

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES CSF3 E LPO
RELACIONADOS À MASTITE EM BÚFALAS LEITEIRAS**

**Aline Aparecida Silva Stella
Zootecnista**

**Jaboticabal – SP
2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES CSF3 E LPO
RELACIONADOS À MASTITE EM BÚFALAS LEITEIRAS**

Aline Aparecida Silva Stella

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati
Co-orientadoras: Daniele Fernanda Jovino Gimenez
Larissa Fernanda Simielli Fonseca Noronha

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.

**Jaboticabal – SP
2017**

Stella, Aline Aparecida Silva

S824c Caracterização e perfil da expressão dos genes CSF3 e LPO
relacionados à mastite em búfalas leiteiras / Aline Aparecida Silva Stella. –
– Jaboticabal, 2017

x, 54 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Humberto Tonhati

Banca examinadora: Larissa Fernanda Simielli Fonseca Noronha,
Marcia Cristina de Sena Oliveira, Rodrigo Pelicioni Savegnago

Bibliografia

1. *Bubalus bubalis*. 2. Citocina. 3. Expressão gênica. 4. Imunidade. 5.
Glândula mamária. 6. Peroxidase. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.293.2:636.082

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 DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES CSF3 E LPO RELACIONADOS À MASTITE EM BÚFALAS LEITEIRAS

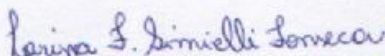
AUTORA: ALINE APARECIDA SILVA STELLA

ORIENTADOR: HUMBERTO TONHATI

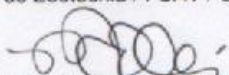
COORIENTADORA: LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA NORONHA

COORIENTADORA: DANIELE FERNANDA JOVINO GIMENEZ

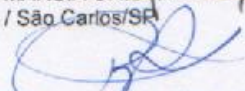
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Pós-doutoranda LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA NORONHA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA
EMBRAPA / São Carlos/SP



Pós-doutorando RODRIGO PELICIONI SAVEGNAGO
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de maio de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALINE APARECIDA SILVA STELLA – Nascida em 18 de janeiro de 1991, no município de Carapicuíba, Estado de São Paulo, filha de Maria Silvana Tereza da Silva e Antonio Lopes Stella. Ingressou no curso de Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, em Janeiro de 2010. No mesmo campus, em maio de 2011, ingressou no PET Zootecnia como bolsista até 2012 e voluntária até 2013. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, obtendo o título de Zootecnista em dezembro de 2014. Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na mesma faculdade como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati, obtendo o título de Mestre em Genética e Melhoramento animal em 23 de maio de 2017.

AULA DE VOO

O conhecimento
caminha lento feito lagarta.
Primeiro não sabe que sabe
e voraz contenta-se com cotidiano orvalho
deixado nas folhas vividas das manhãs.

Depois pensa que sabe
e se fecha em si mesmo:
faz muralhas,
cava trincheiras,
ergue barricadas.

Defendendo o que pensa saber
levanta certeza na forma de muro,
orgulha-se de seu casulo.

Até que maduro
explode em voos
rindo do tempo que imagina saber
ou guardava preso o que sabia.

Voa alto sua ousadia
reconhecendo o suor dos séculos
no orvalho de cada dia.

Mas o voo mais belo
descobre um dia não ser eterno.
É tempo de acasalar:
voltar à terra com seus ovos
à espera de novas e prosaicas lagartas.

O conhecimento é assim:
ri de si mesmo
E de suas certezas.
É meta de forma
metamorfose
movimento
fluir do tempo
que tanto cria como arrasa

a nos mostrar que para o voo
é preciso tanto o casulo
como a asa.

Mauro Iasi

Agradecimentos

À minha mãe Maria Silvana, pela luta diária, pelo amor incondicional, por todo esforço, pelas oportunidades proporcionadas, pela sua dedicação e pelo incentivo e vibração diante de cada conquista.

As mulheres da família, em especial a tia Isa, tia Ira e vó Terezinha pelo exemplo de força.

Aos Barnabé's da família, vô Beu, tio Henrique e em especial, tio Sérgio que não é só um tio, mas também meu pai, padrinho, irmão e grande amigo.

À Vanessa minha prima/irmã pentelha, pela infância que tivemos e pela cumplicidade e carinho que guardamos.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati, pela sua orientação, preocupação e por abrir portas me oferecendo as melhores oportunidades.

Ao Prof. Jesus A. Ferro e à Profa. Maria Inês T. Ferro por cederem espaço de laboratório e equipamentos de forma irrestrita para realização das análises.

Ao Prof. Dr. Danísio Prado Munari, por todo carinho e colaboração desde o início.

Ao Dr. Rodrigo Pelicioni Savegnago e a Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza, por disponibilizarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

À Fernanda Tanamati, parceira de laboratório, com quem dividi não só o espaço, mas também dúvidas, problematização, discussões e com quem comemorei por cada etapa alcançada.

As minhas co-orientadoras Dra. Daniele e Dra. Larissa, que foram essenciais para o desenvolvimento deste. Obrigada pela generosidade ao dividir todo conhecimento e por estar ao meu lado em todas as etapas.

Ao Dr. Diercles Francisco Cardoso, pela orientação, ensinamentos, confiança, apoio e paciência. Obrigada pela motivação e incentivo.

À Hanay (Pinguela), que não permitiu que distância nenhuma nos afastasse, a qual pude contar em vários momentos para incentivar, ajudar e vibrar.

Ao Geová (Traíra), que de traira só ficou o “nome”, pois é um grande companheiro, amigo e solucionador de perrengues.

Ao Renan (Ah-Han), por ser tão especial e estar sempre presente.

Ao Welex (Mirim), o menino mais genial que já conheci e que considero como irmão.

Ao Danilo (Oxyuris), meu eterno companheiro de trabalho e gordices.

À Nayara (Poka), Alexandre Giannoni, Danilo (Lamarca), Matheus (O Achado), Marcel (Pepe-Legal) e Fabricio, Caique, por estarem presente e me ajudarem em todas as horas.

Aos meus filhotes Bartolomeu (Bart) e Quora (Biscate), duplinha terrível, por destruírem tudo, pela desobediência, por pular na roupa, por aterrorizar com as visitas, por destruir as correspondências e o lixo, mas trazerem tantas alegrias que fazem com que essas coisas se tornem pequenas.

Aos integrantes do grupo PET Zootecnia: Welex (Mirim), Luiz Henrique (Goiabinha), Bruno (Vitelo), Rhaony (Zé Mayer), Valquíria (Sucupira), Jaqueline (Bituka), Milena (Rampera), Ana Carolina (Danette), Gustavo (Pistache), Bruna (Tieta), Livia (Champs), Nicole (Tiete), Rafael (Chupeta), pelas risadas, companheirismo, cervejas e acima de tudo pelo carinho.

À Professora Imaculada por estar sempre de portas abertas para conselhos, colaboração em projetos e pelo tempo em que convivemos no PET.

À Professora Regina pelas experiências trocadas durante as infinitas e prazerosas viagens pelos assentamentos de São Paulo.

Aos pequenos produtores rurais dos assentamentos, por abrirem suas casas e dividirem suas histórias, proporcionando momentos de risos, choros e fortalecendo a luta.

À turma de Zootecnia 2010, pelas experiências que os anos juntos proporcionaram.

À todos os funcionários que fazem com que esta estrutura funcione, em especial ao Cido e Wilson, pela atenção e carinho.

À todos os professores, por dividirem seus conhecimentos e contribuírem com minha formação.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela minha formação profissional e pessoal.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o Mestrado.

