS; BLANKENBERG, DANIEL; BOUVIER, DAVE; ČECH, MARTIN; CHILTON, JOHN; CLEMENTS, DAVE; CORAOR, NATE; EBERHARD, CARL; GRÜNING, BJÖRN; GUERLER, AYSAM; HILLMAN-JACKSON, JENNIFER; VON KUSTER, GREG; RASCHE, ERIC; SORANZO, NICOLA; TURAGA, NITESH; TAYLOR, JAMES; NEKRUTENKO, ANTON; GOECKS, ANDJEREMY. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. **Nucleic Acids Research**, 2016. Doi: 10.1093/nar/gkw343.

ALLEN, L. H.; ALLGOOD, J. A.; HAN, X.; WITTINE, L. M. Phosphoinositide 3-kinase regulates actin polymerization during delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 220-230, 2005.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. R106, 2010.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 1-4, 2014.

Associação Brasileira da Raça Girolando. **Performance**. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>>. Acesso em: 21/03/2016 às 8:19hs.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, p. 463-472, 2004a.

BANNERMAN, D.; PAAPE, M. J.; GOFF, P. P.; KIMURA, K.; LIPPOLIS, J. D.; HOPE, J. C. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary Research**, v. 35, p. 681-700, 2004b.

BAYLES, K. W.; WESSON, C. A.; LIOU, L. E.; FOX, L. K.; BOHACH, G. A.; TRUMBLE, W. R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 336-342, 1998.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BEUREL, E.; MICHALEK, S. M.; JOPE, R. S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). **Trends in Immunology**, v. 31, p. 24-31, 2010.

BIONAZ, M.; CHEN, S.; KHAN, M. J.; LOOR, J. J. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. **PPAR Research**, v. 2013, article ID. 684159, p. 28, 2013.

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis Some new ideas for an old disease. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 19, p. 1-45, 2003

BRODSKY, I. E.; MEDZHITOV, R. Targeting of immune signaling networks by bacterial pathogens. **Nature Cell Biology**, v. 11, p. 521-527, 2009.

BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K. A.; MACMILLAN, H.; LEWIN, H. A.; PALMER, G. H. Major Histocompatibility Complex Class II DR-Restricted Memory CD4⁺ T Lymphocytes Recognize Conserved Immunodominant Epitopes of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5521-5532, 2002.

BUITENHUIS, B.; RØNTVED, C. M.; EDWARDS S. M.; INGVARTSEN, K. L.; SØRENSEN, P. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. **BMC Genomics**, v. 12, n. 130, 2011.

CÁNOVAS, A.; QUINTANILLA, R.; AMILLS, M.; PENA, R. N. Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. **BMC Genomics**, v. 11, n. 372, 2010.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.

CATTANEO, R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. **Journal of Virology**, v. 78, n. 9, p. 4385-4388, 2004.

CHEN, H.; SHI, R.; LUO, B.; YANG, X.; QIU, L.; XIONG, J.; JIANG, M.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; WU, Y. Macrophage peroxisome proliferator-activated receptor γ deficiency delays skin wound healing through impairing apoptotic cell clearance in mice. **Cell Death & Disease**, v. 6, 2015.

COSSART, P.; ROY, C. R. Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 547-554, 2010.

COTENA, A.; MAINA, V.; SIRONI, M.; BOTTAZZI, B.; JEANNIN, P.; VECCHI, V.; CORVAIA, N.; DAHA, M. R.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 6311–6317, 2007.

CUI, X.; HOU, Y.; YANG, S.; XIE, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; LU, X.; LIU, G. E.; SUN, D. Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 226, 2014.

DEANE, J. A.; FRUMAN, D. A. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 563-598, 2004.

DEBAN, L.; JARVA, H.; LEHTINEN, M. J.; BOTTAZZI, B.; BASTONE, A.; DONI, A.; JOKIRANTA, T. S.; MANTOVANI, A.; MERI, S. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8433-8440, 2008.

DUAN, Y.; LIAO, A. P.; KUPPIREDDI, S.; YE, Z.; CIANCIO, M. J.; SUN, J. β -Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 6, p. 613-624, 2007.

EHINGER, A. M.; KIETZMANN, M. Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 303-310, 2000b.

EHINGER, A. M.; KIETZMANN, M. Tissue Distribution of Oxacillin and Ampicillin in the Isolated. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 157-168, 2000a.

EHRENBORG, E. W. A.; KROOK, A. Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 373-393, 2009.

ESHKAGHI, H. R.; ZEITLIN, I. J.; FITZPATRICK, J. L.; TEMENT, H.; LOGUE, D. The release of bradykinin in bovine mastitis. **Life Science**, v. 64, n. 18, p. 1675-1687, 1999.

ESTES, D. M.; TUO, W.; BROWN, W. C.; GOIN, J. Effects of type I/type II interferons and transforming growth factor- β on B-cell differentiation and proliferation. Definition of costimulation and cytokine requirements for immunoglobulin synthesis and expression. **Immunology**, v. 95, p. 604-611, 1998.

FILHO, 2015. Tudo sobre a raça girolando na pecuária leiteira. **Entrevista**. Disponível em: <<http://iepec.com/tudo-sobre-a-raca-girolando-na-pecuaria-leiteira/>>. Acesso em: 21/03/2016 às 8:17hs.

FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; WELLER, M. M. D. C. A.; SOUSA, K. R. S.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S. E. F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 776-781, 2009.

FONSECA, I.; ANTUNES, G. R.; PAIVA, D. S.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, S. E. F.; MARTINS, M. F. Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreed dairy cows. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1295-1303, 2011.

FONSECA, I.; CARDOSO, F. F.; HIGA, R. H.; GIACHETTO, P. F.; BRANDÃO, H. M.; BRITO, M. A. V. P.; FERREIRA, M. B. D.; 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. 80, p. 47-57, 2015.

GADDY-KURTEN, D.; TSUCHIDA, K.; VALE, W. Activins and the receptor serine kinase superfamily. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 50, p. 109-129, 1995.

GAO, Y.; LIN, X.; SHI, K.; YAN, Z.; WANG, Z. Bovine mammary gene expression profiling during the onset of lactation. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70393, 2013.

GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A.; SCHUBERTH, H.-J.; BRUNNER, R. M.; KATA, S. R.; SEYFERT, H. -M. Mastitis Increases Mammary mRNA Abundance of β -Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2), and TLR4 but Not TLR9 in Cattle. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 1, p. 174-185, 2004.

GRIESBECK-ZILCH, B.; OSMAN, M.; KÜHN, C.; SCHWERIN, M.; BRUCKMAIER, R. H.; PFAFFL, M. W.; HAMMERLE-FICKINGER, A.; MEYER, H. H.; WELLNITZ, O. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. **Journal Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4621-4633, 2009.

GÜNTHER, J.; KOCZAN, D.; YANG, W.; NURNBERG, G.; REPSILBER, D.; SCHUBERTH, H. J.; PARK, Z.; MAQBOOL, N.; MOLENAAR, A.; SEYFERT, H. M. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 40, p. 31-39, 2009.

GÜNTHER, J.; SHUZHEN, L.; ESCH, K.; SCHUBERTH, H. J.; SEYFERT, H. M. Stimulated ex-pression of TNF- α and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. **Veterinary immunology and pathology**, v. 135, p. 152-157, 2010.

GÜNTHER, J.; ESCH, K.; POSCHADEL, N.; PETZL, W.; ZERBE, H.; MITTERHUEMER, S.; BLUM, H.; SEYFERT, H-M. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor Alpha. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 695–707, 2011.

GUTIÉRREZ-BARROSO, A.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; LARA-ZÁRATE, L.; LOEZALARA, P. D.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; OCHOA-ZARZOSA, A. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 121, p. 113-122, 2008.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BADIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. Análise multivariada de dados. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688p.

HARDCASTLE, T. J.; KELLY, K. A. baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 422, 2010.

HAUCK, C. R.; KLINGBEIL, C. K.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for directed cell migration. **Immunologic Research**, v. 21, p. 293-303, 2000.

HUANG D. W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature Protocol**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009a.

HUANG, D.W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2009b.

HUANG, J.; LUO, G.; ZHANG, Z.; WANG, X.; JU, Z.; QI, C.; ZHANG, Y.; WANG, C.; LI, R.; LI, J.; YIN, W.; XU, Y.; MOISÁ, S. J.; LOOR, J. J.; ZHONG, J. iTRAQ-proteomics and bioinformatics analyses of mammary tissue from cows with clinical mastitis due to natural infection with *Staphylococci aureus*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 839, 2014.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LEE, J. W.; IBEAGHA, A. E.; BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; ZHAO, X. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, v. 39, n. 11, 2008.

JUNO, J. A.; KEYNAN, Y.; FOWKE, K. R. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, 2012.

KALDIS, P.; PAGANO, M. Wnt Signaling in Mitosis. **Developmental Cell**, v. 17, n. 6, p. 749-750, 2009.

KIERBEL, A.; GASSAMA-DIAGNE, A.; MOSTOV, K.; ENGEL, J. N. The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 2577-2585, 2005.

KIETZMANN, M.; LOSCHER, W.; ARENS, D.; MAAß, P.; LUBACH, D. The Isolated Perfused Bovine Udder as an in vitro Model of Percutaneous Drug Absorption Skin Viability and Percutaneous Absorption of Dexamethasone, Benzoyl Peroxide, and Etofenamate. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 30, n. 2, p. 75-84, 1993.

KELM, S. C.; DETILLEUX, J. C.; FREEMAN, A. E.; KEHRLI JR, M. E.; DIETZ, A. B.; FOX, L. K.; BUTLER, J. E.; KASCKOVICS, I.; KELLEY, D. H. Genetic Association Between Parameters of Innate Immunity and Measures of Mastitis in Periparturient Holstein Cattle. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 1767-1775, 1997.

LAD, S. P.; FUKUDA, E. Y.; LI, J.; MAZA, L. M. D. L.; LI, E. Up-Regulation of the JAK/STAT1 Signal Pathway during *Chlamydia trachomatis* Infection. **Journal Immunology**, v. 174, p. 7186-7193, 2005.

LAHOUASSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Cytokine**, v. 38, n. 1, p. 12-21, 2007.

LEE, C.; CHAWLA, A.; URBIZTONDO, N.; LIAO, D.; BOISVERT, W. A.; EVANS, R. M. Transcriptional Repression of Atherogenic Inflammation: Modulation by PPAR. **Science**, v. 302, p. 453-457, 2003.

LEE, J. W.; BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; HUANG, M-K.; ZHAO, X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. **Veterinary Research**, v. 37, p. 219-229, 2006.

LEE, H. J.; JANG, M.; KIM, H.; KWAK, W.; PARK, W.; HWANG, J. Y.; LEE, C-K.; JANG, G. W.; PARK, M. N.; KIM, H-C.; JEONG, J. Y.; SEO, K. S.; KIM, H.; CHO, S.; LEE, B-Y. Comparative Transcriptome Analysis of Adipose Tissues Reveals that ECM-Receptor Interaction Is Involved in the Depot-Specific Adipogenesis in Cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

LEVY, B. D.; VACHIER, I.; SERHAN, C. Resolution of Inflammation in Asthma. **Clinics in Chest Medicine**, v. 33, n. 3, p. 559-570, 2012.

LIU, J. S.; LOGVINENKO, T. Bayesian Methods in Biological Sequence Analysis. **Handbook of Statistical Genetics**, p. 66-93, 2003.

LIU, Y-Q.; SONG, G-X.; LIU, H-L.; WANG, X-J.; SHEN, Y-H.; ZHOU, L-J.; JIN, J.; LIU2, M.; SHI, C-M.; QIAN, L-M. Silencing of FABP3 leads to apoptosis-induced mitochondrial dysfunction and stimulates Wnt signaling in zebrafish. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, p. 806-812, 2013.

LUNDÉN, A.; SIGURDARDÓTTIR, S.; EDFORS-LILJA, I.; DANELL, B.; RENDEL, J.; ANDERSSON, L. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. **Animal Genetics**, v. 21, n. 3, p. 221-232, 1990.

LUTZOW, Y.; DONALDSON, L.; GRAY, C.; VUOCOLO, T.; PEARSON, R.; REVERTER, A.; BYRNE, K.; SHEEHY, P.; WINDON, R.; TELLAM, R. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 18-25, 2008.

