

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

HYAGO PASSE PEREIRA

**ANÁLISES FUNCIONAIS *IN SILICO* DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Streptococcus*
agalactiae EM ÚBERES EXTRACORPÓREOS BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA
2019

HYAGO PASSE PEREIRA

**ANÁLISES FUNCIONAIS *IN SILICO* DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Streptococcus*
agalactiae EM ÚBERES EXTRACORPÓREOS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Marta Fonseca Martins

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Lucas Lima Verardo

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira, Hyago Passe.

Análises funcionais in silico de genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos / Hyago Passe Pereira. -- 2019.

65 p.

Orientadora: Marta Fonseca Martins

Coorientadora: Lucas Lima Verardo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Fatores de Transcrição. 2. MicroRNAs. 3. Rede Gênica. 4. Resposta Inflamatória. 5. Processos Biológicos. I. Martins, Marta Fonseca, orient. II. Verardo, Lucas Lima, coorient. III. Título.

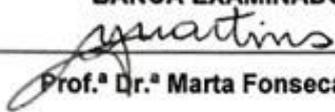
HYAGO PASSE PEREIRA

Análises funcionais *in silico* de genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 04/02/2019

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Marta Fonseca Martins

Orientadora

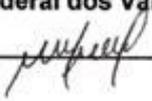
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Prof. Dr. Lucas Lima Verardo

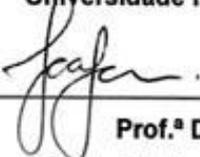
Coorientador

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Prof.ª Dr.ª Mayara Morena Del Cambre Amaral Weller

Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico a Deus...

Aos meus pais Cristina Alves Passe e Jorge Soares Pereira, pessoas de bem, que não medem esforços para realizarem os sonhos dos seus filhos, que se tornaram seus próprios sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores e funcionários da UFJF.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCBio) incluindo docentes e discentes.

A CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado e a FAPEMIG pelo financiamento do projeto APQ-00095-15 para a realização deste trabalho.

A minha orientadora, Dr^a. Marta Fonseca Martins, por ter me guiado durante esses dois anos.

Ao meu co-orientador Dr. Lucas Lima Verardo por todo apoio para o desenvolvimento deste estudo.

A Embrapa Gado de Leite e aos demais pesquisadores envolvidos neste trabalho.

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

Aos meus irmãos Wesley e Daisy, pelo afeto e cuidado tão grande que têm por mim, mesmo eu não merecendo. Amo vocês.

A minha namorada Thalita, por ter compreendido minhas ausências e por me ajudar a superar os meus medos e incertezas.

RESUMO

A mastite é uma resposta inflamatória da glândula mamária caracterizada por um influxo de células somáticas, compostas principalmente por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, em resposta à infecção por patógenos. A velocidade e a eficácia da resposta imune do hospedeiro a patógenos afetam o estabelecimento, a persistência e a gravidade da infecção. Dentre os patógenos causadores da mastite, o *Streptococcus agalactiae* é um dos principais e em bovinos, a única doença associada à infecção por *Streptococcus agalactiae* é a mastite. Sabe-se que vias biológicas relacionadas ao desenvolvimento e ocorrência da mastite e a resposta imunológica do hospedeiro, estão concentradas na glândula mamária. Neste sentido, estudos de expressão gênica têm sido empregados para melhor compreensão de suas bases genéticas e desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético. Em trabalhos anteriores, foi identificado um grupo de genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos utilizando a técnica de RNA-Seq. No presente estudo, foram investigados quais fatores de transcrição e miRNAs estão mais relacionados com os genes diferencialmente expressos no tecido mamário, contribuindo para o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento da mastite. Foram estabelecidas redes gênicas relacionadas à resposta inflamatória em úberes extracorpóreos bovinos mestiços infectados por *Streptococcus agalactiae*. Genes (*TRL2*, *CD14*, *CXCL8* e *CCL5*) que fazem parte de importantes processos biológicos para a resposta inflamatória, como resposta celular ao lipopeptídeo bacteriano triacilado, resposta celular a lipoproteína bacteriana, resposta celular a moléculas de origem bacteriana, vias de sinalização TLR4 e resposta celular por IL1 foram identificados. Além disso, a análise de rede gene-FT permitiu destacar genes (*LOC515333*, *SAA3*, *CD14*, *NFKBIA*, *APOC2* e *LOC100335608*) e fatores de transcrição (*STAT3*, *PPARG*, *EGR1* e *NFKB1*) também com papéis biológicos relacionados à resposta imune. Foi possível também, destacar quais eram os genes que podem ser regulados pós-transcricionalmente por miRNAs, por meio da análise da rede gene-miRNA, como evidenciado pela relação entre o gene *CCL5* e o miRNA bta-miR-363. A partir destas análises funcionais, foi possível identificar genes e elementos regulatórios da expressão gênica (FT e miRNA) com evidente relação nos processos inflamatórios de glândulas mamárias infectadas por *Streptococcus agalactiae* e assim, possíveis genes candidatos para resistência a mastite em bovinos foram apresentados.

Palavras-chave: Fatores de Transcrição. MicroRNAs. Rede Gênica. Resposta Inflamatória. Processos Biológicos.

ABSTRACT

Mastitis is an inflammatory response of the mammary gland characterized by an influx of somatic cells, composed mainly of neutrophils, macrophages and lymphocytes, in response to infection by pathogens. The speed and efficacy of the host immune response to pathogens affect the establishment, persistence, and severity of the infection. Among the pathogens that cause mastitis, *Streptococcus agalactiae* is one of the major and in cattle, the only disease associated with *Streptococcus agalactiae* infection is mastitis. It is known that biological pathways related to the development and occurrence of mastitis and the immune response of the host are concentrated in the mammary gland. In this sense, gene expression studies have been used to better understand their genetic basis and the development of genetic improvement strategies. In previous studies, a group of differentially expressed genes in response to *Streptococcus agalactiae* infection in bovine extracorporeal udders was identified using the Seq RNA technique. In the present study, we investigated which transcription factors and miRNAs are more related to differentially expressed genes in the mammary tissue, contributing to the understanding of the molecular mechanisms related to the development of mastitis. Genetic networks related to the inflammatory response were established in crossbred bovine extracorporeal udders infected with *Streptococcus agalactiae*. Genes (*TRL2*, *CD14*, *CXCL8* and *CCL5*) that are part of important biological processes for the inflammatory response, such as cellular response to triacylated bacterial lipopeptide, cellular response to bacterial lipoprotein, cellular response to molecules of bacterial origin, TLR4 signaling pathways and response cell by IL1 were identified. In addition, the gene-FT network analysis allowed to highlight genes (*LOC515333*, *SAA3*, *CD14*, *NFKBIA*, *APOC2* and *LOC100335608*) and transcription factors (*STAT3*, *PPARG*, *EGR1* and *NFKB1*) with biological roles related to the immune response. It was also possible to highlight which genes could be regulated post-transcriptionally by miRNAs, through analysis of the gene-miRNA network, as evidenced by the relationship between the *CCL5* gene and the miRNA bta-miR-363. From these functional analyzes, it was possible to identify genes and regulatory elements of the gene expression (FT and miRNA) with evident relation in the inflammatory processes of mammary glands infected by *Streptococcus agalactiae* and thus, possible candidate genes for mastitis resistance in cattle were presented.

Keywords: Transcription Factors. MicroRNAs. Gene Network. Inflammatory Response. Biological Processes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Processamento do pré-miRNA pela enzima citoplasmática DICER, com formação de um miRNA maduro capaz de reconhecer um ou mais mRNA e regulá-los pós-transcricionalmente29
- Figura 2. Úbere perfundido fixado em posição ortostática no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa gado de leite.....36
- Figura 3. Esquema experimental de infecção intramamária, indicando o número de amostras do experimento. AE - anterior esquerdo, PE - posterior esquerdo, AD - anterior direito, PD - posterior direito.....37
- Figura 4. Rede dos principais processos biológicos, a partir dos genes diferencialmente expressos para a característica de resistência à mastite. Rede de grupo funcional, um zoom nos principais termos biológicos (nós amarelos) e genes (nós brancos). Nós amarelos processos biológicos (PB) ligados a genes *up-regulated*. Nós brancos com arestas amarelas representam os genes *up-regulated*. O tamanho do nó dos processos biológicos corresponde ao enriquecimento do aplicativo ClueGO43
- Figura 5. Rede gene-fator de transcrição (FTs), a partir dos FTs chave. Nós octogonais de cor vermelha representam os FTs chave. Os nós circulares representam genes diferencialmente expressos, sendo os azuis *down-regulated* e os amarelos *up-regulated*. O tamanho do nó corresponde à análise de rede do Cytoscape, onde os nós com tamanhos maiores apresentam maior número de sítios de ligação. Os nós vermelhos com bordas azuis, FTs que se ligou somente a genes *down-regulated*. Nós quadrados rosa representam processos biológicos relacionados com os FTs47
- Figura 6. Rede gene-miRNA. Nós azuis circulares miRNAs *down-regulated*; nós amarelos circulares miRNAs *up-regulated*. Nós azuis em forma de diamante são genes *down-regulated*; nós amarelos em forma de diamante genes *up-regulated*. Os nós quadrados rosa representam as evidencias relacionadas com os miRNAs51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de 5% dos genes <i>up</i> e <i>down-regulated</i> no tecido alveolar mamário 3 h pós-inoculação com <i>Streptococcus agalactiae</i> de quartos inoculados em comparação com quartos não inoculados.....	39
Tabela 2. Fatores de transcrição candidatos (FT) dos grupos de genes <i>up</i> e <i>down-regulated</i>	46
Tabela 3. Fatores de transcrição chave associados ao grupo de genes, seu processo biológico e literatura relacionadas à resposta inflamatória	46
Tabela 4. Lista miRNAs <i>up</i> e <i>down-regulated</i> no tecido alveolar mamário 3 h pós-inoculação com <i>Streptococcus agalactiae</i> de quartos inoculados em comparação com quartos não inoculados	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCC4	“ <i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 4</i> ” ATP Cassete de Ligação Subfamília C Membro 4
APCs	“ <i>Antigen presenting cells</i> ” Células apresentadoras de antígenos
APOC2	“ <i>Apolipoprotein C2</i> ” Apolipoproteína C2
aRNA	RNA de ativação
BiNGO	“ <i>Biological Networks Gene Ontology</i> ” Redes Biológicas de Ontologia Gênica
CBT	Contagem de Bactéria Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCL5	“ <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> ” Ligante 5 da quimiocina (motivo CC)
CD14	“ <i>Cluster of Differentiation 14</i> ” Cluster de Diferenciação 14
CD46	“ <i>Cluster of Differentiation 46</i> ” Cluster de Diferenciação 46
CXCL8	“ <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i> ” Ligante de quimiocina CXC Motivo 8
DBDs	“ <i>DNA binding domain</i> ” Domínio de ligação ao DNA
DCs	“ <i>Dendritic cells</i> ” Células dendríticas
DRAM1	“ <i>DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 1</i> ” Modulador de Autofagia Regulada por Dano ao DNA 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGR1	“ <i>Early Growth Response 1</i> ” Resposta inicial ao crescimento 1
FABP3	“ <i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> ” Proteína 3 de Ligação a Ácidos Graxos
FABP4	“ <i>Fatty Acid Binding Protein 4</i> ” Proteína 4 de Ligação a Ácidos Graxos
FOS	“ <i>Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i> ” Proto-Oncogene Fos, Subunidade Fator de Transcrição AP-1
FOXA2	“ <i>Forkhead Box A2</i> ” Caixa de Forquilha A2
FTs	Fatores de Transcrição
FT-chave	Fatores de Transcrição chave
GO	“ <i>Gene Ontology</i> ” Ontologia Gênica
GWAS	“ <i>Genome-Wide Association Study</i> ” Estudo de Associação Genômica Ampla