Sumário

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Bublinocultura no Brasil	4
3.2. Mastite em búfalos leiteiros	6
3.3. Genes selecionados para análise.....	7
3.3.1. Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos 3 (CSF3).....	7
3.3.2. Lactoperoxidase (LPO).....	9
3.4. Expressão Gênica - PCR Quantitativa em Tempo Real	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Coleta das amostras	14
4.2. Extração do RNA Total	15
4.3. Concentração e integridade do RNA Total extraído.....	16
4.4. Síntese da primeira fita de cDNA	17
4.5. PCR Quantitativa em Tempo Real	18
4.5.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	18
4.5.2. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores	19
4.5.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR.....	22
4.5.4. Escolha do Gene de Referência	24
4.5.6. Análise estatística dos dados.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERENCIAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR.....	27
Tabela 2. Variações das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.....	28
Tabela 3. Equações, valores de inclinação angular da reta (<i>slope</i>), coeficientes de determinação (r^2) e eficiências (e) das curvas-padrão dos grupos analisados.....	33
Tabela 4. Expressão do gene CSF3 em leite de búfalas com mastite e sem mastite.....	36
Tabela 5. Expressão do gene LPO em leite de búfalas com mastite e sem mastite.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de alvo CSF3 (A) e LPO (B) e para os genes de referência EEF1A1 (C), GAPDH (D), HPRT1 (E) e RPLP0 (F).....31

Figura 2. Estabilidade dos 4 genes candidatos a gene de referência e suas possíveis combinações segundo o programa NormFinder. O eixo Y reflete os valores de variabilidade, no qual os valores mais baixos indicam uma expressão mais estável. E+H = combinação dos genes EEF1A1 e HPRT1.....32

CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES CSF3 E LPO RELACIONADOS À MASTITE EM BÚFALAS LEITEIRAS

RESUMO - A mastite é a principal doença que acomete os rebanhos leiteiros e promove grandes perdas na produção devido a alterações na composição do leite e prejuízos na saúde do animal, aumentando assim os custos de produção. Caracteriza-se pela resposta inflamatória da glândula mamária a agentes infecciosos, alterando sua fisiologia e metabolismo. Estudo de expressão gênica vem sendo empregado em vários organismos com a finalidade de identificar genes relacionados com características economicamente importantes como resistência a doenças. Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo de resistência/susceptibilidade à mastite, foi realizada a quantificação da expressão relativa dos genes do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos 3 (CSF3) e Lactoperoxidase (LPO), em leite de búfalas mestiças saudáveis e com mastite, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizada a extração de RNA total, com Trizol, de células somáticas do leite de doze animais diagnosticados com mastite e de doze animais livres da infecção. Foram realizadas análises de qualidade e quantificação do RNA total e das contaminações por DNA genômico para garantir a integridade das amostras. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio do método do Delta Delta Ct. Os genes GAPH, HPRT1, EEF1A1 e RPLP0, foram selecionados na literatura, e testados como genes de referência. As análises referentes às quantificações foram realizadas com os valores de Ct obtidos para cada gene. O gene CSF3 foi significativamente mais expresso em animais com mastite em comparação com animais sem mastite ($P < 0,001$) e 5,14 vezes mais expresso na amostra alvo do que na amostra de referência. O CSF3 é uma citocina naturalmente produzidas e secretadas por uma grande variedade de células pertencentes ou não ao sistema imune. Desempenham importante papel na defesa do hospedeiro, já que regulam parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica, o que demonstra importância no seu uso no diagnóstico e prognóstico das mastites. O gene LPO expressa uma proteína sintetizada na glândula mamária por íons tiocianato (SCN^-), originados por

metabolismo hepático e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e outras células, para gerar produtos reativos com intensa atividade antimicrobiana. Esse foi 2,41 vezes mais expresso em animais com mastite em relação a animais sem mastite (p-valor = 0,097), não havendo diferença significativa, porém a mastite é uma doença multifatorial e afetada por muitos genes, sendo necessário mais estudos com animais em diferentes fases de infecção e incluindo outros genes para compreender o mecanismo de resposta imune relacionado a mastite.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, citocina, expressão gênica, imunidade, glândula mamária, peroxidase

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da exploração econômica da bubalinocultura no Brasil se iniciou na década de 1980, quando alguns criadores passaram a avaliar e a quantificar as características zootécnicas do búfalo, uma vez que é um animal com tripla aptidão: produz carne, leite e são utilizados como animais de tração e montaria (PEREIRA, 2007).

Inicialmente, os animais foram destinados à produção de carne, mas a partir da década de 1990 foi reconhecida também sua habilidade para a produção de leite. Este produto, apresenta características físico-químicas particulares, como teor de proteínas, gorduras e lactose superiores, em comparação ao leite de vaca. Em 2011, a produção nacional de leite de búfalas foi de aproximadamente 156 milhões de litros, produzidos por cerca de 130.000 búfalas em 3.000 rebanhos. Estima-se que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país, que transformam anualmente 75 milhões de litros de leite em 22 mil toneladas de derivados, destacando a importância econômica dessa atividade (BERNARDES, 2013).

A qualidade do leite de búfalas quanto aos aspectos físico-químicos e índices de produtividade tem sido avaliada por pesquisadores no Brasil e no mundo, mas o aspecto sanitário ainda é pouco explorado.

Os bubalinos apresentam problemas sanitários semelhantes aos bovinos e, dentre esses, destaca-se a mastite, que é a enfermidade que causa maior prejuízo à pecuária de leite, sendo esse problema agravado pelo impacto na saúde pública, por meio da veiculação, pelo leite, de microrganismos patogênicos para a espécie humana (CARVALHO, 2005). Esta doença promove grandes perdas na produção devido a

alterações na composição do leite e prejuízos na saúde do animal, aumentando assim os custos de produção (CARVALHO, 2005).

Uma alternativa eficiente para o controle da mastite é a seleção de animais resistentes. Tradicionalmente, esta seleção tem sido baseada na contagem de células somáticas (CCS) e na incidência de mastite clínica, porém estes parâmetros apresentam baixa herdabilidade. Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos com a finalidade de identificar genes relacionados com características economicamente importantes como resistência a doenças.

2. OBJETIVO

Quantificar a expressão dos genes CSF3 e LPO em leite de búfalas mestiças saudáveis e com mastite, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) com o intuito de compreender melhor os mecanismos de resposta imune envolvidos no fenótipo de resistência/susceptibilidade à mastite.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bubalinocultura no Brasil

A domesticação dos búfalos aconteceu na Ásia, mais precisamente na China e Índia, à cerca de 5000 anos. Por ser considerada importante fonte de alimento e trabalho, a espécie bubalina foi introduzida ao continente Europeu e Africano, sendo posteriormente levada para a América (BORGHESE e MAZZI, 2005). Nos tempos atuais a população mundial de búfalos ultrapassa 199 milhões de cabeças (FAO, 2013).

No Brasil, a bubalinocultura está presente em todas as regiões, predominando na região Norte (64,21%), seguidos pelas regiões Sudeste (10,42%), Nordeste (9,84%), Sul (9,31%) e Centro-Oeste (6,14%) (IBGE, 2013). De acordo com o IBGE, em 2012 o número de búfalos no Brasil foi de 1.261.922 cabeças. Entre os anos de 2010 e 2011 houve um crescimento de 7,8%, superando o de bovinos, que no mesmo ano obteve um aumento de 1,6%. No entanto, a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos estima em mais de 2,10 milhões de animais (ANUALPEC, 2010). Bastianetto (2005) atribuiu essas diferenças entre as estatísticas, aos búfalos que tradicionalmente são cadastrados como bovinos no momento das declarações de vacinação, imposto territorial rural, entrada e abate em frigoríficos.

O rebanho de búfalos é pequeno em comparação ao rebanho bovino (ANUALPEC, 2010), mas a bubalinocultura pode ser considerada uma atividade relevante pela facilidade de adaptação dos animais as nossas condições, docilidade, rusticidade e pela alta qualidade do leite e derivados. Essa atividade é caracterizada por pequenos e médios produtores e em mais de 70 % das propriedades a principal atividade é voltada para produção leiteira, apresentando estimativas de crescimento acompanhado pelo aumento na demanda por produtos do leite de búfalas (TONHATI et al., 2012).

O leite bubalino *in natura* é pouco consumido, sendo que a grande importância desse alimento está na sua transformação em derivados, como a *mozzarella*. Este produto apresenta algumas peculiaridades em comparação ao leite bovino e melhores qualidades nutricionais, como alto teor de gordura e proteína, com valores variando de 6,87 % à 8,59 % e de 4,13 % à 4,55 %, respectivamente (TONHATI et al., 2000; TONHATI et al., 2012), além de apresentarem 25,55 % mais aminoácidos essenciais que o leite de vaca, e mais minerais (VERRUMA e SALGADO, 1994; TONHATI et al., 2012). Trata-se de um leite com sabor adocicado, coloração branca opaca devido à quase total ausência de pigmentos de beta caroteno (precursor da vitamina A), rico em vitaminas A, D e B2 e com níveis de cálcio superiores ao leite de vaca (1,99 g por kg e 1,17 g por kg, respectivamente) (De FRANCISCIS e Di PALO, 1994).

O teor de sólidos totais do leite de búfalas proporciona excelentes rendimentos para produção de derivados. Os produtos derivados exclusivamente do leite de búfalas possuem grande valor agregado, o que permite que a matéria prima seja remunerada a preços cerca de duas vezes maiores que aqueles pagos ao leite bovino (BERNARDES, 2007), sendo o aumento de sua produção e melhorias na qualidade o principal objetivo dentro da cadeia produtiva de leite bubalino.