MANDAL, A. K.; JONES, P. B.; BAIR, A. M.; CHRISTMAS, P.; MILLER, D.; YAMIN, T-T. D.; WISNIEWSKI, D.; MENKE, J.; EVANS, J. F.; HYMAN, B. T.; BACSKAI, B.; CHEN, M.; LEE, D. M.; NIKOLIC, B.; SOBERMAN, R. J. The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis. **PNAS**, v. 105, n. 51, p. 20434-20439, 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. A. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **Seminars in Immunology**, v. 10, n. si980136, p. 351-353, 1998.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, p. 117-134, 2010.

MIN, L.; CHENG, J.; ZHAO, S.; TIAN, H.; ZHANG, Y.; LI, S.; YANG, H.; ZHENG, N.; WANG, J. Plasma-based proteomics reveals immune response, complement and coagulation cascades pathway shifts in heat-stressed lactating dairy cows. **Journal of Proteomics**, Jun 14. pii: S1874-3919(16)30249-4. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.008. [Epub ahead of print], 2016.

MORSE, K.; NORIMINE, J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. Breadth of the CD4+ T-cell response to *Anaplasma marginale* VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 and MHC class II DR and DQ restriction elements. **Immunogenetics**, v. 64, n. 7, p. 507-523, 2012.

MOYES, K. M.; DRACKLEY, J. K.; MORIN, D. E.; BIONAZ, M.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; EVERTS, R. E.; LEWIN, H. A.; LOOR, J. J. Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPARgamma signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. **BMC Genomics**, v. 10, n. 542, 2009.

MOYES, K. M.; SØRENSEN, P.; BIONAZ, M. The Impact of Intramammary *Escherichia coli* Challenge on Liver and Mammary Transcriptome and Cross-Talk in Dairy Cows during Early Lactation using RNAseq. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157480, 2016.

NASCIMENTO, C. S.; MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; GUIMARÃES, M. F. M.; CAMPOS, A. L.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; OLIVEIRA, D. A. A. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 641-647, 2006.

NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G.; WESTGARTH, D. R. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 5, p. 696-707, 1969.

NETEA, M. G.; GRAAF, C. V. D.; MEER, J. W. M. V. D.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal Leukocyte Biology**, v. 75, p. 749-755, 2004.

NOYES, H.; BRASS, A.; OBARA, I.; ANDERSON, S.; ARCHIBALD, A. L.; BRADLEY, D. G.; FISHER, P.; FREEMAN, A.; GIBSON, J.; GICHERU, M.; HALL, L.; HANOTTE, O.; HULME, H.; MCKEEVER, D.; MURRAY, C.; OH, S. J.; TATE, C.; SMITH, K.; TAPIO, M.; WAMBUGU, J.; WILLIAMS, D. J.; AGABA, M.; KEMP, S. J. Genetic and expression analysis of cattle identifies candidate genes in pathways responding to *Trypanosoma congolense* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 22, p. 9304-9309, 2011.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 28-32, 2005.

OIKONOMOPOULOU, K.; RICKLIN, D.; WARD, P. A.; LAMBRIS, J. D. Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 151-165, 2012.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome biology**, v. 11, n. 12, p. 220, 2010.

OTT, V. L.; CAMBIER, J. C.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; SWANSON, B. J. Mast cell – dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B₄. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 974-981, 2003.

OVIEDO-BOYSSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.

OVIEDO-BOYSSO, J.; CORTÉS-VIEYRA, R.; HUANTE-MENDOZA, A.; YU, H. B.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; BRAVO-PATIÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; FINLAY, B. B.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 11, p. 4569-4577, 2011.

PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; PARK, J. Y.; MOON, J. S.; KIM, S. H.; KWON, N. H.; AHN, J. S.; DAVIS, W. C.; DAVIES, C. J. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 29-39, 2004.

PASHMI, M.; QANBARI, S.; GHORASHI, S. A., SHARIFI, A. R.; SIMIANER, H. Analysis of Relationship between Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles, Somatic Cell Count and milk Traits in Iranian Holstein Population. **Journal Animal Breeding Genetics**, v. 126, p. 296-303, 2009.

R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, p. 369-400, 2006.

RAMBEAUD, M.; ALMEIDA, R. A.; PIGHETTI, G. M.; OLIVER, S. P. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 193-205, 2003.

RAPAPORT, F.; KHANIN, R.; LIANG, Y.; PIRUN, M.; KREK1, A.; ZUMBO, P.; MASON, C. E.; SOCCI, N. D.; BETEL, D. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 14, n. 9, p. R95, 2013.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A, L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. Varela: São Paulo, 2001. Vol. I, p. 294-295

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010a.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010b.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Gene expression Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2881-2887, 2007.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321-332, 2008.

SERHAN, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 101-137, 2007.

SEYEDNASROLLAH, F.; LAIHO, A.; ELO, L. L. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. **Briefings in Bioinformatics**, 2013.

SHARFE, N.; NIKOLIC, M.; CIMPEON, L.; KRATTS, A. V.; FREYWALD, A.; ROIFMAN, C. M. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1208-1220, 2008.

SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; SARGEANT, J. M. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 231-238, 2000.

SHEFFIELD, L. G. Mastitis Increases Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid in Bovine Mammary Glands. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2020-2024, 1997.

SMYTH, G. K.; VERBYLA, A. P. A Conditional Likelihood Approach to Residual Maximum Likelihood Estimation in Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B**, v. 58, n. 3, p. 565–572, 1996.

SONESON, C.; DELORENZI, M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 91, 2013.

SUN, J.; HOBERT, M. E.; DUAN, Y.; RAO, A. S.; HE, T. C.; CHANG, E. B.; MADARA, J. L. Crosstalk between NF- κ B and β -catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells. **The American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 1, p. G129-G137, 2005

TACHADO, S. D.; SAMRAKANDI, M. M.; CIRILLO, J. D. Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3324, 2008.

TAGER, A. M.; BROMLEY, S. K.; MEDOFF, B. D.; ISLAM, S. A.; BERCURY, S. D.; FRIEDRICH, E. B.; CARAFONE, A. D.; GERSZTEN, R. E.; LUSTER, A. D. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 982-990, 2003.