IL-1	“ <i>Interleukin-1</i> ” Interleucina-1
IL-6	“ <i>Interleukin-6</i> ” Interleucina-6
IL-8	“ <i>Interleukin-8</i> ” Interleucina-8
LIPIN 1	“ <i>Lipin 1</i> ” Lipin 1
iRNA	RNA de interferência
LPS	Lipopolissacarídeo
miRNA	MicroRNA
NFKB1	“ <i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i> ” Subunidade Kappa B do Fator Nuclear 1
NFKBIA	“ <i>NFKB Inhibitor Alpha</i> ” Inibidor Alfa NFKB
NF-KAPPAB	“ <i>Factor Nuclear Kappa B</i> ” Fator Nuclear Kappa B
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
PAMPs	“ <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> ” Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBs	Processos Biológicos
PMNs	“ <i>Polymorphonuclear neutrophils</i> ” Neutrófilos polimorfonucleares
PPARG	“ <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i> ” Receptor Gama Ativado de Proliferador de Peroxissomo
PRR	“ <i>Standard recognition receivers</i> ” Receptores de reconhecimento padrão
qRT-PCR	“ <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> ” Reação em cadeia da polimerase transcrição reversa quantitativa em tempo real
QTLs	“ <i>Quantitative Traits Loci</i> ” Loci de Características Quantitativas
RNA-Seq	“ <i>RNA sequencing</i> ” Sequenciamento de RNA
RIN	“ <i>RNA Integrity Number</i> ” Número de Integridade do RNA
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
siRNA	“ <i>small interfering RNA</i> ” Pequeno RNA interferente
SAA3	“ <i>Serum amyloid A3</i> ” Amilóide Sérico A3
saRNA	Pequeno RNA de ativação

SCD	“ <i>Stearoyl-CoA Desaturase</i> ” Desaturase de estearil-CoA
SNP's	“ <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> ” Polimorfismos de Nucleotídeo Único
STAT3	“ <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> ” Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TFBS	“ <i>Transcription factor binding site</i> ” Sítios de Ligação dos Fatores de Transcrição
TFMExplorer	“ <i>Transcription Factor Matrix Explorer</i> ” Explorador Matriz de Fatores de Transcrição
TLR1	“ <i>Toll-like receptor 1</i> ” Receptor Toll-like 1
TLR2	“ <i>Toll-like receptor 2</i> ” Receptor Toll-like 2
TLR6	“ <i>Toll-like receptor 6</i> ” Receptor Toll-like 6
TP-53	“ <i>Tumor Protein P53</i> ” Proteína Tumoral P53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	MASTITE	17
1.1.1	RESISTÊNCIA À MASTITE.....	20
1.1.2	RESPOSTA IMUNE A INFECÇÃO POR PATÓGENOS EM BOVINOS...	22
1.1.3	GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À MASTITE	23
1.2	EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
1.2.1	ANÁLISE DE TRANSCRITOS.....	25
1.2.2	FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	26
1.2.3	MICRORNAs (miRNAs).....	28
1.2.4	ANÁLISE DE REDE	31
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.2	MODELO EXTRACORPÓREO DA GLÂNDULA MAMÁRIA	35
3.3	INOCULAÇÃO DO ÚBERE COM O PATÓGENO <i>S. agalactiae</i>	36
3.4	COLHEITA DE AMOSTRAS DO TECIDO MAMÁRIO E EXTRAÇÃO DO RNA	36
3.5	SEQUENCIAMENTO DE RNA.....	37
3.6	REDE GENE-PROCESSOS BIOLÓGICOS	38
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO	39
3.8	REDE GENE-FT.....	39
3.9	REDE GENE-miRNA	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ANÁLISE DE REDE GENE-PROCESSOS BIOLÓGICOS	41
4.2	ANÁLISE DE REDE GENE-FT.....	44
4.3	ANÁLISE DE REDE GENE-miRNA.....	49
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem um importante papel na ordem econômica e social do agronegócio brasileiro. A produção brasileira exhibe crescimento anual acima da média mundial que garante ao Brasil a quarta posição no ranking dentre os países produtores de leite (IBGE 2017). Estima-se que em 2019 a produção brasileira de leite deve chegar a 36,9 milhões de litros (MAPA 2017), significando um crescimento de 72,3% em relação ao período de 2000-2015 (IBGE 2017).

O setor produtivo conta com várias propriedades leiteiras, distribuídas em todo território nacional. Apesar de esse setor criar oportunidades de crescimento, também gera desafios devido sua extensão e condições variáveis. O crescimento da cadeia produtiva do leite poderia ser ainda maior se alguns fatores negativos fossem resolvidos (ZOCCAL et al., 2012). Dentre os principais fatores destaca-se o potencial genético dos animais. Considerando o potencial genético dos animais, uma das características pouco explorada é o controle de doenças causadas por microrganismos como a mastite.

A mastite é responsável por importantes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, uma vez que provoca alterações no volume e qualidade do leite produzido além de gerar preocupação com o bem-estar animal e à saúde humana (CONTRERAS e RODRÍGUEZ, 2011). A mastite pode ser definida como uma inflamação da glândula mamária que pode ser causada por alterações metabólicas, fisiológicas, traumas ou mais frequentemente, por microrganismos patogênicos ambientais ou contagiosos (ZADOKS et al., 2011). Esta resposta inflamatória é composta por um influxo de células somáticas, caracterizado inicialmente pelo envolvimento de neutrófilos, seguido de macrófagos e na fase final por fibroblastos, que juntos resultam em aumento da celularidade no tecido, evoluindo para fibrose e causando a involução da glândula mamária (RAINARD; RIOLLET, 2003). A velocidade e eficácia da resposta imune do hospedeiro contra o patógeno invasivo, afeta o estabelecimento e persistência da infecção (RAINARD; RIOLLET, 2006).

Dentre os patógenos que causam a mastite, a bactéria *S. agalactiae* é uma das mais frequentes no rebanho. Em bovinos, a mastite é a única doença

associada à infecção por *S. agalactiae*, uma bactéria gram-positiva que é transmitida apenas de forma contagiosa dentro do rebanho, ou seja, de uma vaca para outra (NEAVE et al., 1969; KEEFE, 1997). Diante da grande importância como patógeno causador de mastite, em 2011 foi publicada a primeira sequência do genoma completo de uma cepa de *S. agalactiae* isolada de uma vaca com mastite clínica (RICHARDS et al., 2011).

Nos últimos anos, tem sido descrito uma grande variedade de perfis imunológicos e respostas associadas após infecção da glândula mamária com bactérias gram-positivas (ALLUWAIMI et al., 2003; DENIS et al., 2006; FONSECA et al., 2015) e gram-negativas (LAHOUASSA et al., 2007; PETZL et al., 2008). Sabe-se que vias biológicas relacionadas ao desenvolvimento e ocorrência da mastite e a resposta imunológica do hospedeiro, estão concentradas na glândula mamária (CARNEIRO et al., 2009). Por isso, a investigação de genes transcritos no tecido mamário que codificam componentes de diversas vias biológicas e processos celulares fisiológicos importantes para a produção animal, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento da mastite. Assim, a associação do padrão de expressão gênica com fenótipos como a presença ou ausência de doenças aliadas a análises funcionais dos transcritos diferencialmente expressos, possibilitam investigar as interações gênicas relacionadas à resistência à mastite.

A análise funcional via redes gênicas, constitui uma estratégia relevante para desvendar mecanismos moleculares. Estas redes são utilizadas para expor vias metabólicas compartilhadas por genes, anotações de processos biológicos, assim como destacar outras moléculas relacionadas com a expressão gênica como, fatores de transcrição (FTs) e miRNAs (FORTES et al., 2010). A análise de redes gênicas para a característica de resistência a mastite, pode auxiliar no melhor entendimento dos principais genes, FTs e miRNAs quanto suas relações funcionais com a resposta inflamatória.

Desta forma, este estudo tem como objetivo estabelecer redes gênicas funcionais relacionadas com processos de resposta inflamatória em úberes extracorpóreos bovinos infectados por *S. agalactiae*, a fim de contribuir sobre o conhecimento dos genes envolvidos na resistência à mastite e a utilização dessas

informações nos programas de melhoramento animal, por meio da seleção de animais geneticamente superiores ou por edição gênica.

1.1 MASTITE

A mastite é considerada a doença de maior incidência nos rebanhos bovinos do mundo, destacando-se por causar grandes perdas como o descarte do leite, redução na produção, gastos com tratamento e descarte do animal (HOGAN e SMITH, 1998). A mastite é classificada de duas diferentes formas. Na sua forma clínica apresenta aumento de temperatura, edema, rigidez e dor na glândula mamária, presença de grumos e pus na secreção mamária. Na forma subclínica, o patógeno infecta um ou mais quartos mamários e desenvolve a reação inflamatória, porém, não apresenta sintomas visíveis, mas altera a composição e reduz a produção de leite (RUEGG, 2001). Essa doença é caracterizada como uma resposta inflamatória da glândula mamária causada por diferentes fatores como mudanças metabólicas, fisiológicas, trauma e principalmente por infecção, destacando-se as bactérias pela maior frequência, além de fungos, algas e vírus (WATTS 1988; ZADOKS et al., 2011).

As bactérias são relatadas como os principais agentes causadores da mastite e podem ser classificadas como contagiosas e ambientais. Os patógenos ambientais mais comuns são os coliformes *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Klebsiella* spp. e outras espécies de estreptococos como a *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), sendo a *E. coli* responsável por aproximadamente 85% da mastite de origem ambiental (BRADLEY 2002). Esses microrganismos são frequentemente encontrados na água, estrume, na sujeira do ambiente e nas áreas de circulação dos animais. Já os patógenos contagiosos estão presentes nos úberes das vacas e a via primária de transmissão é de uma vaca para a outra durante a ordenha. Os microrganismos contagiosos mais comuns são as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *S. agalactiae* (RIET-CORREA et al., 2001). Essas bactérias são bem adaptadas aos hospedeiros e estão associadas com mastite subclínica e ocasionalmente podem desenvolver casos de mastite clínica (RUEGG, 2001).

A infecção causada por microrganismos envolve três fases: inicialmente o patógeno invade/penetra e desloca-se através do canal do teto; posteriormente ocorre a colonização nas cisternas da glândula mamária; e por fim, a inflamação, com o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) e aparecimento dos sinais clínicos (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). A infecção ativa o sistema imune do animal o qual sinaliza com resposta celular por meio de recrutamento de células de defesa para o local de infecção, principalmente leucócitos, sendo essa resposta percebida pelo aumento no número de células somáticas presentes no leite, e sua detecção é feita por exames microbiológicos ou por CCS (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Dentre os patógenos que causam a mastite, a bactéria *S. agalactiae* é uma das mais frequentes no rebanho. Segundo Cremonesi et al. (2005), *S. aureus* e *S. agalactiae* são os agentes mais frequentemente isolados de casos de mastite, sendo responsáveis por aproximadamente 90% das infecções intramamárias em bovinos leiteiros. Costa (2008), em estudo sobre a epidemiologia da mastite em 35 rebanhos bovinos da região sul de Minas Gerais, verificou que a *S. aureus* e *S. agalactiae* foram os dois principais patógenos associados aos casos de mastite clínica e subclínica, com prevalências de 34,29% e 21,82%, respectivamente, nos animais amostrados. Brito et al. (1999) descreveram que, em Minas Gerais, *S. agalactiae* encontra-se em 60% das propriedades das regiões da Zona da Mata e de Campos das Vertentes. Noutro estudo, Elias et al. (2012) observaram uma prevalência de 39,7% do *S. agalactiae* em propriedades localizadas em Minas Gerais. Neste estudo, nós utilizamos uma cepa de *S. agalactiae* pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Causadores de Mastite, mantida na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Em bovinos, a mastite é a única doença associada à infecção pela *S. agalactiae*, a qual é transmitida de forma contagiosa dentro do rebanho (NEAVE et al., 1969; KEEFE 1997). O contágio por *S. agalactiae* se dá principalmente por contato do ordenhador e equipamentos de ordenha contaminados. Essa bactéria é um parasito obrigatório da glândula mamária de bovinos, com baixa taxa de cura espontânea (FARNSWORTH 1987). A colonização desta bactéria na glândula mamária gera uma resposta inflamatória que é caracterizada na sua fase inicial com um influxo de células somáticas, envolvendo inicialmente o recrutamento de

neutrófilos, seguido de macrófagos, visando eliminar o patógeno intrusivo e desenvolver uma proteção a longo prazo contra infecções futuras (STAEDDEL; DARFEUILLE 2013). Na fase final, células de fibroblastos que levam a involução da glândula mamária são predominantes devido à fibrose ali estabelecida. A infecção por *S. agalactiae*, está associada à alta CCS e CBT (Contagem de Bactéria Total), diminuição da qualidade e produção de produtos lácteos, ocasionando, portanto, prejuízos à atividade leiteira (KEEFE 1997; GRÖNLUND et al., 2006).