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitas variáveis, entre as quais destacam-se fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite. Com o aumento na CCS, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos, são influenciados negativamente (KITCHEN, 1981).

3.2. Mastite em búfalos leiteiros

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária resultante da introdução e multiplicação de microrganismos patogênicos, reduzindo a atividade sintética da glândula e provocando alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite e elevando a contagem de células somáticas (CCS), que é utilizado como indicador da severidade do processo inflamatório (HARMON, 1994).

O termo células somáticas do leite é utilizado para designar todas as células presentes no mesmo, incluindo as de origem sanguínea (leucócitos) e as de descamação do epitélio glandular secretor. No entanto, em uma glândula mamária infectada, as células de defesa correspondem de 98 a 99% das células encontradas no leite (PHILPOT e NICKERSON, 1991). Desse modo, a contagem de células somáticas (CCS) do leite indica, de maneira quantitativa, o grau de infecção da glândula mamária (MACHADO et al., 2000).

A mastite pode ser traumática, metabólica, fisiológica, alérgica e infecciosa, sendo esta considerada a mais importante por ser contagiosa, levando a veiculação de microrganismos causadores de mastite, toxinas e resíduos antimicrobianos no leite (COSTA, 1997).

O primeiro obstáculo enfrentado por um patógeno para adentrar o úbere é composto pela barreira formada pelo esfíncter do teto e pelo tampão de queratina formado pelo epitélio queratinizado. Uma vez que o microrganismo tenha atravessado o canal do teto e alcançado a cisterna mamária, passam a atuar diversos fatores solúveis e celulares com o intuito de controlar a infecção, ocorrendo um aumento no número de células de defesa, onde passa a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanecem inalterados (PHILPOT e NICKERSON, 1991).

As infecções das glândulas mamárias podem ser classificadas como clínicas ou subclínicas de acordo com a intensidade do processo inflamatório. A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e presença de grumos de fibrina ou pus no leite. A mastite subclínica não apresenta sintomas clínicos evidentes, sem sinais visíveis de inflamação do úbere, tendo o leite aspecto macroscópico normal, porém com queda na produção (RIBEIRO et al., 2003).

Quando comparado com a vaca, o úbere de a búfala possui conformação externa semelhante, mas com diferenças anatômicas que conferem maior resistência à instalação de processos infecciosos. O teto das búfalas possui um esfíncter muito vascularizado, maior concentração de pigmentos de melanina na camada epidérmica, vedação de queratina mais intensa e epitélio escamoso mais grosso e compacto no ducto papilar (ARAÚJO, 2005).

No entanto, búfalas com elevada contagem de células somáticas apresentam redução da produção de leite, alterações dos teores de seus constituintes e alterações no tempo de coagulação do leite no processo de fabricação de queijos, comprometendo a qualidade, processamento e rendimento industrial (PETROVA e TZANKOVA, 1999; CERON-MUÑOZ et al., 2002; TRIPALDI et al., 2003).

Estudo de expressão gênica vem sendo empregado em vários organismos com a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados com características economicamente importantes como resistência a doenças.

3.3. Genes selecionados para análise

3.3.1. Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos 3 (CSF3)

As citocinas são moduladores imunes secretados pela glândula mamária, formada por um grupo heterogêneo de proteínas naturalmente produzidas e secretadas por uma grande variedade de células pertencentes ou não ao sistema imune. Desempenham importante papel na defesa do hospedeiro, já que regulam parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica (CARNEIRO, 2009).

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos 3 (CSF3), é uma das principais citocinas hematopoiéticas, descrita como uma molécula monomérica em solução que possui uma sequência de 174 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. Esta molécula contém um resíduo de cisteína livre na posição 17 e duas pontes dissulfeto, Cys(36)-Cys(42) e Cys(64)-Cys(74), que são importantes para a estabilidade estrutural da proteína e dobramento correto da longa cadeia de aminoácidos (KUNIECHICK, 2013).

Seu papel biológico inclui respostas imunes, proliferação e sobrevivência celular e patogênese do câncer (GOMES, 2010; MARTINS et al., 2010). Tem função de estimular e regular a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos na medula óssea, que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos; aumentar quantitativamente e qualitativamente os leucócitos recrutados nos sítios inflamatórios; e aumentar o número de linfócitos e a produção de anticorpos que atuam em inflamações, lesões teciduais e infecções, principalmente bacterianas (NICKERSON, 1991; GOMES, 2010).

O CSF3 promove a geração da linhagem granulocítica, principalmente neutrófilo, e mobiliza as células da medula óssea para a circulação periférica (GOMES, 2010; MARTINS et al., 2010).

Nos neutrófilos atua melhorando seu processo de maturação, sua sobrevivência, bem como a função efetora, como fagocitose, atividade bactericida e toxicidade celular dependente de anticorpos (NICKERSON, 1991; MARTINS et al., 2010). Além da função de estimular a produção de neutrófilos, também atua estimulando suas atividades bactericidas, de quimiotaxia, de fagocitose e promove efeitos antiinflamatórios, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e regulando a liberação de citocinas anti-inflamatórias (GOMES, 2010).

Trabalhos em animais e modelos de experiências clínicas, demonstraram que o CSF3 tem várias outras atividades importantes como efeitos imonoestimuladores sobre os neutrófilos e células hematopoiéticas, como neuroproteção, geração e reparo de células cardíacas e imunomodulação sobre outras células imunitárias (MARTINS et al., 2010).

O papel das citocinas na patofisiologia da glândula mamária tem sido objeto de estudos, sendo que as súbitas e sensíveis alterações no repertório de citocinas, no úbere normal ou mastítico, encorajam seu uso no diagnóstico e prognóstico das mastites.

3.3.2. Lactoperoxidase (LPO)

As peroxidases estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos, encontrando-se nas glândulas mamárias, salivares, lacrimais e da tireoide, bem como na mucosa intestinal e no muco cervical (LINS, 2013).

O sistema lactoperoxidase (LPO), pertence à família das peroxidases, é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária e está presente em todos os mamíferos, sendo a enzima mais abundante no leite bovino, com concentração de cerca de 2,0 a 35,0 mg/L com um valor médio de 14,8 mg/L (CARNEIRO, 2009; LINS, 2013).

O sistema LPO é composto por três elementos básicos: a enzima lactoperoxidase (LPO), uma proteína sintetizada na glândula mamária; o íon tiocianato (SCN^-), originado pelo metabolismo hepático; e as moléculas de oxigênio reativas, derivadas da atividade de leucócitos e de outras células (KUSSENDRAGER e VAN HOOIJDONK, 2000).

A LPO é constituída por 8-10% de hidratos de carbono, compreende uma cadeia contendo 612 aminoácidos. Consiste em uma única cadeia polipeptídica de peso molecular de aproximadamente 78 kDa (CARNEIRO, 2009; KOKSAL et al. 2016). A enzima contém um grupo hemo com uma molécula de ferro para cada mol da proteína, que forma seu centro catalítico, sendo uma proteína básica com um ponto isoelétrico de pH 9,6 (LINS, 2013).

O sistema LPO, consiste na adição de tiocianato de sódio (NaSCN) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para reativar a enzima LPO, uma enzima que está naturalmente presente no leite. No estado natural, os fatores limitantes do sistema LP são os íons tiocianato e o oxigênio reativo, porque, apesar de serem encontrados invariavelmente no leite, suas concentrações dependem de muitos fatores relacionados ao animal, como a dieta, condições fisiológicas, manejo, entre outros. O peróxido de hidrogênio pode ser gerado no processo de fagocitose pelos neutrófilos (SORDILLO et al., 1997).

A LPO participa do sistema de defesa natural do hospedeiro contra microrganismos invasores e apresenta função biológica essencial associada à proteção da glândula mamária e do trato intestinal de recém-nascidos, contra os microrganismos patogênicos presentes no leite (LINS, 2013).

Perraudin e Reiter (1998) relataram que o sistema LP atua como um antioxidante, protegendo, assim, as células de mamíferos contra as espécies altamente reativas de oxigênio. Além da sua ação antimicrobiana e a proteção das células animais

contra os efeitos do peróxido, a degradação de vários carcinógenos também tem sido relatada (KUSSENDRAGER e VAN HOOIJDONK, 2000).

A atuação da LPO não agride as células da glândula, além de não ser tóxica e proteger dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio. Assim, o sistema LPO pode ser considerado como sistema antimicrobiano natural e muito ativo e que não apresenta efeitos colaterais.

3.4. Expressão Gênica - PCR Quantitativa em Tempo Real

A PCR em tempo real tem sido adotada em estudos que requerem alta sensibilidade e exatidão na quantificação expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (FONSECA, 2015).