TAN, N. S.; MICHALIK, L.; DI-POI, N.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Critical roles of the nuclear receptor PPAR β (peroxisome-proliferator-activated receptor β) in skin wound healing. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 1, p. 97-102, 2004.

THAMMAVONGSA, V.; KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Review Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 529-543, 2015.

TIEZZI, F.; PARKER-GADDIS, K. L.; COLE, J. B.; CLAY, J. S.; MALTECCA, C. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0114919, 2015.

TRAPNELL, C.; HENDRICKSON, D. G.; SAUVAGEAU, M.; GOFF, L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 46-53, 2013.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562-578, 2012.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, ALI.; KWAN, G.; BAREN, M. J. V.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010a.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; BAREN, M. J. V.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-518, 2010b.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 825-852, 2002.

UMAR, S.; SARKAR, S.; WANG, Y.; SINGH, P. Functional cross-talk between β -catenin and NF κ B signaling pathways in colonic crypts of mice in response to progastrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 33, p. 22274-22284, 2009.

UTKU, N.; HEINEMANN, T.; TULLIUS, S. G.; BULWIN, G-C.; BEINKE, S.; BLUMBERG, R. S.; BEATO, B.; RANDALL, J.; KOJIMA, R.; BUSCONI, L.; ROBERTSON, E. S.; SCHULEIN, R.; VOLK, H-D.; MILFORD, E. L.; GULLANSK, S. R. Prevention of Acute Allograft Rejection by Antibody Targeting of TIRC7, a Novel T Cell Membrane Protein. **Immunity**, v. 9, p. 509-518, 1998.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 379-414, 2003.

VARGA, T.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1812, p. 1007–1022, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews. Genetics**, v.10, p. 57-63, 2009.

WANG, X.; HU, G.; BETTS, C.; HARMON, E. Y.; KELLER, R. S.; WATER, L. V. D.; ZHOU, J. Transforming Growth Factor- β 1-induced Transcript 1 Protein, a Novel Marker for Smooth Muscle Contractile Phenotype, Is Regulated by Serum Response Factor/Myocardin Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41589-41599, 2011.

WANG, X.; ZHONG, J.; GAO, Y.; JU, Z.; HUANG, J. A SNP in intron 8 of CD46 causes a novel transcript associated with mastitis in Holsteins. **BMC Genomics**, v. 15, n. 630, 2014.

WATTS, C. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 14-21, 2012.

WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 155-187, 1999.

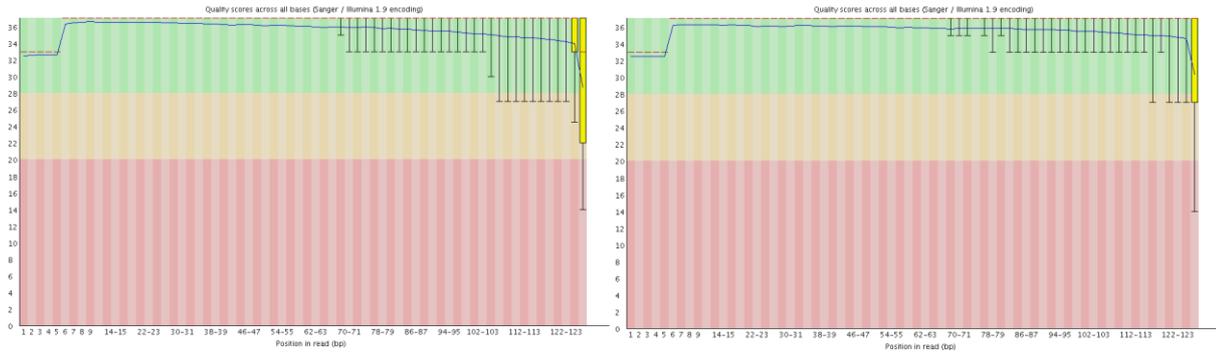
WYKES, M. Why do B cells produce CD40 ligand? **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 328-331, 2003.

ZHANG, X-D.; QI, L.; WU, J-C.; QIN, Z-H. DRAM1 Regulates Autophagy Flux through Lysosomes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

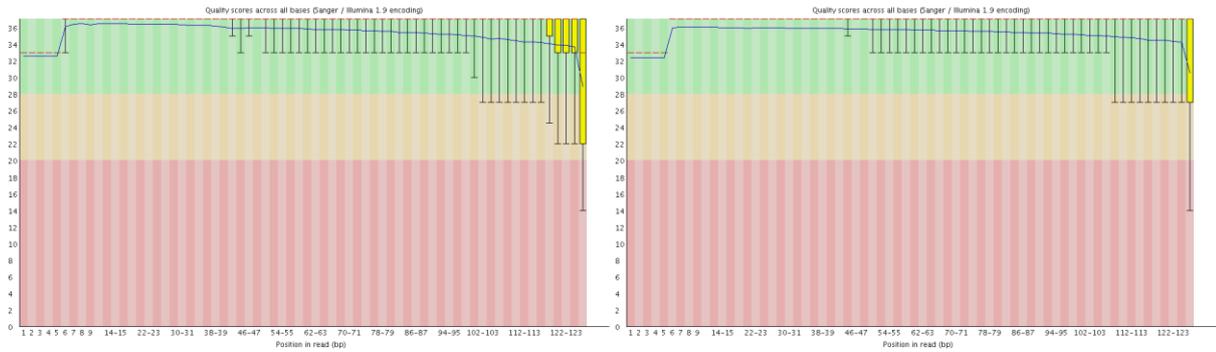
APÊNDICES

Apêndice A – Qualidade de sequência por base.