Existe uma grande preocupação com o bem-estar do animal para realização de estudos, tanto para análise do transcriptoma, quanto para outros estudos. Devem ser levadas em consideração, alternativas que utilizem menos animais para pesquisa, pois do ponto de vista do bem-estar animal, causar uma infecção em um animal saudável para realizar estudos é injustificável.

Uma alternativa viável para estudos da glândula mamária é utilização do sistema de glândula mamária extracorpórea, as quais são coletadas após o abate de animais de descarte. O uso de glândulas mamárias perfundidas foi primeiramente proposto por Peeters e Massart (1947), sendo inicialmente perfundidos com sangue bovino. Atualmente, a maioria dos experimentos de fisiologia animal que utilizam este modelo, usa a solução de *Tyrode* para simular as condições fisiológicas e bioquímicas de um animal vivo. Este sistema possibilita uma variedade de estudos, bem como a avaliação da expressão gênica em larga escala, relacionados a doenças mamárias, como a mastite. O modelo *ex situ* de úbere extracorpóreo de vacas permite estudar a penetração dérmica, metabolismo, absorção de diferentes drogas e viabilidade tecidual (KIETZMANN et al., 1993), bem como a distribuição de antibiótico no tecido perfundido (EHINGER e KIETZMANN 2000a, b).

Úberes perfundidos são utilizados como modelo fisiológico para estudos de metabolismo da glândula mamária (HARDWICK e LINZELL, 1960; LINZELL et al., 1972; MASSART-LEEN et al., 1986), absorção cutânea de drogas e cosméticos (KIETZMANN et al. 1993; BÄUMER e KIETZMANN, 2001) e distribuição de fármacos. O uso deste modelo *in vitro* simula as condições *in vivo*, cada vez mais limitadas por aspectos éticos e práticos.

Uma das aplicações que tem mais avançado é a utilização do modelo para estudos *in vitro* da farmacocinética de substâncias administradas por via intramamária e para simulação da rota sistêmica (EHINGER e KIETZMANN 2000a e

b), sendo adequado para a seleção de drogas para posteriormente serem testados *in vivo*. Ehinger et al. (2006) estudaram a distribuição de cefoquinona na glândula mamária *in vitro* e Kietzmann et al. (2010) examinaram a distribuição de cloxacilina em úbere bovino perfundido, com a finalidade de estudar a concentração do agente antimicrobiano no tecido glandular e assegurar a eficácia antibacteriana do antibiótico. Em um estudo recente com vacas leiteiras do nosso grupo de pesquisa, demonstrou viabilidade de úberes perfundidos com solução de *Tyrode* gaseificada, para caracterizar a expressão gênica em larga escala, por meio de RNA-Seq (PINTO et al., 2017).

1.1.1 RESISTÊNCIA À MASTITE

Existe um grande número de vias metabólicas, moléculas e células atuando na característica de resistência a mastite, a tornando, uma característica muito complexa, pois depende de componentes genéticos e fatores ambientais e fisiológicos. A resistência pode ser conceituada de forma ampla, como sendo a habilidade que o hospedeiro tem de evitar a infecção ou se recuperar desta (DETILLEUX 2002). Num sentido mais restrito, a resistência à mastite pode ser definida como a capacidade do animal em impedir o estabelecimento, desenvolvimento e sobrevivência de um patógeno (RAINARD & RIOLLET 2006).

A seleção de animais geneticamente resistentes à mastite pode auxiliar na redução da doença, diminuindo os custos do sistema de produção. Geralmente, a avaliação genética para a resistência à mastite é realizada usando a contagem de células somáticas (CCS), uma vez que estas características apresentam alta correlação genética (URIOSTE et al., 2011). A CCS é relativamente fácil de ser registrada e possui herdabilidade maior do que a mastite clínica, mas, como são necessários exames laboratoriais para o seu registro, nem sempre os criadores realizam estas medidas no cotidiano.

As fêmeas bovinas têm sido selecionadas geneticamente em busca do aumento da produção de leite, devido à maior relevância econômica dessa característica. Porém, esta intensificação tem resultado em uma correlação negativa

com a saúde do úbere e a resistência a mastite (GOVIGNON-GION et al., 2012), aumentando a ocorrência da doença nos rebanhos leiteiros.

A resistência e susceptibilidade à mastite é uma característica complexa e determinada por muitos locus. Já foram encontrados QTLs (*Quantitative Traits Loci* - locus de características quantitativas) para resistência à mastite em vários cromossomos como: BTA 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27 e 29 (RUPP; BOICHARD, 2003), a partir de trabalhos de associação de dados fenotípicos com moleculares (ASHWELL et al., 1996; ASHWELL et al., 1997; BOICHARD & BISHOP, 1997; HEYEN et al., 1999; LUND et al., 2007; SAHANA et al., 2008, SCHULMAN et al., 2009). Sugimoto et al. (2006) em um estudo de identificação de QTLs, identificaram regiões fortemente relacionados com CCS nos cromossomos BTA 21 e 22. Com o desenvolvimento de novas metodologias como os chips de SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e estudos de associação ampla (GWAS) cada vez mais as características não produtivas têm se tornado mais importante em programas de melhoramento.

O fenótipo de resistência está diretamente correlacionado com mutações nos genes responsáveis pela característica (BUKHARI et al., 2015), mas, algumas vezes este fenótipo pode ser dado pela simples mudança de expressão ou então a expressão tardia do gene, quando comparado com outro fenótipo. A identificação dos níveis de expressão dos genes envolvidos com a característica de resistência é de grande importância para compreender o processo. A análise do transcriptoma permite a identificação de genes diferencialmente expressos que competem resistência à mastite. Uma vez que a mastite causa grandes perdas econômicas, é indispensável à tomada de medidas sanitárias para o controle da infecção, bem como selecionar animais mais resistentes a esta doença. A identificação dos genes responsáveis por conferir resistência aos animais e caracterização dos seus padrões de expressão pode ser usada, posteriormente, no melhoramento animal, constituindo uma abordagem efetiva para o incremento genético da resistência às doenças.

1.1.2 RESPOSTA IMUNE A INFECÇÃO POR PATÓGENOS EM BOVINOS

O sistema imune é vital para o controle de infecções, por isso a investigação dos mecanismos da característica de resposta imunológica pode levar à diminuição da incidência e impacto das doenças na produção animal (WILKIE e MALLARD, 1999; ABDEL-AZIM et al., 2005). A primeira linha de defesa do organismo contra essa doença é constituída por uma barreira física que inclui o canal e o esfíncter do teto, os quais possuem propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão relativamente eficiente. A segunda linha de defesa glandular está constituída pelo sistema imunológico, o qual envolve imunidade celular e humoral. Os linfócitos são considerados elementos essenciais na regulação e na função efetora do sistema imune, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células. Proteínas solúveis conhecidas como citocinas são componentes importantes do sistema imune inato. Por exemplo, a IL-1 β (interleucina 1 β), a IL-8 (interleucina 8) e o TNF- α (fator de necrose tumoral α) são citocinas que promovem inflamação por alterar a permeabilidade vascular, promovendo o recrutamento de leucócitos e induzindo a síntese hepática de proteínas que facilitam o reconhecimento bacteriano (BANNERMAN et al., 2006). As interleucinas (ILs) são mediadores potentes e solúveis que regulam a homeostase do sistema imune e a sua expressão é induzida em resposta a infecções bacteriana, viral, fúngica e parasitária, assim como fontes não microbianas (DINARELLO, 1998).

Sendo a resposta imune mediada por células essenciais no mecanismo de resistência, os macrófagos e as células dendríticas possuem papel importante no mesmo. Estas células são fundamentais para imunidade inata, mas também se adaptaram a desempenhar um papel central na imunidade adquirida específica. A imunidade natural predomina na primeira fase de infecção e é mediada por macrófagos, neutrófilos. Estas células apresentam em suas membranas, receptores que reconhecem classes genéricas de moléculas produzidas por vários patógenos. As bactérias possuem diferentes tipos de estrutura de parede celular, que são reconhecidas por receptores específicos da membrana plasmática. Essas estruturas são lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicana (PGN) e ácido lipoteicóico (LTA), que constituem as PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Essas PAMPs são

reconhecidas por receptores *Toll-like* (TLRs), que estão localizados na membrana endossomal. Após o reconhecimento, ou seja, da interação de PAMPs e TLRs, ocorre à indução de expressão de citocinas pró-inflamatórias que regulam a imunidade inata e adquirida (DOYLE e O'NEILL, 2006). Se os TLRs são pouco ativos, o sistema imune se enfraquece, em contraste, se são superativos podem levar a doenças como artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (O'NEILL, 2006). Whelehan et al. (2011) por meio de análises de PCR em Tempo Real confirmaram a expressão de TLRs 1 a 10 em quatro tecidos da glândula mamária de bovinos (alveolar, ducto, cisterna e canal do teto) infectados com *S. aureus*.

Os animais tendem a responder a patógenos intracelulares por meio de resposta mediada por células; e respondem a patógenos extracelulares por resposta mediada por anticorpo. Em bovinos, estas características de resposta imune adaptativa têm se mostrado com correlação genética negativa (HERNANDEZ et al., 2006). Muitos estudos têm relatado uma variedade de mediadores imunológicos regulatórios e inflamatórios com expressão diferencial nas secreções de glândulas mamárias de bovinos infectados com carga bacteriana (GINJALA e PAKKANEN, 1998; DANIEL, 2001; ALLUWAIMI et al., 2003; BRUNO et al., 2010; WHELEHAN et al., 2011; FONSECA et al. 2011; FONSECA, 2014) e genes como *IL-12*, *IL-17*, *TLR-2* e *4*, *GRO- α* e *β* (*growth related oncogene alfa e beta*) e *TGF- β 1* (*transforming growth factor beta*) têm sido constantemente citados nestes trabalhos.

1.1.3 GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À MASTITE

Com a publicação do genoma bovino pelo *The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium* et al., (2009) um novo tipo demarcador genético tornou-se mais popular e passou a ser utilizado nos programas de melhoramento genético e projetos que visam a identificação de genes para características de importância econômica em bovinos. Este tipo de marcador, denominado SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) tem como característica principal ser muito abundante no genoma. Isto possibilitou o desenvolvimento de metodologias que permitem a detecção de milhares de polimorfismos de uma única

vez. O primeiro estudo que utilizou a metodologia de WGA (*Whole Genome Association*) para identificação de SNPs que estivessem associados à CCS foi realizado por Daetwyler et al. (2008). Estes autores identificaram várias regiões que apresentavam associação significativa com CCS.