A reação de amplificação em tempo real é uma variante da reação de PCR convencional, em que é necessária a análise do produto de PCR através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida após o último ciclo de amplificação. Os produtos da PCR em tempo real podem ser mensurados a cada ciclo e este monitoramento é feito durante a fase exponencial de amplificação, e com isso, pode-se determinar a quantidade inicial do alvo com grande precisão (AHMED, 2002). Para isso, a técnica utiliza corantes que emitem fluorescência e se associam à amplificação do gene alvo. Esta fluorescência aumenta em proporção direta ao número de moléculas de produtos de PCR (*amplicons*) gerados (BUSTIN e NOLAN, 2004; WONG e MEDRANO, 2005; FONSECA, 2015).

Os sistemas de detecção mais utilizados são o *SYBR® Green* e o *TaqMan®*. O sistema *SYBR® Green*, possui capacidade de se ligar à fita dupla de DNA de forma covalente e emitir uma fluorescência que é medida e convertida numa quantidade de DNA (MACKAY et al., 2007), enquanto o sistema *TaqMan®* utiliza uma sonda

fluorescente, que se liga à sequência alvo, a qual tem total complementaridade, e que permite a detecção de um produto específico, conforme este se acumula durante os ciclos da PCR (PELTVERKUIL et al., 2008). O *SYBR® Green* é inespecífico ligando-se a todo o DNA fita dupla, e por isso, é necessário que as reações sejam otimizadas para a obtenção de resultados precisos. Por outro lado, o sistema *TaqMan®* é altamente específico, pois possui, além do par de oligonucleotídeos iniciadores, mais uma sequência de nucleotídeos chamada de sonda. Desse modo, uma molécula de DNA somente será contabilizada se os oligonucleotídeos e a sonda se ligarem a ela, e por isso, apresenta um custo muito maior em relação ao *SYBR® Green* (HEID, 1996).

Dois são os procedimentos de quantificação padrão utilizados na PCR em tempo real: relativo e absoluto. A quantificação absoluta requer um padrão apropriado de uma concentração conhecida para fazer diluições seriadas e estabelecer uma curva padrão. As amostras desconhecidas são então quantificadas por comparação com essa curva. Essa técnica permite que se saiba o número exato de cópias do RNA alvo em uma determinada amostra biológica (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

A quantificação relativa é subdividida em duas metodologias, e a escolha da metodologia a ser utilizada depende da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações, sendo que os resultados de expressão obtidos ao final do experimento devem ser iguais para os dois métodos. Quando a eficiência de amplificação dos iniciadores está dentro de um limiar aceitável, utiliza-se o método do Ct comparativo (Ct), no entanto, se as eficiências não são satisfatórias, deve-se lançar mão do método da Curva Padrão para Quantificação Relativa (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Independente do método a ser seguido, em um experimento de quantificação relativa por qRT -PCR, a expressão de um gene de interesse em uma dada amostra é

comparada com a expressão do mesmo gene em outra amostra (amostra calibradora). Os resultados são expressos como um aumento ou diminuição da expressão do tratado em relação ao controle. Posteriormente, os valores obtidos são comparados aos resultados das mesmas amostras quantificadas em genes de referência. Este procedimento é utilizado como um controle na variabilidade experimental neste tipo de quantificação (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

A escolha dos genes de referência deve ser feita de forma criteriosa. Eles não devem variar nos tecidos ou células sob investigação, ou em resposta ao tratamento experimental. Recomenda-se utilizar mais de um gene de referência, como forma de controlar possíveis valores discrepantes e grandes diferenças entre os genes (VANDESOMPELE, et al. 2002). Esta tecnologia tem sido utilizada na quantificação da expressão de genes, tendo grande importância na investigação de genes relacionados a aspectos econômicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de leite de 46 búfalas mestiças da raça Murrah em diferentes estágios de lactação provenientes de rebanhos bubalinos localizado no município de Registro no estado de São Paulo. Todas as amostras de leite foram coletadas no início da ordenha e todos animais passaram por exame de palpação e pelo *Califórnia Mastitis Test* (CMT).

Dois grupos de animais foram selecionados, sendo um grupo de animais diagnosticados com mastite e outro com animais livres de infecção (animais controle). Para o estudo de expressão gênica, foram utilizadas 24 amostras, sendo 12 amostras de animais com mastite e 12 amostras de animais controle. Para cada animal foram coletadas três amostras com 50 mL de leite em tubos esterilizados, os quais foram transportados em caixas isotérmicas com gelo seco até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, SP. Além da coleta em triplicata, foi realizada a coleta de uma amostra de cada animal para análise da Contagem de Células Somáticas (CCS), que foi encaminhada para Clínica do Leite localizada Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP de Piracicaba, SP, para confirmação dos animais saudáveis e com mastite. Os animais com CCS até 400 mil/mL formaram o grupo controle (saudáveis) e os que apresentaram mais de 400 mil/mL foram classificados como mastite.

4.2.Extração do RNA Total

A extração do RNA total das amostras coletadas foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, SP.

A princípio foi testado o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), como descrito por Fonseca (2015), para extração de RNA do leite de bovinos. No entanto, a quantidade e qualidade das amostras obtidas não foram satisfatórias levando a vários testes e padronizações.

Contudo, o protocolo utilizado foi o de reagente Trizol (Invitrogen[®]), conforme descrito abaixo: O leite foi colocado em banho-maria e posteriormente centrifugado para formação de um precipitado (“*pellet*”). Foi adicionado 1 mL do reagente Trizol[®] (mantido a 4°C) e por inversão as amostras foram homogeneizadas. Depois, as amostras foram mantidas por 5 min. a temperatura ambiente (TA – 23°C a 25°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado (mantido a 4°C) (1:5 v/v clorofórmio; Trizol[®]) as amostras, que foram homogeneizadas brevemente em homogeneizador tipo vortex e, após, incubadas por 3 minutos a TA. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL (o RNA total encontra-se exclusivamente nessa fase). Para precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol (mantido a -20°C) (1:2 v/v, isopropanol e Trizol[®] utilizado no início). Os tubos foram agitados cuidadosamente, por inversão, durante 2 min. e mantidos a TA por 8 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. a 4°C e o RNA precipitado, até então invisível, formou um sedimento gelatinoso no fundo do tubo (“*pellet*”). O sobrenadante foi descartado e esse precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (mantido a 4°C) (1:1 v/v, etanol 75% e Trizol[®]

utilizado no início). As amostras foram centrifugadas a 7.500 g por 5 min. a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente descartado. O precipitado foi seco por cerca de 10 min. a TA e depois eluído em 50 µL de H₂O DEPC. O RNA isolado foi quantificado e, depois, estocado em ultrafreezer (-80°C).

4.3. Concentração e integridade do RNA Total extraído

A determinação da concentração e contaminação do RNA foi realizada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. Foi utilizado o valor de absorbância a 260 nm para a determinação da concentração do RNA (ng/µL), as razões A260nm/A280nm para avaliar a contaminação por proteínas e A260nm/230nm para avaliar as contaminações por outros compostos, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol. Os valores de referência para estas razões são de 1,8 a 2 e maior ou igual a 2, respectivamente.

As amostras que apresentaram contaminação por compostos foram submetidas à purificação com etanol absoluto e acetato de sódio. Desta forma, adicionou-se 2,5 vezes de etanol absoluto (1:2,5 amostra/etanol absoluto) e 10% de acetato de sódio 3M (1:1/10 amostra/acetato de sódio). As amostras foram vortexadas brevemente e incubadas por 10 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. a 4°C, formando um precipitado no fundo e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, homogeneizado manualmente, centrifugados a 7.500 g por 5 min. a 4°C e o sobrenadante foi removido. O passo de lavagem foi repetido e o *pellet* foi seco a TA e ressuspendido em H₂O RNase free.

A confirmação da ausência de contaminação por DNA genômico nas amostras foi realizada com o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010), com o kit de quantificação de DNA, *Qubit dsDNA Assay Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

As amostras que apresentaram contaminação por DNA, concentração acima de 10% em relação ao RNA, foram tratadas com o *TURBO DNA-free™ Kit* (Life Technologies, Foster, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

4.4. Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando o *Kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para garantir a integridade das amostras. Segundo os fabricantes, o *SuperScript® IV Reverse Transcriptase*, é recomendada quando há inibidores nas amostras de RNA que podem comprometer a síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, 2µL de RT enzyme mix contendo SuperScript IV RT e RNaseOut, 10µL de 2X RT Reaction Mix, contendo primer oligo(dT)20 (2,5 µM) mais random hexamers (2,5ng/µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs e água ultra pura para completar o volume para 20 µL. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 minutos, 85 °C por 5 minutos e transferida para um recipiente com gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 1 µL (2 U) da enzima *E. coli* RNase H e a reação foi incubada a 37 °C por 20 minutos.