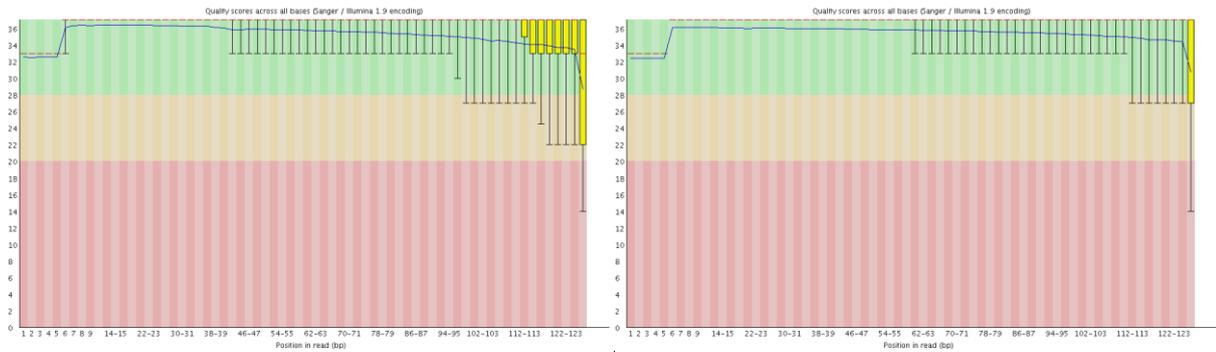
Apêndice 1A – Amostras G7T0D-R1 e G7T0D-R2.



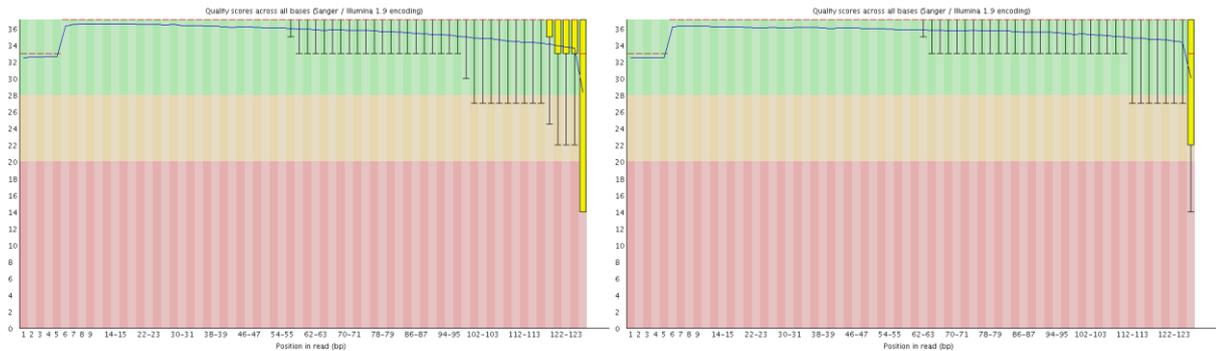
Apêndice 2A – Amostras G7T0E-R1 e G7T0E-R2.



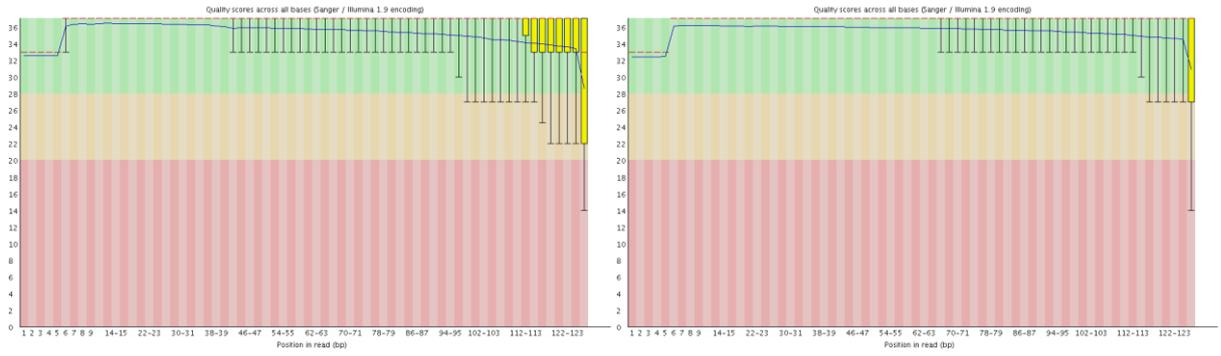
Apêndice 3A – Amostras G7T3D-R1 e G7T3D-R2.



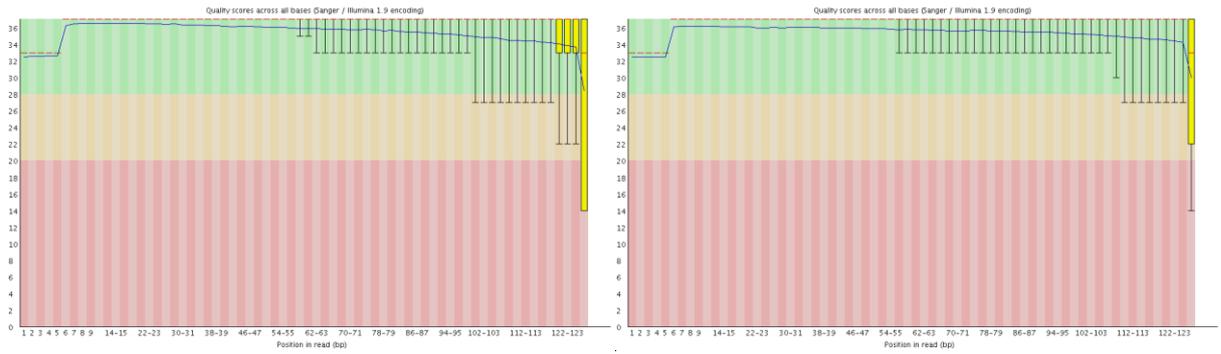
Apêndice 4A – Amostras G7T3E-R1 e G7T3E-R2.



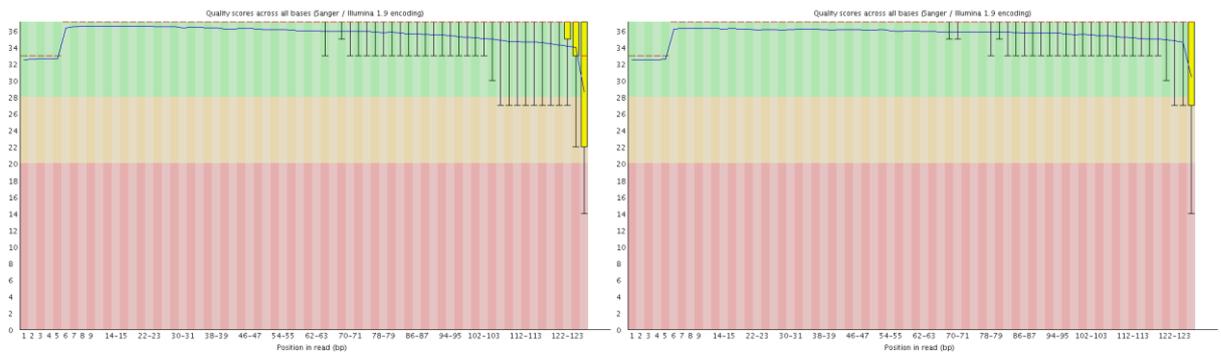
Apêndice 5A – Amostras G8T0D-R1 e G8T0D-R2.