Como a resposta à mastite é uma característica complexa e envolve diferentes genes e vias celulares, os genes relacionados à resposta imune, tanto para detectar quanto para combater patógenos, são fortes candidatos a marcadores para a resistência à mastite (BEECHER et al., 2010). Em estudos de expressão gênica, Trigo et al. (2009) identificaram a expressão de citocinas envolvidas na resposta imune ao *S. agalactiae* em glândulas mamárias de camundongos. Após 6 h da infecção experimental foi observada a disseminação da bactéria aos órgãos sistêmicos e, ao mesmo tempo, infiltração maciça de células polimorfonucleares e aumento de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α e anti-inflamatória, como a IL-10. Bruno et al. (2010) estudaram animais com infecção subclínica por *Streptococcus* a partir de amostras do leite e evidenciaram que os níveis de IL-17, IL-2R α e iNOs aumentaram enquanto que as citocinas IL-6 (pro-inflamatória) e IL-10 (regulatória) apresentaram sua expressão reduzida. Já em glândulas mamárias de caprinos infectadas com *S. aureus*, Pisoni et al. (2010) evidenciaram que as classes de genes que mais se expressaram foram as citocina pró-inflamatórias IL-1 α , a quimiocina CXCL6, proteína quimiotática de granulócitos e o receptor IL-2R gama e a proteína linfotóxica- α .

Em estudos anteriores da nossa equipe, a expressão dos genes *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN- γ* e *TNF- α* foi avaliada em células do leite, comparando-se vacas híbridas e com mastite clínica das raças Gir Leiteiro e Holandesa, e verificou-se que havia diferenças significativas para os genes *IL-2*, *IL-10* e *IFN- γ* , sendo esses genes *up-regulated* (FONSECA et al., 2009). Posteriormente em outro trabalho, o nosso grupo encontrou verificou que os níveis de expressão do gene *TLR-2* estavam aumentados quando considerados animais mestiços holandês-zebu com e sem mastite clínica (FONSECA et al., 2011). Quando considerados animais da raça Gir Leiteiro, genes diferencialmente expressos foram identificados em amostras de leite de vacas infectadas artificialmente com *S. agalactiae*, em diferentes tempos após a infecção (FONSECA et al., 2015). Foi verificado que havia um grupo de genes que estavam *up-regulated* (*AATK*, *CCL2*, *CCL20*, *CD40*, *CSF2*, *GRO- α* , *IL-12*, *IL-17*, *IL-*

1β, *INHBA*, *NOS2A*, *TGF-β1*, *TLR-2* e *TLR-4*) no tempo de 24 h. Em outro estudo utilizando a técnica de RNA-Seq, foram identificados genes diferencialmente expressos (*LOC100847189*, *LOC515333*, *FOS*, *STAT3*, *NFKBIA*, *CD14*, *CCL5*, *IL8*, *SAA3* e *TLR2 up-regulated*; *LOC526630*, *LOC515887*, *SCD*, *LPIN1*, *FABP4*, *APOC2*, *FABP3*, *DRAM1* e *CD46 down-regulated*) em resposta à infecção por *S. agalactiae* em glândulas mamárias extracorpóreas bovinas (WELLER et al., no prelo).

1.2 EXPRESSÃO GÊNICA

1.2.1 ANÁLISE DE TRANSCRITOS

O termo transcriptoma pode ser caracterizado como o conjunto de todos os possíveis RNAs transcritos de um tecido em termos de tipo e quantidade (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER 2010). Análises a partir do transcriptoma permitem registrar todas as formas de transcritos, sendo possível conhecer parcialmente os constituintes do genoma e entender seus elementos funcionais, além de possibilitar a compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças em determinado tecido (WANG; GERSTEIN; SNYDER 2009).

É possível através do transcriptoma, determinar a estrutura transcricional dos genes e quantificar as mudanças nos níveis de expressão em períodos diferentes de desenvolvimento ou condições fisiológicas diferentes (COUTINHO; ROSÁRIO 2010). 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).

1.2.2 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Há várias etapas no processo da expressão gênica, e todas elas podem ser reguladas. Dessa forma, uma célula pode controlar as proteínas que sintetiza pelo controle transcricional, que determina quando e com que frequência um gene é transcrito, pelo controle de processamento, transporte de RNA e finalmente através do controle da tradução, selecionando quais mRNAs no citoplasma serão traduzidos em proteínas (ALBERTS et al., 2004). A regulação da transcrição em eucariotos é em geral muito mais complexa e atualmente menos compreendida do que o mecanismo de regulação de genes procarióticos.

Existem grandes diferenças entre organismos procariontes e eucariontes. Essa diferenciação ocorre porque os eucariontes desenvolveram uma maneira mais complexa de controlar a expressão de seus genes do que os procariontes. Esse sistema de controle de expressão baseia-se em um grupo de proteínas conhecidas como fatores de transcrição (FTs), e permite que os eucariotos alterem seus tipos de células e padrões de crescimento de várias maneiras (PHILLIPS; HOOPES, 2008).

Os FTs não são os únicos responsáveis pela regulação dos genes, eucariotos também dependem de sinalização celular, *splicing* de RNA, mecanismos de controle de siRNA e modificações de cromatina. Entretanto, os FTs que se ligam ao regulador-*cis* do DNA são responsáveis por influenciar positivamente ou negativamente a transcrição de genes específicos, determinando essencialmente se um gene em particular será "expresso" ou "não-expresso" em um organismo (LEVINE; TJIAN, 2003).

Fatores de transcrição são componentes celulares chave que regulam a expressão gênica e sua atividade determina como as células funcionam e respondem aos ambientes celulares. Conjuntos de FTs estão envolvidos na regulação da expressão gênica ao nível transcricional por ligação a elementos reguladores de DNA. Estes FTs de ligação ao DNA podem ainda ser divididos em categorias baseadas nos seus domínios de ligação ao DNA (DBDs). As sequências regulatórias *upstream* da unidade transcricional podem ser divididas em duas

categorias principais: os *upstream promoter elements* e os *enhancer elements*. Os *upstream promoter elements* possuem geralmente 100 a 200 pares de base e se localizam relativamente perto do sítio de iniciação da transcrição. Dentro destes, há sequências de DNA reconhecidas por uma grande quantidade de proteínas gerais que constituem a maquinaria multiproteica da RNA polimerase II, requerida para o reconhecimento do promotor e síntese de RNA (LEVINE; TIJAN, 2003). Os *enhancer elements* são sequências curtas de DNA encontradas mais distante do sítio de iniciação que os *upstream promoter elements* e contêm sequências reconhecidas por fatores de transcrição que se ligam especificamente a estas controlando a ativação ou repressão transcricional seletiva dos genes. A cadeia polipeptídica de ativação dos fatores de transcrição é geralmente dividida em duas regiões funcionalmente diferentes, uma se liga a sequências específicas de DNA (domínio de ligação) e outra ativa a transcrição (domínio de ativação). Estas proteínas acentuam a ligação da RNA polimerase ao promotor por contribuir com a formação de um complexo iniciador estável. Quando o fator de transcrição se liga ao *enhancer* distante do promotor, o DNA forma um loop ativando a região da proteína que participa da formação do complexo iniciador da transcrição (BRADEN; TOOZE, 1999).

Os FTs possuem a função de reconhecer e se ligar a região promotora do gene. Ralston (2008) mostrou que os FTs podem se ligar firmemente tanto dentro das células quanto *in vitro*. Após a ligação dos FTs às regiões promotoras da sequência do gene, estes interagem com outros FTs e recrutam a RNA polimerase. No entanto, a sua função pode ser positiva ou negativa, dependendo da presença de outros domínios funcionais na proteína e do impacto global de todo o complexo transcrição (LEVINE; TJIAN 2003). Alguns FTs possuem múltiplos domínios funcionais que vão além do reconhecimento da fita de DNA específica (PHILLIPS; HOOPES, 2008). Esses FTs interagem com outras moléculas como: proteínas coativadoras, complexos de remodelamento da cromatina, RNA polimerase e pequenos RNAs não codificantes.

Em suma, para que ocorra o controle da expressão gênica, é necessário que os mecanismos regulatórios estimulem ou inibam a transcrição por meio do recrutamento da maquinaria proteica requerida pela RNA polimerase II e proteínas modificadoras de cromatina para desbloquear o promotor dos genes alvos. Uma

consequência da modelagem da cromatina é a exposição ou inibição dos elementos cis aos fatores de transcrição, que podem estar na superfície do nucleossomo ou no interior dos mesmos, fazendo com que genes específicos sejam ativados ou reprimidos no momento específico. Assim, a compreensão dos mecanismos relacionados à transcrição do mRNA é um dos grandes desafios da biologia, por isso, identificar as sequências de DNA ligadas a FTs é imprescindível para elucidar a regulação transcricional da expressão gênica.

1.2.3 MICRORNAs (miRNAs)

Os MicroRNAs (miRNAs) constituem uma família de pequenos RNAs endógenos não-codificadores de proteínas, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que se anelam a sequencias complementares na região não traduzida 3' (UTRs) dos RNAs mensageiros (mRNA) mediando a repressão da tradução ou clivagem do mRNA (DJURANOVIC et al., 2012) (Figura 1). São oriundos de pequenas estruturas precursoras endógenas e, usualmente, são direcionados a loci com sequencias similares, mas não idênticas. Esses RNAs funcionam como reguladores de diversos processos em eucariotos, como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo, conformação cromossômica, oncogênese entre outros (CAMPBELL 2009).

Recentemente, os diagnósticos guiados por miRNA estão disponíveis como uma poderosa abordagem molecular para avaliar amostras clínicas por meio da detecção e/ou visualização de miRNA (GUSTAFSON et al., 2016). Em bovinos, miRNAs com expressão diferencial têm sido relatados em resposta a vários patógenos, incluindo o vírus da diarreia viral bovina, *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus aureus* (SUN et al., 2015; CASAS et al., 2016; TAXIS et al., 2017). Grandes repertórios de miRNA foram relatados no soro de bovinos infectados com MAP (FARRELL et al., 2015; LIANG et al., 2016; MALVISI et al., 2016). Juntos, esses estudos sugerem que a abundância de miRNA circulante muda durante a infecção e possivelmente se correlaciona com a gravidade da infecção.