As concentrações médias do cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria e apresentaram em média 757 ng/µL, com quantidade mínima de 690,2 e máxima de 822,8 ng/µL. Posteriormente, o cDNA fita simples foi estocado a – 20 °C até o uso na reação de qRT - PCR. .

4.5. PCR Quantitativa em Tempo Real

4.5.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequências de nucleotídeos utilizadas para desenhar os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram obtidas no banco de dados *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para que não houvessem riscos dos iniciadores desenhados se anelarem em regiões intrônicas, as sequências utilizadas foram de RNA mensageiro.

Foram desenhados dois pares de iniciadores referentes aos genes alvo (CSF3 e LPO), além de outros quatro genes (EEF1A1, GAPDH, HPRT1 e RPLP0), selecionados na literatura, que foram utilizados como genes de referência. A partir daí, utilizou-se o programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2004) para o desenho dos iniciadores (Tabela 1). Os iniciadores foram selecionados levando-se em consideração o seu tamanho, o tamanho do *amplicon*, a porcentagem de citosina e guanina, temperatura de desnaturação ou fusão (*Melting Temperature* – *T_M*) e a ausência de dímeros e *hairpins*. Em seguida, as sequências dos iniciadores escolhidos foram alinhadas utilizando o algoritmo *BLAST* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) nos bancos de dados apropriados, para identificar regiões da sequência que poderiam apresentar alto grau de homologia com outras partes do genoma ou alta homologia dentro de uma família de genes. Desta maneira, iniciadores que apresentaram homologias inespecíficas foram descartados.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR

Gene	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	TM do <i>Amplicon</i> (°C)
CSF3	14	F: GCTGGAGTGGGATGCTTGA R: AAACAAGAGGCGTCACTGATG	82
LPO	45	F: TGCTGAAGAACAAGATACTGGCTAA R: CAGCGTTGCCTCCAATCC	77

pb = pares de bases; TM = Temperatura de desnaturação do *Amplicon*.

4.5.2. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para que os experimentos de qRT - PCR, que utilizam o fluoróforo *SYBR® Green*, ocorram com alta eficiência, é necessário realizar uma série de padronizações, e a primeira delas é a titulação dos oligonucleotídeos iniciadores, ou seja, realiza-se uma série de reações em que se varia a concentração dos iniciadores, o que possibilita a escolha da concentração mais adequada. Para isso, foram feitas três diluições dos iniciadores com concentrações de 100, 300 e 600 nanomolar (nM), como exemplificado em destaque na Tabela 2. Como molde da reação, foram utilizados 50 ng de *pool* de amostras de cDNA do leite, para cada par de iniciadores. Todas as reações foram feitas em triplicatas, com controles negativos para cada combinação de iniciadores, em placas ópticas de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico (LIFE TECHNOLOGIES, FOSTER, CA, USA).

Tabela 2. Variações das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.

		Iniciadores Diretos (nM)		
		100	300	600
Iniciadores	100	100/100	100/300	100/600
Reversos (nM)	300	300/100	300/300	300/600
	600	600/100	600/300	600/600

Todas as reações de qRT - PCR do presente trabalho foram realizadas em equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2009), utilizando kit *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Este kit contém todos os componentes (exceto oligonucleotídeos iniciadores, amostras e água), necessários para as reações de PCR: tampão 2X, dNTPs, MgCl₂, *SYBR Green I Dye*, *AmpliTaq Gold® DNA polimerase* e *ROX* como referência passiva. O volume final das reações era de 12,5 µL e continham *SYBR Green Master Mix* 1x, 50 ng de cDNA, iniciadores variando as concentrações e água ultrapura. Os passos do ciclo de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos. Em todas as reações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação para que a especificidade das reações fosse monitorada. Os dados gerados foram analisados com o programa *7500 software v 2.0.6* (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER, CA, USA, 2011).

Após as corridas das reações de titulação dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), os resultados foram verificados, e determinaram-se as concentrações dos iniciadores diretos (F) e reversos (R). Para os genes de referência, GAPDH e HPRT1 a concentração determinada foi de 100 nM (100/100) e para os *EEF1A1* e *RPLP0* foi de

300nM (300/300). Os genes alvo, CSF3 e LPO apresentaram concentração de 100 nM para ambos os iniciadores.

Estas concentrações foram determinadas primeiramente, escolhendo as combinações de iniciadores de menor Ct. Então, foram analisadas as curvas de desnaturação (derivada negativa da taxa de fluorescência, $-Rn'$, em função da temperatura de desnaturação, °C). As curvas mostraram picos bem definidos referentes à amplificação dos genes estudados, próximo à temperatura de melt estipulada no desenho dos iniciadores. A temperatura de desnaturação refere-se à temperatura em que 50% das moléculas encontram-se em fita simples e 50% em fita dupla. Verificou-se também ausência de dímeros e *hairpins*, ou seja, ocorreu apenas um pico bem definido referente ao gene alvo (Figura 1).

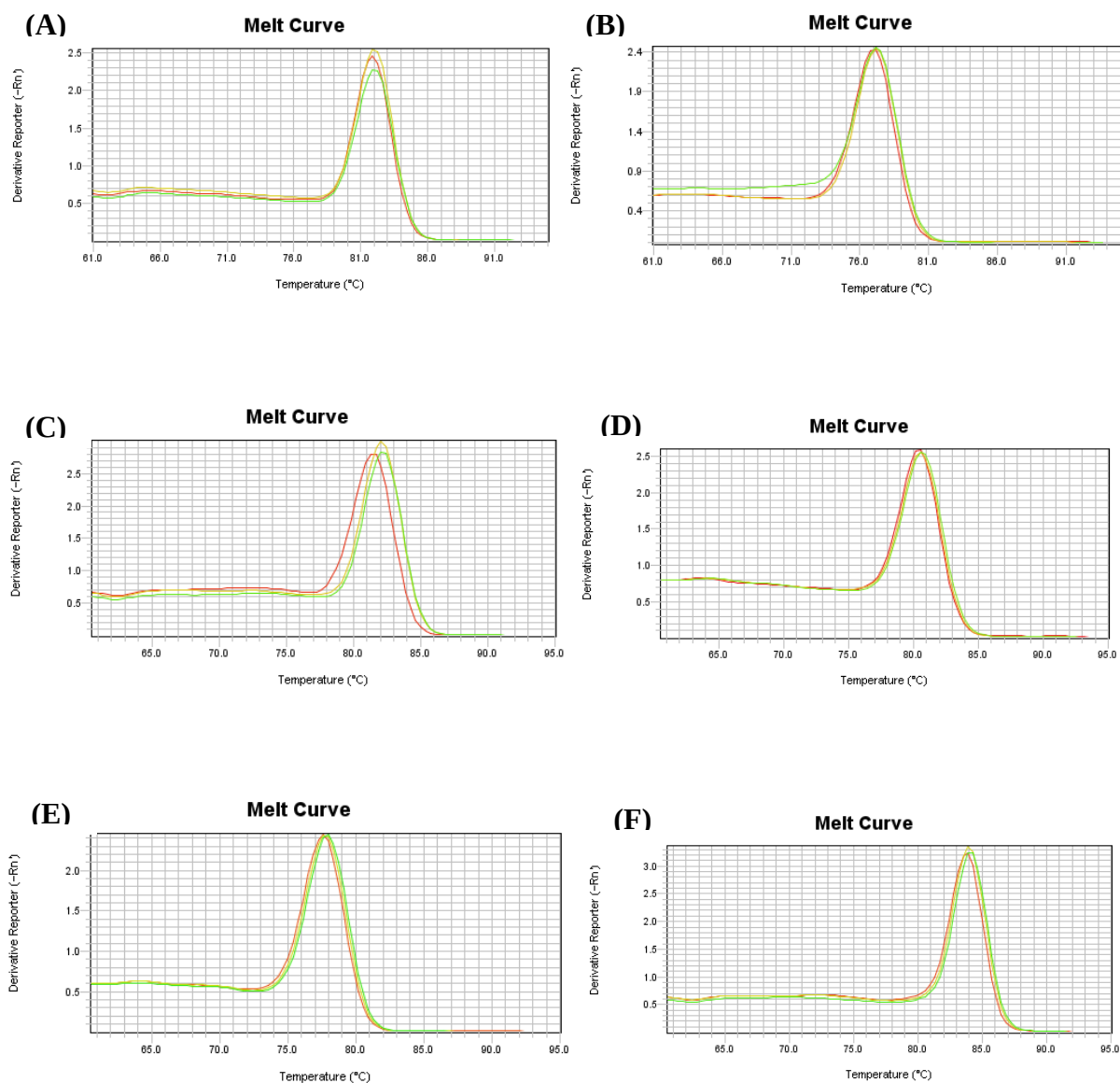


Figura 1. Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de alvo CSF3 (A) e LPO (B) e para os genes de referência EEF1A1 (C), GAPDH (D), HPRT1 (E) e RPLP0 (F).