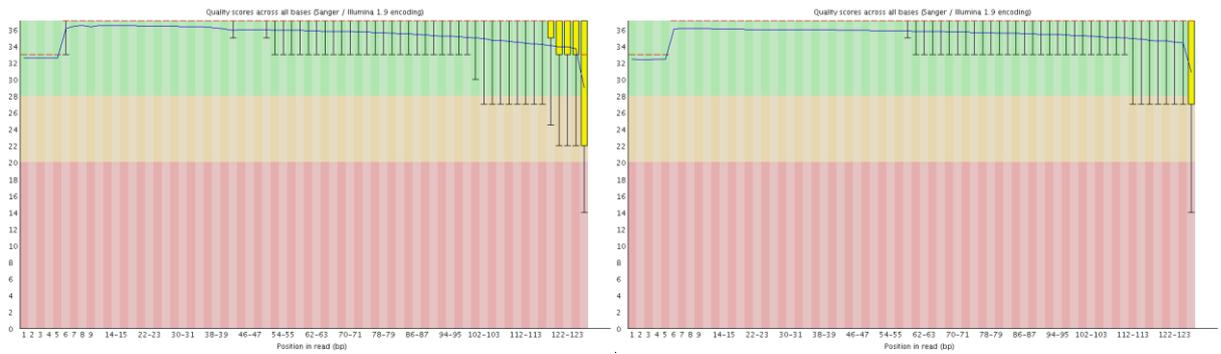
Apêndice 6A – Amostras G8T0E-R1 e G8T0E-R2.



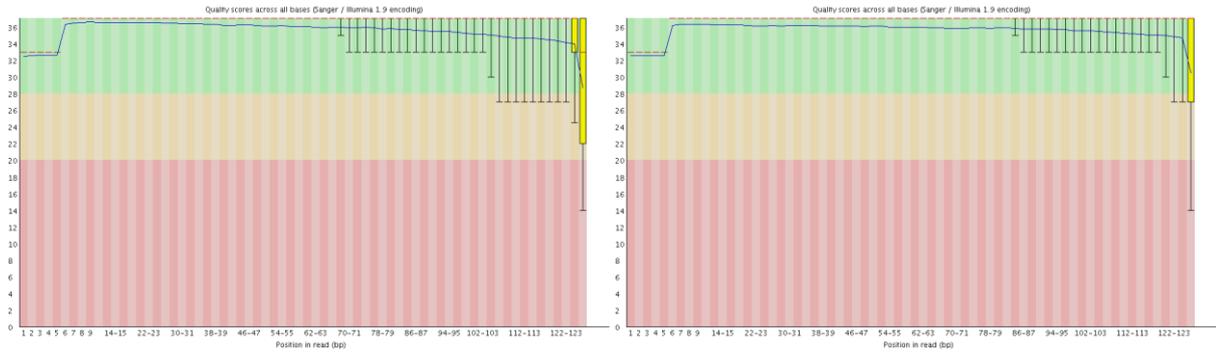
Apêndice 7A – Amostras G8T3D-R1 e G8T3D -R2.



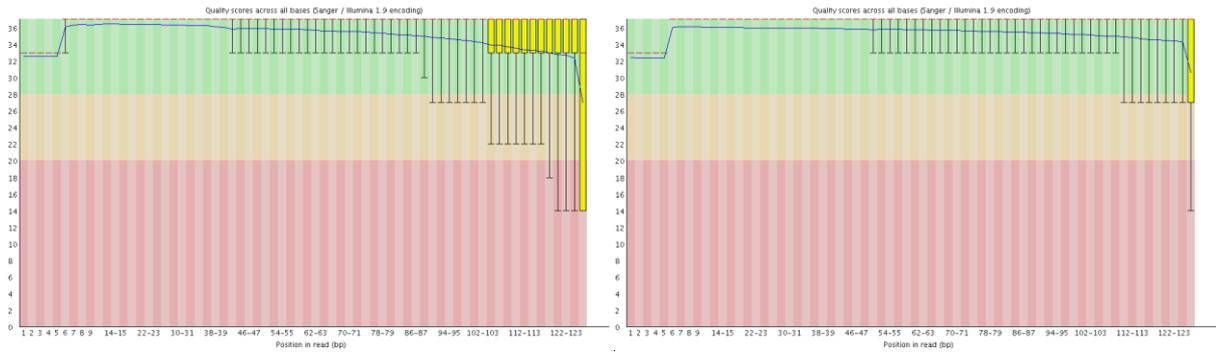
Apêndice 8A – Amostras G8T3E-R1 e G8T3E-R2.



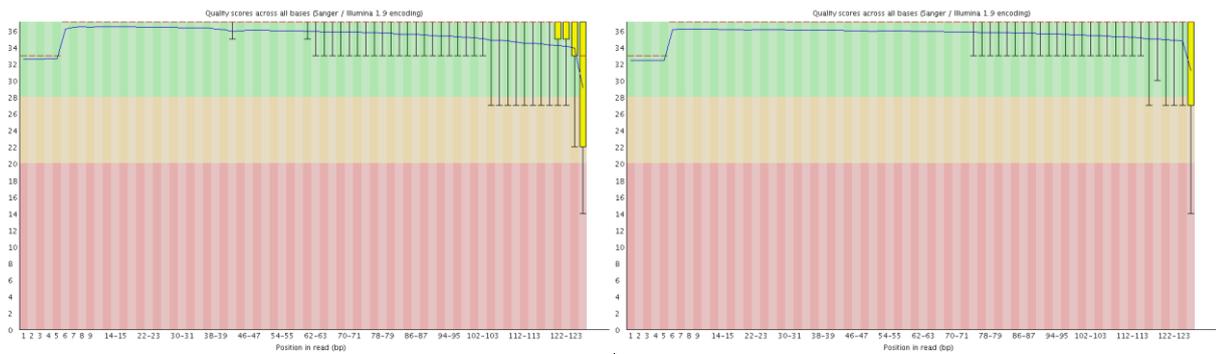
Apêndice 9A – Amostras G9T0D-R1 e G9T0D-R2.