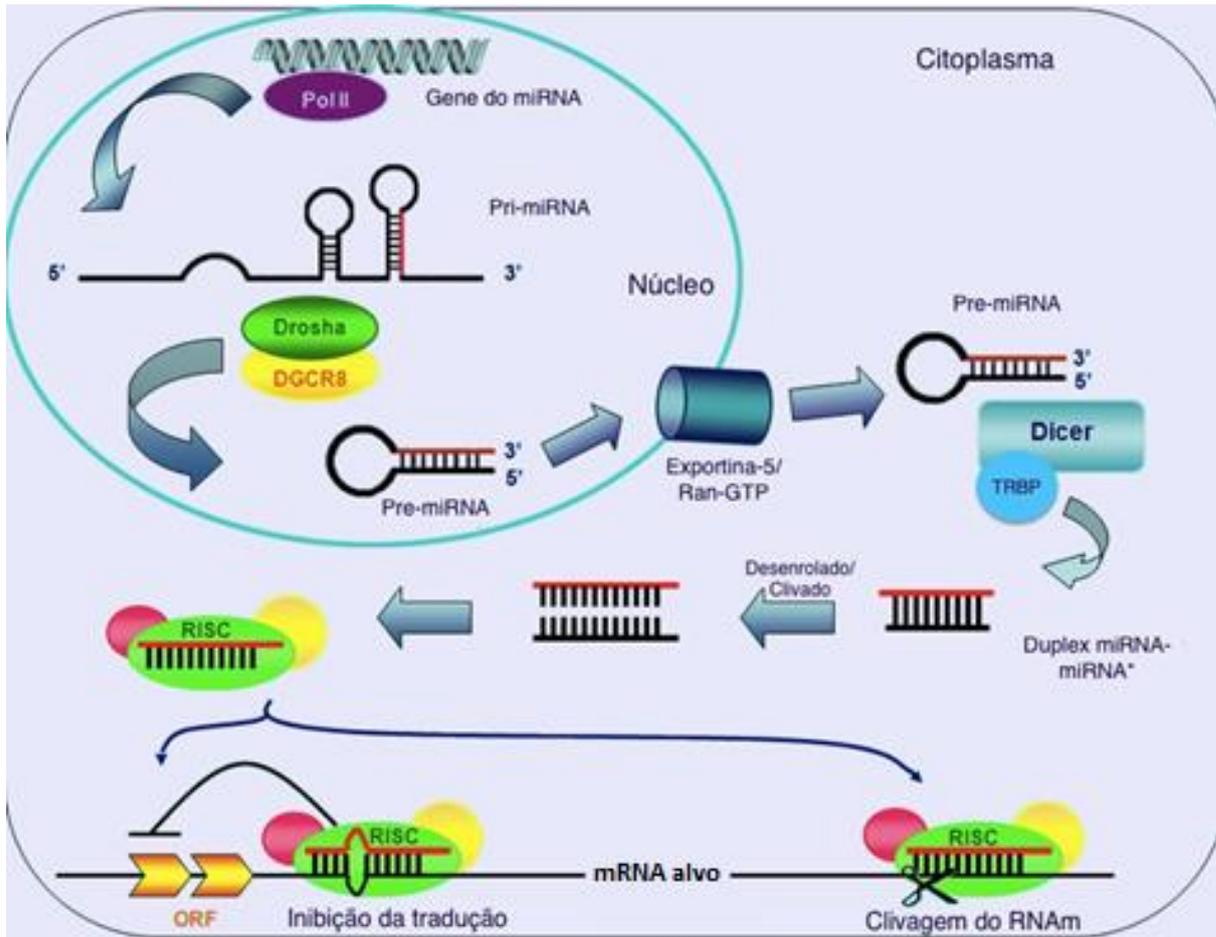


Figura 1. Processamento do pre-miRNA pela enzima citoplasmática Dicer, com formação de um miRNA maduro capaz de reconhecer um ou mais mRNA e regulá-los pós-transcricionalmente Disponível em: <<https://www.gene-quantification.de/micro-rna.html>>.

Como relatado anteriormente, o mecanismo pelo qual os miRNAs impedem a tradução do mRNA alvo dependerá do grau de complementaridade entre estas moléculas: se o pareamento for perfeito, o mRNA será clivado; se o pareamento for imperfeito, o processo de tradução do mRNA será inibido. Quando há clivagem, o ponto de corte é exatamente entre os resíduos do mRNA pareados com os nucleotídeos 10 e 11 do miRNA ou siRNA. Após a clivagem, os miRNAs permanecem intactos e podem reconhecer e processar novos transcritos (BARTEL, 2004). Já a inibição da tradução, pode ocorrer de duas maneiras diferentes: em uma delas, a velocidade de tradução é drasticamente reduzida ou totalmente interrompida logo após a iniciação, como resultado da interferência sobre o deslocamento dos ribossomos sobre o mRNA; enquanto que na outra situação, não há interferência sobre a velocidade de tradução, que prossegue normalmente, mas produz polipeptídeos não terminados que são em seguida degradados (BARTEL,

2004; PORTNOY et al., 2011). Este último mecanismo é interessante, pois a ação de múltiplos RISC sobre um único mRNA torna mais eficiente a inibição da tradução, o que explica a existência de diversos transcritos com dois ou mais sítios, na região 3'UTR, complementares a miRNA (BARTEL, 2004).

Existe também, a possibilidade de um único miRNA ser capaz de controlar de dezenas a centenas de genes. E isto é possível em função da especificidade da sua sequência, além de outras características intrínsecas ao mRNA, como composição da porção rica em "AU" próxima ao sítio de ligação do miRNA, proximidade a sítios para miRNA coexpressos, proximidade a resíduos pareando com os nucleotídeos 13 a 16 do miRNA, posicionamento na 3'UTR a pelo menos 15 nucleotídeos do códon de parada da tradução e posicionamento distanciado do centro dos UTR (GRIMSON et al., 2007). Além disso, em mamíferos a complementaridade miRNA:mRNA tende a ser imperfeita, à exceção de uma região integralmente complementar entre os resíduos 2 e 9 na extremidade 5' do miRNA conhecida como sequência *seed* (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009). A sequência *seed* é uma região presente na maioria dos miRNAs de vertebrados e invertebrados, e o mal pareamento desta, pode impedir o reconhecimento inicial do gene alvo, e por sua vez, impedindo a clivagem ou repressão da tradução, independentemente do grau de complementaridade fora desta sequência (LEWIS et al., 2003).

Novas evidências sugerem que miRNAs podem também regular positivamente a expressão gênica pela ligação a sequências reguladoras, caracterizando um novo mecanismo conhecido como ativação por RNA (PORTNOY et al., 2011). Alguns trabalhos identificaram que genes foram ativados, como p21, VEGF e genes relacionados com a ativação de receptores de progesterona e da proteína MVP, por pequenos RNAs de dupla fita (dsRNA) (LI et al., 2006; JANOWSKI et al., 2007). Esses dsRNAs, são chamados de pequenos RNAs de ativação (aRNA). Os aRNAs regulariam positivamente a expressão gênica, incluindo a ativação transcricional via direcionamento 3' (PORTNOY et al., 2011). Os mecanismos de atuação dos mesmos ainda não são bem elucidados.

Apesar do conhecimento do efeito de um conjunto de miRNAs ou de miRNAs individuais em processos celulares, nos processos inflamatórios, pouco se conhece sobre as interações existentes entre inflamação, resposta imune inata e a

expressão de miRNAs. Já se sabe que os miRNAs têm um papel fundamental no sistema imune inato e adaptativo, onde participam da diferenciação inicial de células B e de sua diferenciação após o contato com o antígeno, em células plasmáticas ou de memória, da regulação das vias de indução de linhagens de células T e da indução, função e manutenção de uma linhagem de células T reguladoras (LU & LISTON 2009).

A compreensão dos mecanismos relacionados à transcrição e pós-transcrição do mRNA é um dos grandes desafios da biologia molecular, por isso, identificar quais são os genes ligados a miRNAs é imprescindível para elucidar a regulação pós-transcricional da expressão gênica.

1.2.4 ANÁLISE DE REDE

As células devem se adaptar a todo o momento às mudanças de condições, alterando seus padrões de expressão gênica em resposta a estímulos ambientais. Um dos pontos cruciais envolve interações regulatórias transcricionais. Com o desenvolvimento de tecnologias de alta processividade como análise do perfil de transcrição baseado em RNA-Seq, houve um aumento exponencial na geração de dados genômicos funcionais. Consequentemente, a interpretação desse grande volume de dados, impulsionou o desenvolvimento de métodos e ferramentas para integração e análise dos mesmos, o que chamamos de redes biológicas (SHANNON et al., 2003). Por meio da construção de redes biológicas é possível representar múltiplas interações dentro de uma célula, uma visão geral destinada a ajudar a entender como as relações entre as moléculas ditam o comportamento celular (BLAIS; DYNLACHT 2005).

Ao sequenciar o genoma de um organismo, encontram-se os genes que codificam as proteínas sem que exista evidência estrutural de interação entre os produtos codificados. Nestes casos, outras abordagens precisam ser usadas para gerar informações sobre as funções dos genes. Determinar em quais tecidos um gene está ativo, ou quais circunstâncias causam o aparecimento da proteína

produzida por este gene, é uma informação muito importante (BUTTERWORTH 2005).

Redes biológicas são geralmente representadas por nós conectados por arestas. Os nós podem representar proteínas, genes ou substratos enzimático. As arestas representam interações moleculares diretas, interações regulatórias ou o compartilhamento de propriedades funcionais. Uma das ferramentas mais utilizadas para a construção de redes é o software Cytoscape. O Cytoscape é uma plataforma que permite a visualização de redes de interação molecular e integração dessas interações com perfis de expressão gênica e outros dados genômicos funcionais (SHANNON et al., 2003).

A integração de dados genômicos com a análise de redes constitui uma estratégia relevante para desvendar mecanismos moleculares. Redes de genes podem ser usadas para expor vias metabólicas compartilhadas, anotações de processos biológicos, bem como destacar FT e miRNAs relacionados a fenótipos específicos (FORTES et al., 2010). As redes são representadas por meio de nós conectados por arestas. Em análises transcriptômicas, os nós representam genes e as arestas representam as conexões entre esses genes, obtidas a partir de dados de co-expressão entre os genes ou genes e fatores de transcrição (MOREIRA-FILHO et al., 2014). Estudos recentes envolvendo redes de genes têm sido usados para características reprodutivas em suínos (RAMAYO-CALDAS et al. 2014; VERARDO et al., 2016a), e em bovinos, para características relacionadas à puberdade (FORTES et al., 2010).

Até o momento, análises de redes gênicas não foram aplicadas para característica de resistência a mastite. Análises da rede gene-FT e gene-miRNAs pós-transcriptômicas para a característica de resistência a mastite, podem auxiliar no melhor entendimento dos principais genes, FTs e miRNAs quanto as suas relações funcionais com a característica em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer redes gênicas relacionadas com a resposta inflamatória em úberes extracorpóreos bovinos infectados por *Streptococcus agalactiae* e identificar possíveis genes candidatos à resistência à mastite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar processos biológicos envolvidos na resposta imune e inflamatória a partir de genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por *Streptococcus agalactiae* em glândulas mamárias extracorpóreas bovinas.
2. Identificar fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes diferencialmente expressos.
3. Estabelecer uma rede gene-FT relacionada com a resposta à infecção por *Streptococcus agalactiae*.
4. Identificar miRNAs envolvidos na regulação pós-transcricional dos genes diferencialmente expressos.
5. Estabelecer uma rede gene-miRNAs relacionada com a resposta à infecção por *Streptococcus agalactiae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo é uma continuação de um projeto maior da nossa equipe da Embrapa Gado de Leite intitulado “*Análise do Transcriptoma de Glândula Mamária Extracorpórea de Bovinos em Resposta à Infecção Artificial por Streptococcus agalactiae*” (APQ-00095-15). Desta forma, em trabalhos anteriores, foram pré-selecionadas quatro vacas mestiças programadas para abate e sem histórico de doenças no úbere da Fazenda Experimental José Henrique Brusqui da Embrapa Gado de Leite, localizada em Coronel Pacheco - MG. Antes do abate, esses animais foram submetidos a exames microbiológicos, a fim de descartar qualquer tipo de infecção por patógenos, e somente as vacas que apresentaram resultado negativo para *S. agalactiae* foram selecionadas. Após o abate, foram coletados quatro úberes e perfundidos com solução de Tyrode heparanizada (NaCl 137mM; KCl 2,70mM; CaCl₂.2H₂O 1,36mM; MgCl₂ 0,50mM 6H₂O; NaH₂PO₄.H₂O a 0,36 mM; NaHCO₃ a 11,90 mM e glucose a 5,5 mM) (PINTO et al., 2017; WELLER et al., no prelo).

Os úberes perfundidos foram inoculados com a mesma cepa de *S. agalactiae* (FSL S3-026) utilizada em outros trabalhos com raça Gir pelo grupo, pertencente à coleção de microrganismos da Embrapa Gado de Leite (FONSECA et al., 2014). 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). Amostras de tecido alveolar foram coletadas nos tempos de 0h e 3h após a inoculação. Portanto, ao todo, foram obtidas 16 amostras para as análises de RNA-seq (4 vacas x 2 amostras por vaca em cada tempo x 2 tempos por amostra) (PINTO et al., 2017; WELLER et al., no prelo).