4.5.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR

Após verificar a melhor concentração dos iniciadores a ser utilizada no experimento, foi realizada a construção de uma curva padrão para verificação da eficiência de amplificação da reação. Este passo é necessário para a validação do uso do método de quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, pois demonstra que todos os genes são amplificados com a mesma eficiência, permitindo a normalização dos genes alvo

pelos genes de referência (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para isso, foram utilizados *pools* de cDNA das amostras de leite, separadamente, em sete diluições seriadas na proporção de 2:1 (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng),

Quando necessário, alguns pontos ou replicatas técnicas foram excluídos na análise para se atingir a eficiência de 100%, mantendo-se pelo menos 5 pontos e duas replicatas técnicas em cada ponto. As reações foram realizadas em triplicatas no mesmo aparelho e sob as mesmas condições. Em todos os casos, os controles negativos foram incluídos e, após o término das reações, foi obtido um relatório com as curvas de amplificação e de dissociação geradas pelo programa de análise 7500 software v 2.0.6 (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER, CA, USA, 2011).

Após a realização das reações, a curva padrão é obtida pela regressão linear do log do valor Ct (*threshold cycle*), que representa o ciclo de PCR no qual foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal, sobre o log da quantidade inicial do ácido nucléico.

A inclinação (*slope*) de uma curva padrão é usada para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. Um coeficiente angular da curva padrão de $-3,32$ indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Os ângulos mais negativos que $-3,32$, indicam reações com menos de 100% de eficiência. Os coeficientes angulares mais positivos que $-3,32$ podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). São consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência sejam aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A eficiência da reação foi determinada a partir do coeficiente angular da curva padrão (TOO, 2003).

Quando a eficiência dos genes está dentro de um limiar aceitável (variação de 10%, ou seja, entre 90 e 110%), utiliza-se o método do Ct comparativo. No entanto, se as eficiências não são satisfatórias, lança-se mão do método da Curva Padrão para Quantificação Relativa. No presente trabalho, todos os genes obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites estabelecidos (Tabela 3), então, a quantificação relativa dos genes alvo seguiram o método do Ct comparativo (Ct).

Além disso, foram considerados, o coeficiente de correlação (r^2), maior ou igual a 0,99, garantindo assim, pequena variação entre as replicas técnicas, e a especificidade, que foi definida pela curva de desnaturação (RIRIE et al., 1997).

Tabela 3. Equações, valores de inclinação angular da reta (*slope*), coeficientes de determinação (r^2) e eficiências (e) das curvas-padrão dos grupos analisados.

Gene	Slope	Equação	r^2	e (%)
CSF3	-3,56	Y= -3,560x + 38,770	0,991	90,934
LPO	-3,534	Y= -3,534x + 34,892	0,993	91,862
EEF1A1	-3,549	Y= -3,549x + 24,654	0,994	91,31
GAPDH	-3,581	Y= -3,581x + 28,715	0,998	90,211
HPRT1	-3,558	Y= -3,558x + 33,087	0,992	91,014
RPLP0	-3,488	Y= -3,488x + 22,580	0,993	93,515

4.5.4. Escolha do Gene de Referência

O método escolhido para análise dos dados de expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) exige a utilização de genes normalizadores. Tais genes são constitutivos e devem apresentar expressão estável entre tecidos e condições variadas. Os candidatos a genes de referência EEF1A1, GAPDH, HPRT1 e RPLP0, foram inicialmente, escolhidos a partir

da literatura. Posteriormente, através das reações de qRT – PCR, foi possível avaliar a estabilidade destes genes. As taxas de expressão destes genes e suas possíveis combinações foram analisadas com os algoritmos *NormFinder* (ANDERSEN, JENSEN e ORNTTOFT, 2004). O NormFinder gera o Stability value (Figura 2), que descreve a variação de um gene em relação aos outros, levando em consideração grupos (tratamentos), possibilitando a descrição das variações inter e intra-grupo. Os valores mais baixos indicam uma expressão mais estável. Os algoritmos obtidos pelo *NormFinder* indicaram a combinação dos genes *EEF1A1* e *HPRT1* (score de estabilidade 0,219), como as melhores normalizações para o presente ensaio. Através do programa *Expression Suite Software v1.0* mensurou-se a estabilidade através do cálculo de um score, definido pela comparação das médias dos genes de referências testados. Quanto menor o score, mais estável o gene em relação aos outros genes testados. No mínimo 2 genes são necessários para o cálculo e quando existem apenas dois, o score é o mesmo para ambos (FONSECA, 2015; EXPRESSION SUITE SOFTWARE HELP, 2012).

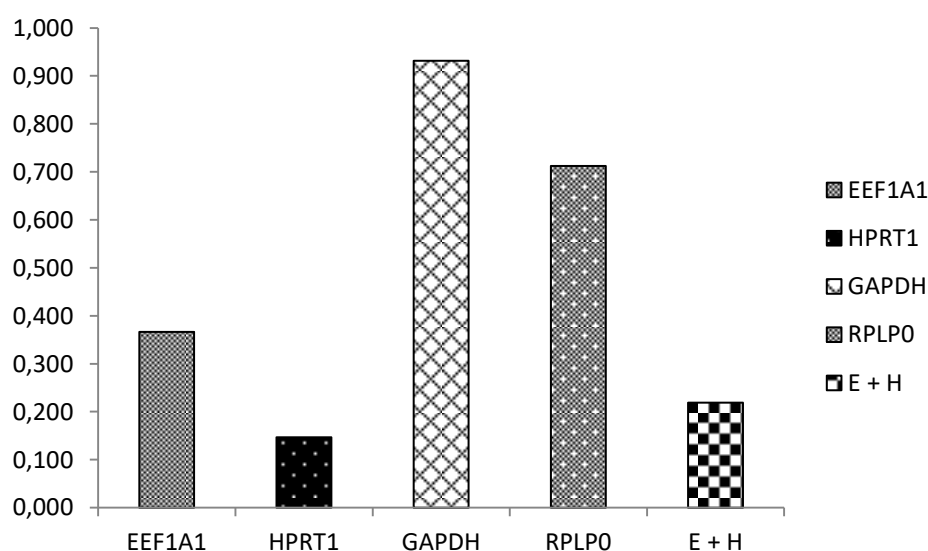


Figura 2. Estabilidade dos 4 genes candidatos a gene de referência e suas possíveis combinações segundo o programa NormFinder. O eixo Y reflete os valores de variabilidade, no qual os valores mais baixos indicam uma expressão mais estável. E+H = combinação dos genes *EEF1A1* e *HPRT1*.

4.5.5. Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

Para o método do Ct comparativo foram utilizadas placas de 96 poços. Todas as reações foram feitas em triplicatas, e o cDNA dos 24 animais (12 com mastite e 12 controle), foram quantificados em relação aos 2 genes alvo e 4 de referência. A concentração de cDNA utilizada foi de 50 ng, e foi definida através da curva de eficiência de amplificação. Além disso, usou-se um controle negativo para cada um dos genes (alvo e referência) e um controle positivo, que garantia que as reações estavam ocorrendo de forma correta, já que continham amostras previamente testadas (amostras utilizadas na titulação dos oligonucleotídeos iniciadores).

Os dados obtidos ao final da reação de qRT - PCR foram gerados na forma de valores de Ct (*threshold cycle*), que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado, que foram analisados no programa Expression Suite Software v1.0 (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER, CA, USA, 2012).

4.5.6. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizada utilizando a macro QPCR_MIXED desenvolvido em SAS (v. 9.1.3), elaborada para gerar comandos do SAS PROC MIXED próprios para analisar dados de RT-qPCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para gene referência e genes alvos em cada replicada biológicas (STEIBEL et al., 2009). Para cada variável foi realizada a análise one-way ANOVA, com efeito fixo de tratamento. Diferenças entre os tratamentos pelo teste F foram consideradas significativas ($P < 0,05$) ou tendências ($P < 0,10$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas partir do cDNA sintetizado, a partir das reações obteve-se os valores de Ct (*threshold cycle*), que representa o número de ciclos de PCR no qual foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal.