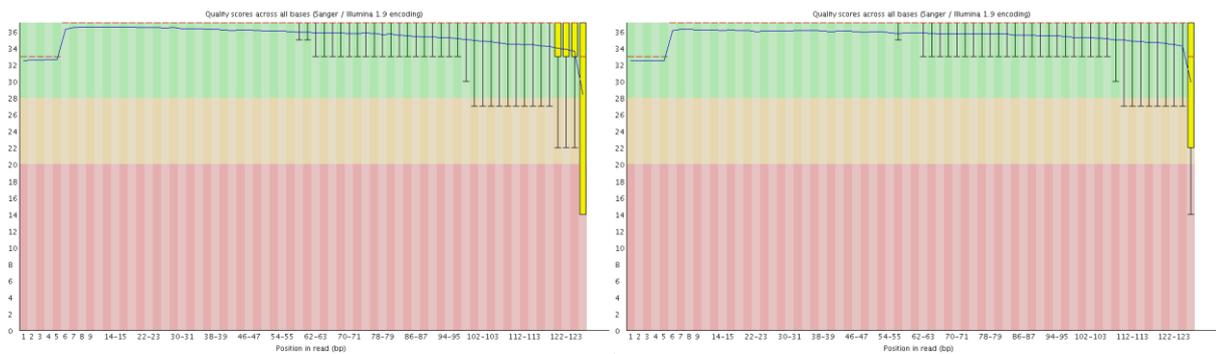
Apêndice 10A – Amostras G9T0E-R1 e G9T0E-R2.



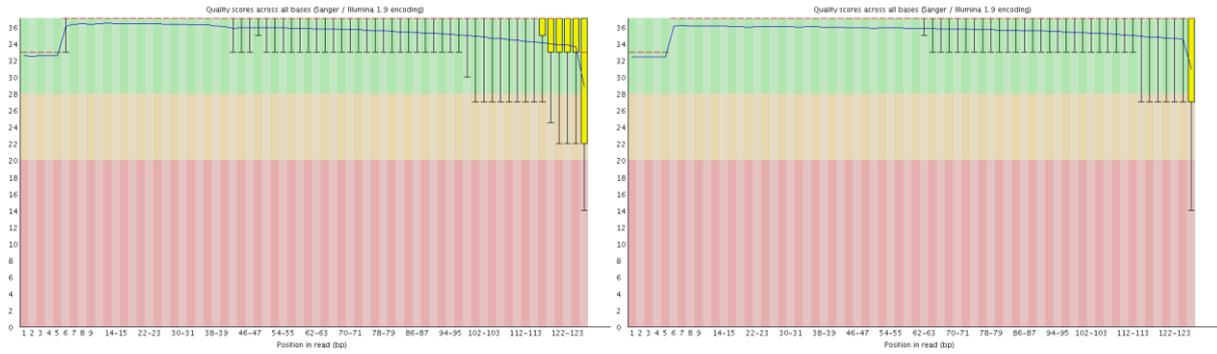
Apêndice 11A – Amostras G9T3D-R1 e G9T3D-R2.



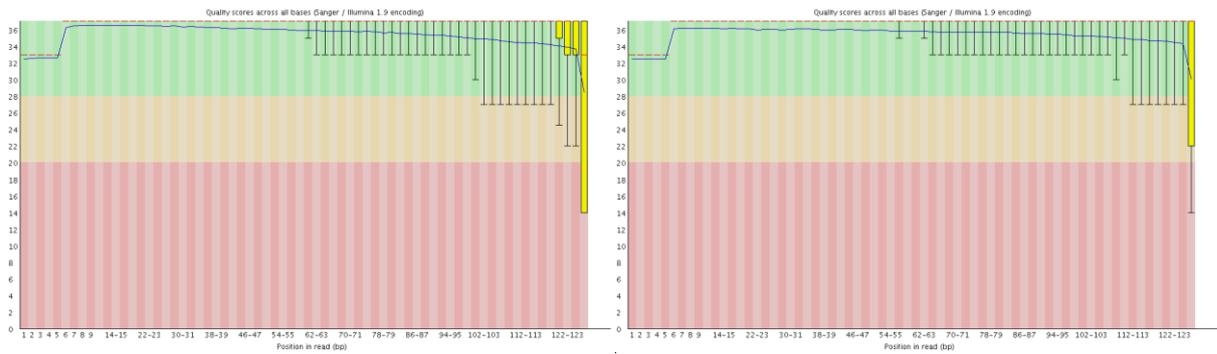
Apêndice 12A – Amostras G9T3E-R1 e G9T3E-R2.



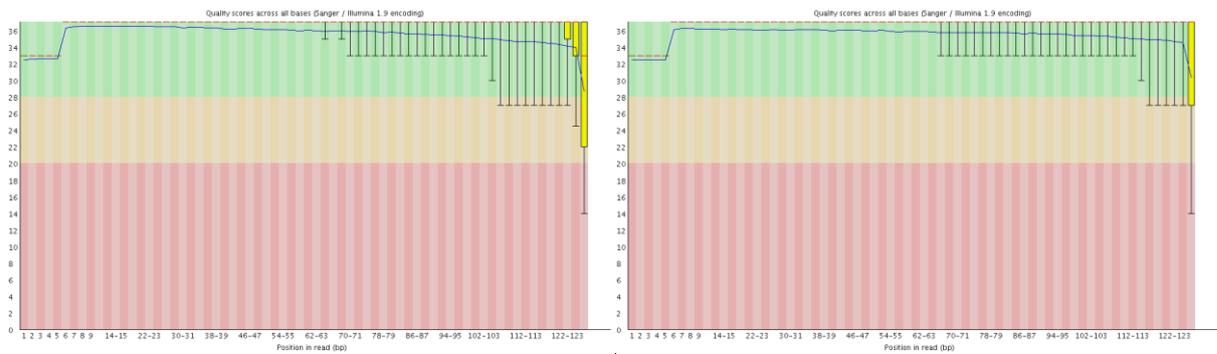
Apêndice 13A – Amostras G10T0D-R1 e G10T0D-R2.