3.2 MODELO EXTRACORPÓREO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O modelo extracorpóreo foi preparado de acordo com Kietzmann et al. (1993) e Ehinger; Kietzmann (2000a, b) com algumas modificações. Foram coletados úberes saudáveis de vacas em lactação que seriam abatidas. Os úberes foram examinados visualmente e o leite foi colhido para a realização dos testes microbiológicos e contagem de células somáticas antes do abate. Após a colheita dos úberes, entre 10 a 15 minutos após o abate, foi administrado via artéria pudenda uma solução de *Tyrode* (NaCl 137mM; KCl 2,70mM; CaCl₂.2H₂O 1,36mM; MgCl₂ 0,50mM 6H₂O; NaH₂PO₄.H₂O a 0,36 mM; NaHCO₃ a 11,90 mM e glucose a 5,5 mM) e heparina 1% para impedir a formação de coágulos dentro dos vasos e consequentes obstruções. As glândulas coletadas foram transportadas em caixas isotérmicas até 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 (Figura 2) (PINTO et al., 2017; WELLER et al., no prelo).



Figura 2. Úbere perfundido fixado em posição ortostática no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa Gado de Leite.

3.3 INOCULAÇÃO DO ÚBERE COM O PATÓGENO *S. agalactiae*

Os quatro úberes perfundidos foram inoculados com 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. Foi preparado o inóculo, a partir da cultura 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 (Figura 3) (PINTO et al., 2017; WELLER et al., no prelo).

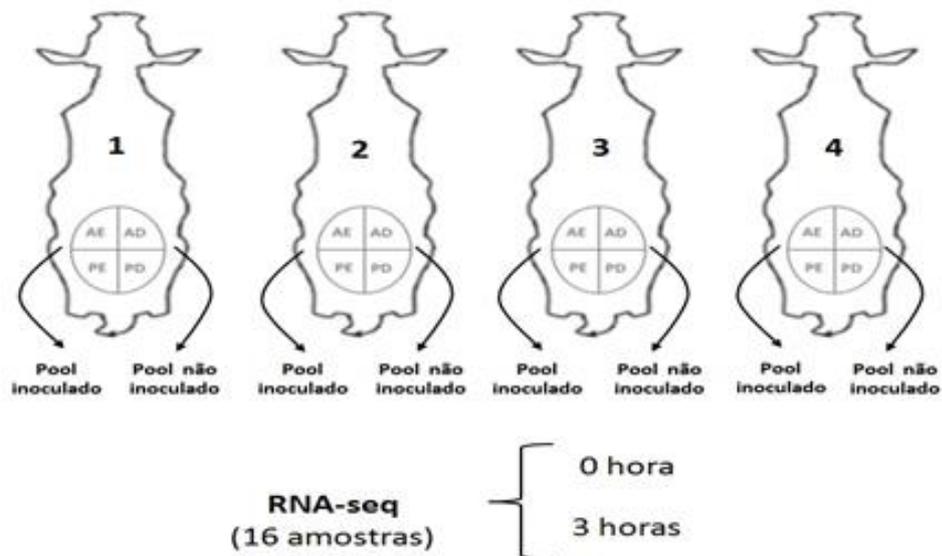


Figura 3. Esquema experimental de infecção intramamária, indicando o número de amostras do experimento. AE - anterior esquerdo, PE - posterior esquerdo, AD - anterior direito, PD - posterior direito.

3.4 COLHEITA DE AMOSTRAS DO TECIDO MAMÁRIO E EXTRAÇÃO DO RNA

Amostras do tecido alveolar de cada úbere foram colhidas por biópsia nos tempos 0 e 3 horas após a perfusão do tecido, e conservadas em RNeasy® (Ambion, Austin, TX, EUA) até a extração do RNA.

O RNA total de cada uma das amostras foi extraído com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante, seguida por tratamento com DNase para eliminar possíveis contaminantes por DNA. Foi extraído RNA dos quatro tetos (2 inoculados e 2 controles). 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 (PINTO et al., 2017; WELLER et al., no prelo).

3.5 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.

Foram geradas bibliotecas com o pool de amostras de RNA, usando o kit de preparação de amostras de RNA TruSeq (Illumina, San Diego, CA) para o sequenciamento com o analisador HiSeq 2000 (Illumina) usando o kit v3 TruSeq SBS (100 ciclos, Illumina). O sequenciamento gerou dados, os quais foram alinhados com o genoma bovino de referência UMD 3.1¹, identificando genes diferencialmente expressos usando o pacote edgeR (Galaxy tool, versão 0.0.2 ROBINSON et al., 2010; ROBINSON; OSHLACK 2010) (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo).

¹ https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index

3.6 REDE GENE-PROCESSOS BIOLÓGICOS

Com o objetivo de relacionar os grupos de genes diferencialmente expressos (*up* e *down-regulated*) (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo) com os processos biológicos (PBs), foi usado o aplicativo ClueGO Cytoscape (BINDEA et al., 2009). Usamos como arquivo de entrada no aplicativo, 5% dos genes diferencialmente expressos *up* e *down-regulated* identificados por Sbardella et al., (2019) e Weller et al., (no prelo) (Tabela 1) para destacar os papéis e relações biológicas entre eles, já que este aplicativo usa um ou mais grupos de genes e procura, com base em vasto banco de dados, termos de ontologia gênica (GO) ou vias metabólicas relacionados e estabelece ligações entre os genes e o termo escolhido.

Tabela 1. Lista de 5% dos genes *up* e *down-regulated* no tecido alveolar mamário 3 h pós-inoculação com *Streptococcus agalactiae* de quartos inoculados em comparação com quartos não inoculados.

<i>Gene up-regulated</i>			<i>Gene down-regulated</i>		
<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
LOC515333	8,48	2,45E-04	LOC526630	-8,91	5,09E-07
FOS	8,09	8,17E-05	SCD	-7,45	8,67E-06
STAT3	8,07	4,93E-05	LOC515887	-7,29	1,24E-04
NFKBIA	7,80	2,00E-04	LPIN1	-7,23	3,88E-04
CD14	7,75	4,50E-04	FABP4	-7,19	2,09E-04
CCL5	7,66	6,27E-04	APOC2	-7,05	1,61E-07
SAA3	7,63	3,91E-05	MPP6	-6,87	4,72E-04
IL8	7,34	5,00E-05	FABP3	-6,39	1,56E-04
DMXL2	7,26	3,04E-05	DRAM1	-6,39	1,19E-04
SFRP2	6,90	1,44E-05	HSPB8	-6,37	2,02E-04
CDCA2	6,66	1,52E-06	LCMT2	-6,33	5,88E-04
HYKK	6,39	2,16E-10	CD46	-6,19	7,20E-06
KDM5A	6,33	1,28E-06	LOC617415	-6,19	2,15E-04
FBN1	6,22	6,61E-05	ARSG	-6,18	4,12E-05
C20orf196	6,20	1,84E-08	CLNK	-6,15	4,55E-05
TLR2	5,78	5,00E-05	RPS26	-6,13	9,22E-06
KLK8	5,62	2,56E-05	LOC100335608	-6,11	2,50E-05
WDR63	5,61	3,36E-05	NOP16	-6,10	1,49E-04
PPP4R1	5,59	1,02E-04	KRT19	-6,05	4,83E-05
PDE3B	5,53	2,25E-04	RAB4A	-6,04	5,03E-05
MMP7	5,48	3,63E-05			
CHTF18	5,39	4,18E-05			
TTC3	5,28	2,74E-05			
LOC100139881	5,25	6,19E-08			
ABCA5	5,23	1,84E-06			
AIPL1	5,19	2,62E-07			
ATP1B3	5,15	4,58E-07			
C11orf54	5,04	8,82E-06			
SUPT6H	4,99	6,16E-05			

Fonte: Sbardella et al., (2019) e Weller et al., (no prelo)

3.7 IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Para identificar os Fatores de Transcrição (FTs) mais relacionados aos genes diferencialmente expressos para resposta inflamatória na glândula mamária foram utilizados os dois grupos de genes *up* e *down-regulated* (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo) (Tabela 1). Inicialmente foi realizada a busca pelas sequências promotoras de cada gene diferencialmente expresso (3.000 pb *upstream* e 300 pb *downstream*), a partir da montagem do genoma bovino UMD 3.1. Os dados gerados foram utilizados como entrada para o software *Transcription Factor Matrix Explorer* (TFM-Explorer)², usado para procurar sítios de ligação dos FTs (TFBS) super-representados localmente usando o banco de dados de vertebrados JASPAR (SANDELIN et al., 2004) para detectar todos os potenciais FTs.

3.8 REDE GENE-FT

A lista de FTs gerada pelo TFM-Explorer foi usada como arquivo de entrada no Cytoscape (SHANNON et al., 2003) usando a ferramenta *Biological Networks Gene Ontology* (BiNGO) (MAERE et al., 2005). Assim, foi possível determinar quais os termos GO foram significativamente super-representados assumindo padrões de correção de Bonferroni (utilizada para confirmar as significâncias dos resultados encontrados em todos os testes realizados, corrigindo os intervalos de confiança) e o teste estatístico hipergeométrico, utilizado para estimar a proporção de genes associados a um PB na amostra em relação a esperada para esse PB no banco de dados (*P-value* < 0,05). Os FT que apresentaram processos biológicos associados a respostas inflamatórias foram selecionados e uma revisão de literatura realizada para confirmar a relação entre os FTs e a resposta inflamatória (FT-chave).

Procurando identificar quais são os genes mais ligados a cada FT-chave, foi utilizado a ferramenta *NetworkAnalyzer* no Cytoscape. De acordo com número de

² <http://bioinfo.lifl.fr/tfm-explorer/form.php> Acesso em 07/11/2018

sítios de ligação como o fator de transcrição TFBS presentes nas regiões promotoras dos genes, foi possível determinar a rede gene-FT.

3.9 REDE GENE-miRNA

Para estabelecer a rede genes-miRNAs, realizamos uma busca pelos miRNAs diferencialmente expressos no arquivo de saída do RNA-Seq (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo). Após a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos, buscamos na literatura quais eram os miRNAs já relacionados com a resposta inflamatória. A partir destes miRNAs, utilizamos o software online miRWalk^{®3} para identificar quais eram os genes envolvidos com os mesmos. Posteriormente, realizamos a busca pelos genes diferencialmente expressos na lista gerada pelo software relacionados com os miRNAs.

Procurando identificar quais são os genes mais ligados a cada miRNA, uma vez que, um único miRNA pode regular somente um gene ou vários, assim como vários miRNAs podem regular um gene ou um grupo de genes, foi utilizado a ferramenta *NetworkAnalyzer* no Cytoscape®. De acordo com número de sítios de ligação entre os genes e os miRNAs, foi possível determinar a rede gene-miRNAs.

³ <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/> Acesso em 07/11/2018

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram estabelecidas redes de gene-FT e gene-miRNA a partir dos genes diferencialmente expressos previamente identificados por Sbardella et al., (2019); Weller et al., (no prelo). Os modelos utilizados para o RNA-Seq foram úberes extracorpóreos bovinos de vacas mestiças. A partir dos grupos de genes diferencialmente expressos, redes de funções biológicas entre os dois grupos de genes (*up* e *down-regulated*) foram obtidas. Desta forma, foi possível visualizar diferenças e semelhanças funcionais a partir das redes de processos biológicos geradas, as quais destacaram os papéis biológicos dos grupos de genes corroborando com os resultados de Weller et al., (no prelo). Além disso, fatores de transcrição (FTs) e MicroRNAs (miRNAs) foram identificados e selecionados os mais relacionados à resposta inflamatória para a obtenção de uma rede gene-FT e gene-miRNAs.