É importante ressaltar que quanto menor o Ct, maior é a expressão do gene, pois mais rapidamente foi detectado o RNA mensageiro do gene estudado. Portanto, quanto maior o Ct, menos expresso é o gene. As análises referentes às quantificações foram realizadas com os valores de Ct obtidos para cada gene.

O gene CSF3 foi significativamente mais expresso em animais com mastite em comparação com animais sem mastite ($P < 0,05$) e 5,14 vezes mais expresso na amostra alvo em comparação à amostra de referência (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão do gene CSF3 em leite de búfalas com mastite e sem mastite.

Gene	Tratamento	Ct médio	Erro Padrão	p-Valor (GxT)
CSF3	Controle	27.4784	1.7410	0.001*
	Mastite	30.3104	1.5625	

*: significativo ao nível de 5%.

O primeiro obstáculo enfrentado por um patógeno para adentrar o úbere é composto pela barreira formada pelo esfíncter do teto e pelo tampão de queratina formado pelo epitélio queratinizado. Uma vez que o microrganismo tenha atravessado o canal do teto e alcançado a

cisterna mamária, passam a atuar diversos fatores solúveis e celulares com o intuito de controlar a infecção.

Entre os moduladores imunes secretados pela glândula mamária, as citocinas merecem atenção especial (RIOLLET et al., 2000). Citocinas são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígenica (VARELLA e FORTE, 2014).

Desempenham importante papel na defesa do hospedeiro, já que regulam parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica e por apresentarem grande variação frente ao processo infeccioso, elas são consideradas promissoras no diagnóstico e na avaliação do prognóstico da saúde do úbere (CARNEIRO, 2009).

O fator estimulador de colônias (CSF) é o regulador fisiológico da produção e função dos neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa do organismo, atuando em inflamações, infecções principalmente bacterianas e lesões teciduais (LUCIDI e TAKAHIRA, 2007).

Os CSFs são produzidos em quantidade limitada *in vivo*. Entretanto, a clonagem molecular do cDNA e a sua expressão recombinante facilitaram significativamente o estudo dos seus efeitos no sistema hematopoiético, o entendimento da biologia desse fator e seu uso clínico em medicamento biotecnológico (SHERIDAN et al. 1989; CODEVILLA et al. 2004). Inúmeros estudos mostram resultados positivos na administração dessa citocina em pacientes com câncer, uma vez que a maior parte de

morbidade e mortalidade está associada a baixa taxa de neutrófilos no sangue e infecções (CODEVILLA et al. 2004).

Estudo com pacientes em tratamento quimioterápico associado ao uso da citocina rhG-CSF, reduz o tempo de recuperação dos neutrófilos, dias de hospitalização e terapias com outras drogas como antibióticos e antifúngicos (HAROUSSEAU e WU, 1995).

Nickerson (1991), demonstrou em bovinos que a IL-2 e G-CSF são importantes para o controle de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, pois aumentam a população de linfócitos e produção de anticorpos. Citocinas da família dos fatores estimulantes de colônias (CSF), atuam na regulação da resposta imune, aumentando em quantidade e qualidade os leucócitos recrutados para o sítio inflamatório e causando neutrofilia na glândula mamária e no sangue periférico, mas apesar da CCS ter aumentado no estudo de Sordillo e Daley (1995), não foi observada nenhuma relação entre esse aumento e as unidades formadoras de colônia de *S. aureus*. Contudo, o gene CSF3 apresenta grande potencial para uso como marcador molecular relacionado ao sistema imune.

. O gene LPO expressa uma proteína sintetizada na glândula mamária por íons tiocianato (SCN^-), originados por metabolismo hepático e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e outras células, para gerar produtos reativos com intensa atividade antimicrobiana. Esse foi 2,41 vezes mais expresso em animais com mastite em relação a animais sem mastite (p-valor = 0,097), não havendo diferença significativa, mas apresentando tendência ($P < 0,10$), como apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Expressão do gene LPO em leite de búfalas com mastite e sem mastite.

Gene	Tratamento	Ct médio	Erro Padrão	p-Valor (GxT)
LPO	Controle	25.4768919	3.0866807	0.097
	Mastite	26.2209720	2.8815527	

O sistema LPO, tido como fator antimicrobiano natural do leite, na presença de lactoperoxidase, tiocianato (SCN^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resulta nos ácidos hipotiocianico e hipotiocianato (CEPPA, 2013). Sua função biológica essencial está associada à proteção do trato intestinal de recém-nascidos e da glândula mamária contra microrganismos patogênicos presentes no leite (SEIFU, 2005).

A concentração da lactoperoxidase depende de fatores como raça, ciclo sexual, período de lactação, estação do ano e dieta. Em geral, em vacas, a concentração da lactoperoxidase é baixa no colostro, alcança valores máximos aos 4-5 dias pós parto, diminuindo rapidamente e estabilizando-se no resto do período de lactação (KORHONEN, 1980; REITER, 1984). Em termos de unidades de atividade enzimática UA/mL, varia muito entre as espécies, desde 0,14 até 4,45, porém determina-se a concentração mínima de 0,02 UA/mL para ação bactericida na presença de tiocianato e peróxido de hidrogênio (SEIFU et al., 2005; REITER, 1984). Foram encontradas concentrações de 1,2 a 19,4 em leite de vaca (BJORCK et al., 1975; REITER 1984; REITER e HARNULV, 1984); em ovelha 0,14 a 2,38 (MEDINA et al. 1989); em cabra 0,95 a 2,15 (ZAPICO et al., 1991) e búfalas 0,9 UA/mL (HARNULV e KANDASAMY, 1982).

O sistema LPO tem apresentado grande importância na preservação do leite uma vez que é um sistema de proteção biológica natural dos animais e não introduz substâncias que não são metabólitos normais. Os componentes metabólitos do sistema LP (lactoperoxidase, íon tiocianato e hipotiocianato), são detectados normalmente em tecidos e secreções animais, incluindo o leite. As concentrações da enzima lactoperoxidase não são alteradas, a ativação do sistema é feita aumentando os níveis de peróxido de hidrogênio introduzidos no leite, via percarbonato de sódio, considerados aceitáveis pela Articulação FAO/WHO do Comitê Especialista em Aditivos Alimentares JECFA (FAO/WHO, 1990).

O tiocianato (SCN^-) é uma substância presente nos órgãos, fluídos (linfático, plasmático e espinhal) e secreções, sendo suas concentrações variáveis nos diversos fluidos e secreções.

A quantidade de tiocianato no leite são reflexos das concentrações sanguíneas, que variam de acordo com a raça, saúde do úbere, fatores fisiológicos e tipo de alimentos (KUSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000). As principais fontes de SCN^- são os glucosinolatos presentes nas hortaliças e os glucosídeos cianogênicos presentes em diversas fontes alimentares, como por exemplo no milho (REITER e HARNULV, 1984).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode ser formado endogenamente pelos leucócitos durante o processo de fagocitose, células epiteliais e por um conjunto de bactérias como os *lactobacilos*, *lactococos* e *estreptococos* (WOFSON e SUMNER, 1993). A LPO catalisa a peroxidação do tiocianato, gerando produtos que podem inativar ou inibir a multiplicação de muitas espécies de microrganismos. Em condições aeróbicas, *lactobacilos*, *lactococos* e *estreptococos* podem ativar o sistema LPO

(KUSSENDRAGER e VAN HOOIJDONK, 2000; CARNEIRO, 2009). No entanto, a baixa tensão de oxigênio na glândula mamária pode inibir a produção de peróxido de hidrogênio, limitando a efetividade desse sistema antimicrobiano (SORDILLO e STREICHER, 2002).

A expressão da atividade do sistema LPO pode ser bacteriostática e/ou bactericida, o que dependerá da susceptibilidade dos microrganismos, do tipo de doador de elétrons nas proteínas da membrana, da temperatura e do pH (LINS, 2013).

Segundo Lins (2013), diferentes grupos de bactérias mostram um grau variável de sensibilidade ao sistema LPO. Nas bactérias Gram-negativas, catalase positivas como coliformes, pseudomonas e salmonelas, o sistema possui ação não somente inibidora como também bactericida, dependendo das condições do meio, como o pH, temperatura e tempo de incubação (REITER, 1984; LINS, 2013). As bactérias Gram-positivas, catalase negativa, como *Streptococos*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são mais resistentes e, nesse caso, o sistema LPO possui somente ação inibidora sobre seus crescimentos. Essa diferença de sensibilidade ao sistema LPO pode provavelmente ser explicada pelas diferenças na estrutura da parede celular e suas propriedades, assim como pelos compostos inibidores gerados pelas mesmas. A membrana interna das bactérias Gram-negativas parece ser mais danificada pelo tratamento do sistema LPO que a de espécies Gram-positivas (REITER e HARNULV, 1984; DE WIT; VAN HOOYDONK, 1996; KUSSENDRAGER e VAN HOOIJDONK, 2000).