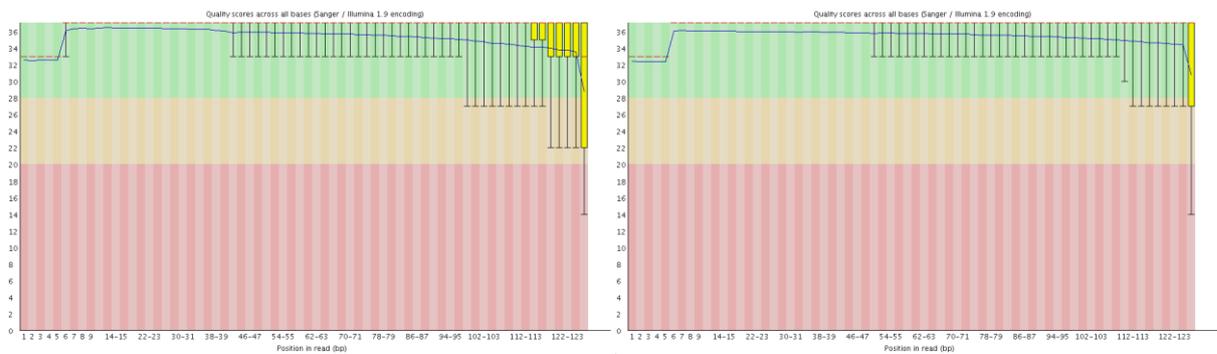
Apêndice 14A – Amostras G10T0E-R1 e G10T0E-R2.



Apêndice 15A – Amostras G10T3D-R1 e G10T3D-R2.



Apêndice 16A – Amostras G10T3E-R1 e G10T3E-R2.



Apendice B – KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways

Termos	N*	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR
Vias metabólicas	350	1,80E-08	5,30E-06	5,30E-06	2,40E-05
Adesão focal	80	1,10E-07	3,10E-05	1,60E-05	1,50E-04
Metabolismo de carbono	49	1,70E-07	4,80E-05	1,60E-05	2,20E-04
Biossíntese de antibióticos	79	1,90E-07	5,50E-05	1,40E-05	2,60E-04
Interação ECM-receptor	41	6,10E-07	1,70E-04	3,50E-05	8,10E-04
Biossíntese de aminoácidos	35	4,30E-06	1,20E-03	2,00E-04	5,70E-03
Cascatas de coagulação e do complemento	34	1,30E-05	3,70E-03	5,30E-04	1,70E-02
Vias do câncer	125	1,40E-05	4,10E-03	5,20E-04	1,90E-02
Glicólise / Gliconeogênese	30	2,10E-05	5,90E-03	6,50E-04	2,70E-02
Via de sinalização AMPK	47	2,30E-05	6,50E-03	6,50E-04	3,00E-02
Proteoglicanas no câncer	70	3,90E-05	1,10E-02	1,00E-03	5,20E-02
Via de sinalização PI3K-Akt	109	4,30E-05	1,20E-02	1,00E-03	5,70E-02
Ativação plaquetária	48	5,50E-05	1,60E-02	1,20E-03	7,30E-02
Migração transendotelial de leucócitos	46	6,70E-05	1,90E-02	1,40E-03	8,90E-02
Metabolismo de frutose e manose	18	7,10E-05	2,00E-02	1,40E-03	9,50E-02
Infecção por HTLV-I	87	8,00E-05	2,30E-02	1,40E-03	1,70E-02
Regulação do citoesqueleto de actina	72	8,90E-05	2,50E-02	1,50E-03	0,12
Via de sinalização Rap1	72	1,10E-04	3,00E-02	1,70E-03	0,14
Via de sinalização Wnt	50	1,30E-04	3,80E-02	2,00E-03	0,18
Fagossomo	57	1,40E-04	3,90E-02	2,00E-03	0,18
Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	25	2,90E-04	8,00E-02	3,90E-03	0,38
Metabolismo do carbono central no câncer	27	3,60E-04	9,70E-02	4,60E-03	0,47
Artrite reumatoide	36	4,70E-04	0,12	5,80E-03	0,62
Metabolismo de piruvato	19	4,90E-04	0,13	5,90E-03	0,65
Orientação de axônios	45	5,20E-04	0,14	5,90E-03	0,69
Leishmaniose	29	7,10E-04	0,18	7,80E-03	0,94
Moléculas de adesão celular (CAMs)	52	9,90E-04	0,25	1,00E-02	1,30
Via de sinalização PPAR	28	1,30E-03	0,31	1,30E-02	1,70
Via de sinalização HIF-1	36	1,70E-03	0,39	1,70E-02	2,20
Regulação da lipólise em adipócitos	23	2,10E-03	0,45	2,00E-02	2,70
Infecção por <i>Salmonella</i>	31	2,40E-03	0,50	2,20E-02	3,10
Malária	22	3,00E-03	0,57	2,60E-02	3,90
Metabolismo de galactose	15	3,60E-03	0,64	3,10E-02	4,70
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (ARVC)	26	5,20E-03	0,77	4,30E-02	6,60
Desregulação transcricional no câncer	54	6,00E-03	0,82	4,80E-02	7,70
Diferenciação de osteoclastos	43	6,90E-03	0,86	5,40E-02	8,80

Degradação de valina, leucina e isoleucina	20	7,80E-03	0,89	5,90E-02	9,90
Via das pentoses fosfato	13	8,00E-03	0,90	5,90E-02	10,00
Exportação de proteínas	12	8,40E-03	0,91	6,00E-02	11,00
Vias de sinalização que regulam a pluripotência das células tronco	44	9,40E-03	0,93	6,50E-02	12,00
Interação receptor de citocina-citocina	69	9,60E-03	0,94	6,50E-02	12,00

*número de genes diferencialmente expressos presentes na via metabólica ($P \leq 0,01$).