4.1 ANÁLISE DE REDE GENE-PROCESSOS BIOLÓGICOS

Para construir redes de genes destacando papéis biológicos e conexões entre os genes, foi usado o aplicativo ClueGO Cytoscape. Os processos biológicos mais enriquecidos na rede gene-processos biológicos relacionados à resposta inflamatória identificados neste estudo foram resposta celular a lipoproteína bacteriana e resposta celular ao lipopeptídeo bacteriano triacil sendo que os genes *TLR2* e *CD14*, ambos *up-regulated*, compartilharam estes processos biológicos. Também ficaram em destaque na rede os genes *CXCL8* e *CCL5* compartilhando os seguintes processos: resposta celular por interleucina 1 e resposta celular a moléculas de origem bacteriana (Figura 4).

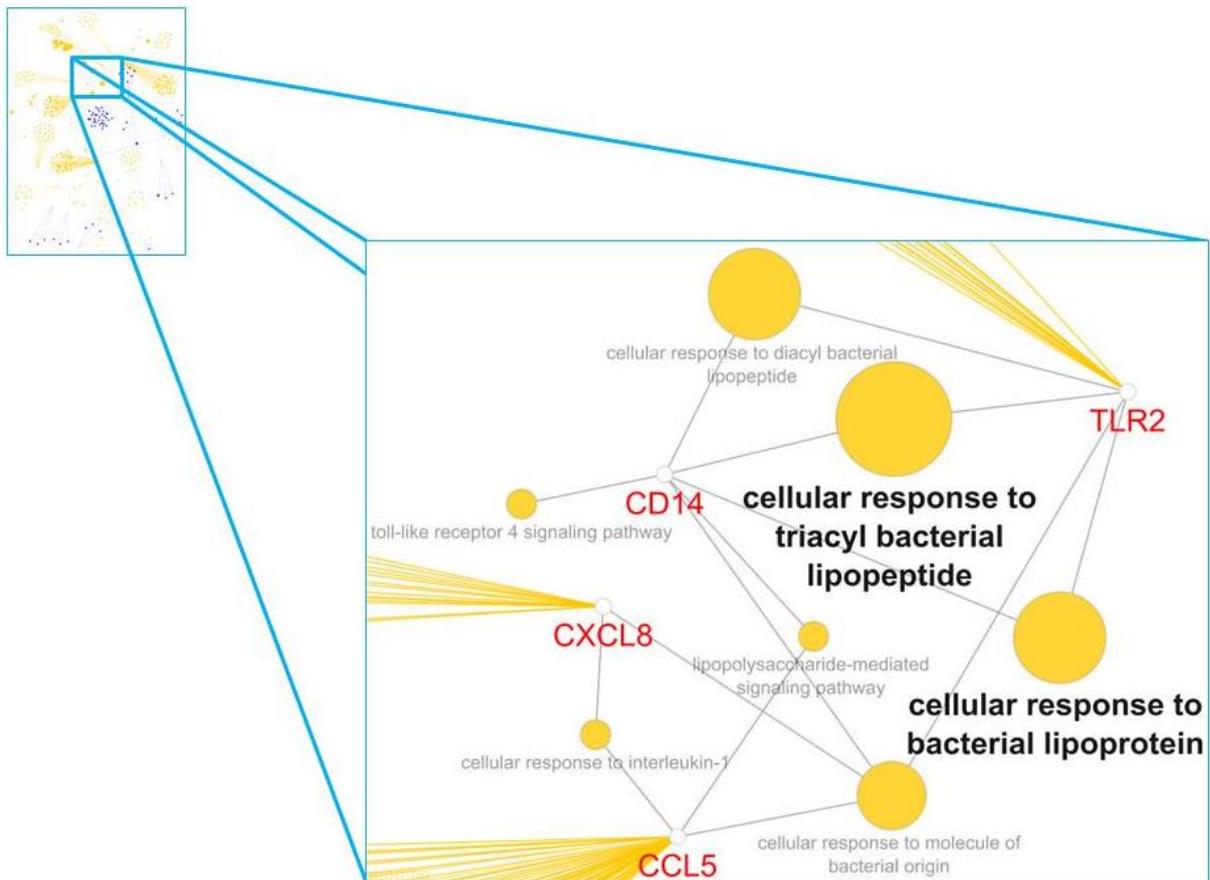


Figura 4. Rede dos principais processos biológicos, a partir dos genes diferencialmente expressos em resposta ao patógeno *Streptococcus agalactiae*. Rede de grupo funcional, um zoom nos principais termos biológicos (nós amarelos) e genes (nós brancos). Nós amarelos representam processos biológicos (PB) ligados a genes *up-regulated*. Nós brancos com arestas amarelas representam os genes *up-regulated*. O tamanho do nó dos processos biológicos corresponde ao enriquecimento do aplicativo ClueGO.

O gene *Toll-like Receptor 2 (TLR2)* forma heterodímeros com *TLR1* e *TLR6*, que é o passo inicial em uma cascata de eventos que leva a respostas imunes inatas significativas, desenvolvimento de imunidade adaptativa contra a infecção por patógenos (OLIVEIRA-NASCIMENTO 2012). A proteína *TLR2* reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) associados a bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo lipopeptídeos/ lipoproteínas e componentes de peptidoglicano (SHWEASH et al., 2011). Juntamente com o gene *CD14*, o *TLR2* reconhece a lipoproteína A, um componente do lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas (OVIEDO-BOYSO et al., 2007) mediando assim à resposta imune inata ao lipopolissacarídeo bacteriano (TSUKAMOTO et al., 2010; KELLEY et al., 2013).

O Cluster de Diferenciação 14 (*CD14*) é um gene de codificação de proteínas de superfície celular, preferencialmente expressas em

monócitos/macrófagos (KELLEY et al., 2013) sugerindo sua atuação na resposta celular de lipopeptídeos bacterianos triacilados. Entre suas vias de sinalização, o *CD14* como molécula adaptadora da via de sinalização de *TLR*, desempenha um importante papel na infecção bacteriana como um receptor de LPS de alta afinidade, que ativa as vias de sinalização intracelular, levando, em última instância, à liberação de citocinas (DA SILVA CORREIA et al., 2001). Em suínos, Thorgersen, et al. (2010) relacionaram a *CD14* às respostas inflamatórias e hemostáticas precoces em um modelo de sepse gram-negativo, como uma importante molécula de imunidade inata. Considerando tais evidências e, uma vez que o *TLR2* e *CD14* foram *up-regulated* em úberes extracorpóreos bovinos de vacas mestiças, sugere-se a atuação dos mesmos na resposta inflamatória em função da infecção por *S. agalactiae* corroborando com os achados de Weller et al., (no prelo).

Outro gene em destaque na rede de processos biológicos, o Ligante 5 da quimiocina motivo CC (*CCL5*) (*up-regulated*) é um gene de codificação de proteínas quimioatraente para monócitos do sangue, células T auxiliares de memória e eosinófilos (DARRIN 2016). Dentre as vias que atua está a via de sinalização do receptor *Toll-like* (YOSHIDA et al., 2018). As TLRs funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos como, vírus, protozoários, fungos e bactérias (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Uma das principais atividades relacionadas a esse gene é a atividade de quimiocinas, que são proteínas envolvidas em processos imunorregulatórios e inflamatórios (LIM 2005). Este gene foi sugerido por Shin et al. (2015) como um biomarcador para infecção por *Mycobacterium* em células bovinas, já que este apresentou diferença de expressão frente a infecção pelo patógeno. Dentre suas funções, o *CCL5* orchestra a migração de monócitos e células T para locais lesionados ou infectados (DARRIN 2016). No nosso estudo, o gene *CCL5* apresentou diferença de expressão frente à infecção causada por *S. agalactiae* e foi relacionado à regulação positiva de resposta a injúrias, regulação positiva da resposta inflamatória e regulação positiva da atividade da lipase. Assim, é possível que este gene seja também um candidato para infecção por *S. agalactiae*.

Por fim, o gene Ligante de quimiocina CXC Motivo 8 (*CXCL8*) é um importante mediador da resposta inflamatória, dentre suas funções, este gene recruta neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o local da infecção (GRIFFITH et al., 2014). As anotações de Ontologia Gênica (GO) relacionadas a este gene incluem atividade de quimiocinas e ligação do receptor de IL-8 em camundongos (STILLIE et al., 2009). Günther et al., (2016) avaliaram a resposta imune a diferentes patógenos em tipos celulares de úberes e constataram expressão diferencial do *CXCL8* frente a infecção por *E. coli*. Na rede de processos biológicos apresentada nesse estudo, o gene *CXCL8* foi relacionado à resposta celular por IL-1 e resposta celular a molécula de origem bacteriana.

4.2 ANÁLISE DE REDE GENE-FT

Para estabelecer a rede gene-FT, as sequências promotoras dos grupos de genes diferencialmente expressos *up* e *down-regulated* (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo) foram usadas separadamente como entrada no TFM-Explorer. Foram identificados 20 FT candidatos para o grupo de genes *up-regulated* e 22 para o grupo *down-regulated*, os quais foram usados como entrada no software Cytoscape *app* BiNGO para buscar processos biológicos enriquecidos mais relacionados com a resposta inflamatória na glândula mamária em estudo (Tabela 2). Com a análise dos processos biológicos super-representados na ferramenta BiNGO e na revisão de literatura sobre vias de resposta imune, foi possível selecionar os quatro principais FT-chave (Tabela 3). Com base nos FT-chave foi construída uma rede gene-FT (Figura 5). Esta rede forneceu uma visão geral do compartilhamento de FT-chave entre os genes, além de destacar os genes mais conectados dentro de cada grupo para resposta inflamatória (*LOC515333*, *SAA3*, *NFKBIA*, *IL8*, *CD14*, *APOC2* e *LOC100335608*).

Tabela 2. Fatores de transcrição candidatos (FT) dos grupos de genes *up* e *down-regulated*.

FT genes <i>up-regulated</i>	FT genes <i>down-regulated</i>
RELA	INSM1
Stat3	Pax2
REL	Pax5
EBF1	Stat3
NFE2L1::MafG	HIF1A::ARNT
NFYA	Myf
NFKB1	Mycn
NFATC2	YY1
NR1H2::RXRA	PPARG
SPI1	EBF1
Gata1	EWSR1-FLI1
STAT1	STAT1
NF-kappaB	REST
EWSR1-FLI1	Gfi
Nr2e3	Egr1
FOXO3	AP1
NFIL3	GABPA
Spz1	NFKB1
Tal1::Gata1	ESR1
NR3C1	NKX3-1
	RXR::RAR_DR5
	NFE2L1::MafG

Tabela 3. Fatores de transcrição chave associados aos grupos de genes, seu processo biológico e literatura relacionada à resposta inflamatória.

FT	Grupo de genes	Processo biológico (GO)	Referência
STAT3	<i>Up e down-regulated</i>	Vias de sinalização mediada por IL-6/Resposta inflamatória/Resposta ao estímulo de citocinas	Baldwin et al., 2018.
EGR1	<i>Down-regulated</i>	Desenvolvimento do sistema imune/Diferenciação de células T, linfócito e leucócito.	Kosciuczuk et al., 2017.
NFKB1	<i>Up e down-regulated</i>	Regulação da produção de citocinas/Diferenciação celular.	He et al., 2017.
PPARG	<i>Down-regulated</i>	Diferenciação de leucócitos emonócitos/ Desenvolvimento do sistema imune.	He et al., 2017.