Além disso, o H_2O_2 , pode ter procedência exógena, podendo ser adicionado na forma de percarbonato de sódio ou peróxido de magnésio (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000). Segundo Pérez (1987), o excesso de peróxido inibe a ação da

enzima lactoperoxidase, quando se adiciona água oxigenada no leite em valores acima de 60 mmoles/L, a enzima se torna inativa. De acordo com Bjorck (1992), a ativação do sistema LP requer concentrações mínimas de H_2O_2 , sendo que para ativação exógena em leite é de 8 mg/L.

Dados na literatura demonstram que desde 1920, já era observado que o leite fresco apresentava ação bactericida contra *Bacillus typhosa* e *B. paratyphosa*. Hanssen (1924), correlacionou esse efeito com a presença de enzimas oxidantes no leite. Wright e Tramer (1958) verificaram que a enzima LPO estava envolvida na inibição de estreptococos lácticos utilizados como enzimas na fabricação de queijos. Portmann e Auclair (1959) notaram que, ao inativar a enzima LPO, o efeito inibitório do leite desaparecia, e acrescentando lactoperoxidase pura era restabelecida a atividade inibitória. Kumar e Mathur (1989), observaram que o leite de búfala, ativado pelo sistema LPO, apresentou menor retenção de umidade e lenta taxa de desenvolvimento do ácido láctico. Abdou et al. (1996), demonstraram que o tratamento de vaca e búfala com LPO e peróxido de hidrogênio aumentou o rendimento do queijo.

A mastite é uma doença multifatorial e afetada por muitos genes, sendo necessário mais estudos com animais em diferentes fases de infecção e incluindo outros genes para compreender o mecanismo de resposta imune relacionado a mastite. Estas pesquisas podem ajudar a entender como ocorrem as reações imunológicas em resposta a esta doença que afeta de maneira significativa a produção de leite.

6. CONCLUSÃO

O gene CSF3 foi significativamente mais expresso em animais com mastite em comparação com animais sem mastite, demonstrando sua importância no seu uso no diagnóstico e prognóstico das mastites.

O gene LPO não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os animais com mastite e os animais livres de infecção. No entanto, este foi 2,41 vezes mais expresso em animais com mastite. Considerando que a mastite é uma doença multifatorial e afetada por muitos genes, identificou-se a necessidade de mais estudos incluindo maior número de amostras, condições experimentais específicas, novos genes e vias metabólicas para maior entendimento sobre mecanismos fisiopatológicos da mastite.

7. REFERENCIAS

ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo. Disponível em: www.bufalo.com.br

ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2010. 360 p

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.77-83, 2005.

BASTIANETTO, E., AMARAL, F.R., CARVALHO, L.B., OLIVEIRA, D.A.A, LEITE, R.C.. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco - Minas Gerais **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p.55-56, 2005. Disponível em www.cbra.org.br

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BERNARDES, O. Anais do IV Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira (SIMLEITE) – 31/10 a 02/11- Viçosa – MG Brasil, 2013.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 28-37, 2004.

BJORCK, L.; CLAESON, O. Correlation between the concentration of hypotiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. **J Dairy Sci**. v. 63, p. 919-922, 1980.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. **FAO. Buffalo production and research**. Roma: FAO, p.1-39, 2005.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

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, set, 2009.

CARVALHO, L. B. **Padrão de infecção intramamária em búfalas (*Bubalus bubalis*) da região do Alto São Francisco**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 37 f, 2005.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **J Dairy Sci**, v.85, p.2885-2889, 2002.

CODEVILLA, C. F.; BARTH, T.; BRUM JUNIOR, L.; FRONZA, M.; DALMORA, S. L. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, p. 104-108, 2004.

COSTA, E. O.; GARINO, J., F.; WATANABE, E. T. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). In: **World Buffalo Congress**, Caserta, Itália. Anais... Caserta: World Buffalo Congress, p. 631-634, 1997.

De FRANCISCIS, G., Di PALO, R. Buffalo milkproduction. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. Proceedings ...São Paulo: **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos**.1994. p.137-145.

FAO, IFAD and WFP. The State of Food Insecurity in the World 2013. The multiple dimensions of food security. Rome, FAO, 2013.

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.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the Somatic Cell Count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, v.6, p.26-27,2000.

GOMES, F.R. Expressão do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito Humano Recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli*. [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; São Paulo, 2010.

HARMON, R. J. Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. **J Dairy Sci**, v.77, n. 7, p.2103- 2112, 1994.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res** 6: 986–993, 1996.

HOCQUETTE, J. F. Where are we in genomics? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 37-70, 2005.

IBGE, 2012. Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, n. p.167-188, 1981.

KOKSAL, Z.; ALIM, Z.; BEYDEMIR, S.; OZDEMIR, H. Potent Inhibitory Effects of Some Phenolic Acids on Lactoperoxidase. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2016. DOI: 10.1002 / jbt.21819.

KUMAR, R.; BHATIA, K. L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey In: **World Buffalo Congress**, 4, 1994.

KUNIECHICK, N. Produção Do Fator Estimulador De Colônias De Granulócitos Humano Recombinante (rhG-CSF) EM Biorreator. [Dissertação]. da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

KUSSENDRAGER, K. D.; VAN HOOIJDONK A. C. M. Lactoperoxidase; Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.** v. 84, p. 519-525, 2000.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, Carlsbad, CA, USA, 2012. Disponível em: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf>. Acesso em: 09/06/2015.

LINS, L. F. Influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotólicas do leite nas características do queijo prato durante a maturação. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/4944>

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.

LUCIDI, C.A.; TAKAHIRA, R.K. Granulocyte colony-stimulating factor use in neutropenias in dogs and cats. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.915-920, 2007.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MARTINS, A.; HAN, J.; KIM, S. O. The Multifaceted Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Immunomodulation and Potential Roles in Intestinal Immune Homeostasis, **IUBMB Life**. 2010 Aug; 62(8): 611–617. DOI: 10.1002/iub.361

NICKERSON, S. C. Effect of cytokines on bovine mammary gland immunity. **SAAS Bull Biochemistry Biotechnol**, v.4, p.60-67, 1991.

SAS INSTITUTE INC. SAS system for Microsoft Windows: release 9.00. Cary, 2002.

PELTVERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, 332 p, 2008.

PEREIRA, R. G. A. Produção diária de leite e curva de lactação de búfalas mestiças sob dois sistemas de produção em Rondônia. 2007. Tese apresentada ao programa de doutorado Integrado em Zootecnia, área de Produção Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <<http://www.pgz.ufrpe.br/br/files/teses07/Ricardo%20Gomes%20Araujo%20Pereira.pdf>>

PERRAUDIN, J.P.; REITER, B. The role of lactoferrin and lactoperoxidase in reducing the activity of free radicals. **Proceedings of the second International whey conference held in Chicago, USA**. Brussels (Belgium): International Dairy Federation. p. 327-332, 1998.

PETROVA, N.; TZANKOVA, M.; SCC on milk from three breeds of buffaloes in Shoumen Region. *Bulg J AgricSci*, v.5, p.895-900, 1999.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis. Illinois: Babson Brothers Co. 150p, 1991.

REITER, B. Protective proteins in milk-biological significance and exploitation, *IDF Buulletin*, 191, 1-35, 1984.

REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antimicrobial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal Food Protection**, 47, p.724-732, 1984

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.

RIOLLET, C. et al. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.161-167. 2000.

RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.154-160, 1997.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, Inglaterra, n. 16, p. 137-154, 2005.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 2002 Apr;7(2):135-46.

SORDILLO, L. M.; DALEY, M. J. Role of cytokines in the prevention and treatment of mastitis. In: Meyers MJ, Murtaugh MP (Ed.). **Cytokines in animal health and disease**. New York: M Dekker, p.389-419, 1995.

TONHATI, H.; MUÑOZ, F.C.; OLIVEIRA, J.A. et al. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína de bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2051-2056, 2000.

TONHATI, H.; CAMARGO, G. M. F.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; HUTARDO-LUGO, N. A. Melhoramento Genético de bubalinos. In: Pereira, J. C. C. Melhoramento genético aplicado à produção animal. 6 ed. Belo Horizonte: **FEPMVZ Editora**, cap 19, p.468- 483, 2012.

TOO, H.P. Real time PCR quantification of GFRa-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, v.114, p.146–153, 2003.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **GenomeBiology**, v.3, n.7, p. research/0034.1-research/0034.12, 2002.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v.51, p.131-137, 1994.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, n.1, p.75-85, 2005.