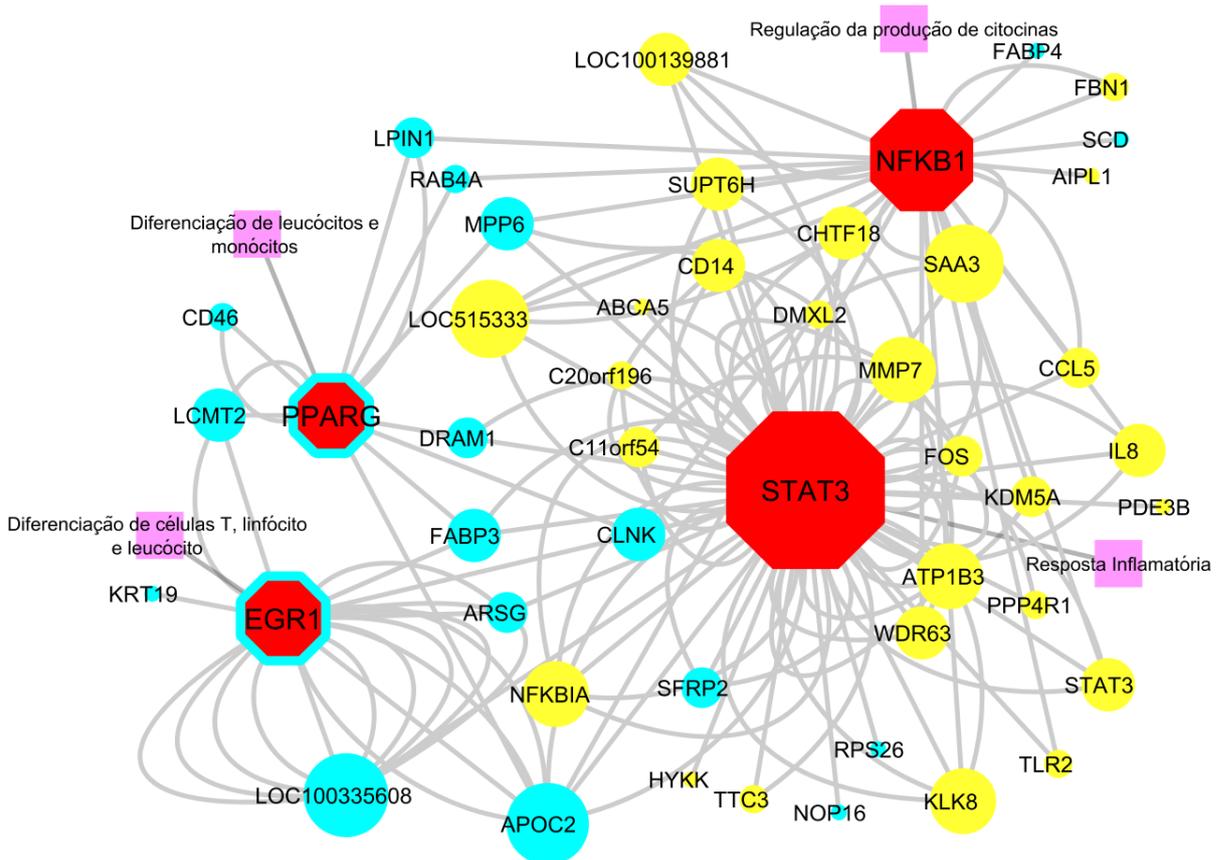


Figura 5. Rede gene-fator de transcrição (FTs), a partir dos FTs chave. Nódulos octogonais de cor vermelha representam os FTs chave. Nódulos circulares representam genes diferencialmente expressos, sendo os amarelos *up-regulated* e os azuis *down-regulated*. O tamanho do nó corresponde à análise de rede do Cytoscape, em que nós com tamanhos maiores apresentam maior número de sítios de ligação. Nódulos vermelhos com bordas azuis, FTs que apresentaram ligações somente a genes *down-regulated*. Nódulos quadrados rosa representam os processos biológicos relacionados com os FTs.

O gene *LOC515333* codifica a proteína 4 de resistência a múltiplos fármacos em bovinos. Em humanos, a proteína codificada por este gene (*ABCC4*) é um membro da superfamília de transportadores cassete de ligação a ATP (ABC). Essas proteínas transportam várias moléculas através de membranas extracelulares e intracelulares (SCHALETZKI et al., 2017). A proteína codificada por este gene é membro da subfamília MRP que está envolvida na resistência a múltiplas drogas. Ven et al. (2009) relataram que a proteína 4 de resistência a múltiplos fármacos (MRP4 e *ABCC4*) é necessária para a migração de células dendríticas (DCs) em humanos. As DCs são as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais potentes e são cruciais para o início de uma resposta imune efetiva via ativação de células T específicas para antígenos (SCHUURHUIS et al., 2006). Copsel et al. (2011) demonstraram que um polimorfismo *ABCC4* regula os níveis celulares de

cAMP e controla a proliferação e diferenciação celular de leucemia humana, indicando seu papel nos processos celulares. Neste estudo, o gene *LOC515333* que corresponde ao *ABCC4* em humanos, demonstrou ter sítios de ligação com dois FT-chave: STAT3 e NFkB1 que já foram relacionados com a resposta inflamatória (SHIN et al., 2015; LUTZOW et al., 2008), sugerindo que este gene pode participar da resposta inflamatória causada por infecção por *S. agalactiae* em bovinos.

O gene Amilóide Sérico A3 (*SAA3*) pertence ao grupo *up-regulated* e foi um dos genes mais enriquecidos na rede, de acordo com número de conexões para os principais FTs. Molenaar et al. (2009) mostraram que o gene *SAA3* é altamente expresso durante a mastite bovina. Verificou-se também, que a expressão de *SAA3* é aumentada quando comparados quartos infectados e não infectados, já que outros estudos indicam que sua expressão é mínima ou não detectável em quartos saudáveis (ECKERSALL et al., 2001, 2006). Estas evidências corroboram como o nosso achado, pois o gene *SAA3* foi um dos mais enriquecidos na rede gene-FT. Pertencente ao mesmo grupo *up-regulated*, o Inibidor Alfa NFkB (*NFKBIA*) é um membro da família de genes codificante de proteínas que interagem com dímeros REL para inibir os complexos NF-kappa-B/REL, que estão envolvidos nas respostas inflamatórias. De acordo com nossos resultados a regulação positiva deste gene pode estar envolvida com os sítios de ligação com os FTs STAT3 e NF-kappa-B. O *NFKBIA* é um gene regulador essencial da resposta imune inata, Lutzow et al. (2008) relataram que o *NFKBIA* foi ativado na mastite induzida por *S. uberis*, assim como Moyes et al. (2009) observaram o mesmo comportamento quando a infecção foi causada por *S. aureus*. Esses achados suportam os nossos resultados, uma vez que, esse gene foi super-representado na rede gene-FT.

O quarto gene mais enriquecido na rede foi o *CD14*, que também faz parte do grupo *up-regulated* e juntamente com o *TLR4*, reconhece a lipoproteína A que é um componente do lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas. Fonseca et al. (2015) observaram aumento de expressão de *TLR2*, *TLR4* e *CD14* em amostras de leite após infecção experimental *in vivo* por *S. agalactiae*, assim como Weller et al. (no prelo) relataram que o gene *CD14* foi altamente regulado três horas após a inoculação de *S. agalactiae* em úberes extracorpóreos bovinos.

Uma vez que foram selecionados FT-chave associados a resposta inflamatória, esperava-se um maior enriquecimento dos genes *up-regulated* na rede

gene-FT, porém, dois genes *down-regulated* ficaram em destaque (*APOC2* e *LOC100335608*). O gene *LOC100335608* corresponde ao gene *Rabphilin 3A Like* (*RPH3AL*) em *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*. Em humanos, a proteína codificada por este gene (rabphilin 3A) desempenha um papel regulador direto na exocitose dependente de íon de cálcio nas células endócrinas e exócrinas e desempenha um papel fundamental na secreção de insulina pelas células pancreáticas (MATSUNAGA et al., 2017). Além disso, o gene *RPH3AL* é descrito como supressor de tumor em humanos (PUTCHA et al., 2015). Em bovinos, o gene *LOC100335608* codifica para a proteína rabilina tipo 3A e pode estar associado a ácidos graxos em leite de bovinos Holandeses (LI et al., 2014). Em trabalhos anteriores do nosso grupo, a análise de RNA-Seq da glândula mamária extracorpórea bovina, encontrou vários genes envolvidos com o metabolismo lipídico como o *APOC2*, *FABP3* e *FABP4* todos *down-regulated* (WELLER et al., no prelo). Em adição, Swanson et al. (2009) estudando perfis de regulação de genes no tecido mamário após a infecção por *S. uberis*, também observaram a regulação negativa de genes relacionados com o metabolismo lipídico como *LPIN1*, *FABP3* e *APOC2*. Neste estudo, os genes *APOC2* e *LOC100335608* foram enriquecido na rede gene-FT com ligações com os FT-chave *PPARG* e *EGR1*. Mesmo estando associados a processos biológicos relacionados à resposta inflamatória, os FT *PPARG* e *EGR1* também apresentaram relação com processos associados ao metabolismo de lipídeos como resposta celular a lipídeos (*EGR1*) e regulação negativa do armazenamento de lipídios (*PPARG*), justificando e corroborando o enriquecimento de genes *down-regulated* identificados previamente por Weller et al., (no prelo).

Entre os FTs-chave, o *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (*STAT3*) foi o mais representativo. Shin et al. (2015) analisaram perfis transcricionais de células bovinas infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e observaram diferenças no padrão de expressão entre os genes alvos do FT *STAT3*, sugerindo que eles podem ser utilizados como biomarcadores para infecção por *Mycobacterium*. Neste estudo, todos os genes enriquecidos citados anteriormente, tiveram sítios de ligação com este FT e estão relacionados com processos biológicos de resposta inflamatória e metabolismo de lipídeos.

4.3 ANÁLISE DE REDE GENE-miRNA

Foi estabelecida uma rede gene-miRNAs (Figura 6) com o objetivo de identificar quais eram os genes que possuíam sítios de ligação com possíveis miRNAs identificados. Para a construção, buscou-se os miRNAs diferencialmente expressos (*up* e *down-regulated*) no arquivo de saída .xlsx das análises do RNA-Seq (SBARDELLA et al., 2019; WELLER et al., no prelo). Foram identificados 28 miRNAs (14 miRNAs *up-regulated* e 14 *down-regulated*) candidatos (Tabela 4). Com base na literatura sobre vias de resposta imune/ inflamatória, foi possível selecionar os principais miRNAs (bta-miR-193a, bta-miR-363, bta-miR-148b, bta-miR-205 e bta-let-7e).

Tabela 4. Lista miRNAs *up* e *down-regulated* no tecido alveolar mamário 3 h pós-inoculação com *Streptococcus agalactiae* de quartos inoculados em comparação com quartos não inoculados.

miRNA	Fold change	P-value	miRNA	Fold change	P-value
bta-mir-375	3,43	1,34E-06	bta-mir-2285a	-1,21	6,00E-04
bta-mir-2324	2,29	3,23E-06	bta-mir-2444	-1,45	2,16E-04
bta-mir-363	1,87	1,59E-04	bta-mir-2401	-1,46	1,93E-04
bta-mir-2284T	1,78	2,59E-04	bta-mir-2353	-1,70	5,58E-04
bta-mir-2380	1,49	3,14E-06	bta-mir-129-1	-1,75	2,01E-04
bta-mir-95	1,45	2,57E-04	bta-mir-2285d	-1,85	4,45E-04
bta-mir-2344	1,30	3,60E-04	bta-mir-2284h	-2,62	1,66E-04
bta-mir-2363-1	1,28	3,54E-04	bta-mir-193a	-2,87	4,23E-04
bta-mir-148b	1,26	2,83E-05	bta-mir-205	-3,17	2,01E-05
bta-mir-128-2	1,25	4,79E-04	bta-mir-2446	-3,31	3,49E-04
bta-mir-2460	1,19	3,64E-04	bta-mir-2363-2	-3,37	1,57E-04
bta-mir-2284J	1,11	1,47E-04	bta-let-7e	-4,09	1,19E-04
bta-mir-2429	1,09	6,33E-04	bta-mir-2339	-4,19	3,14E-04
bta-mir-2310	1,01	2,64E-04	bta-mir-2475	-4,36	3,16E-06

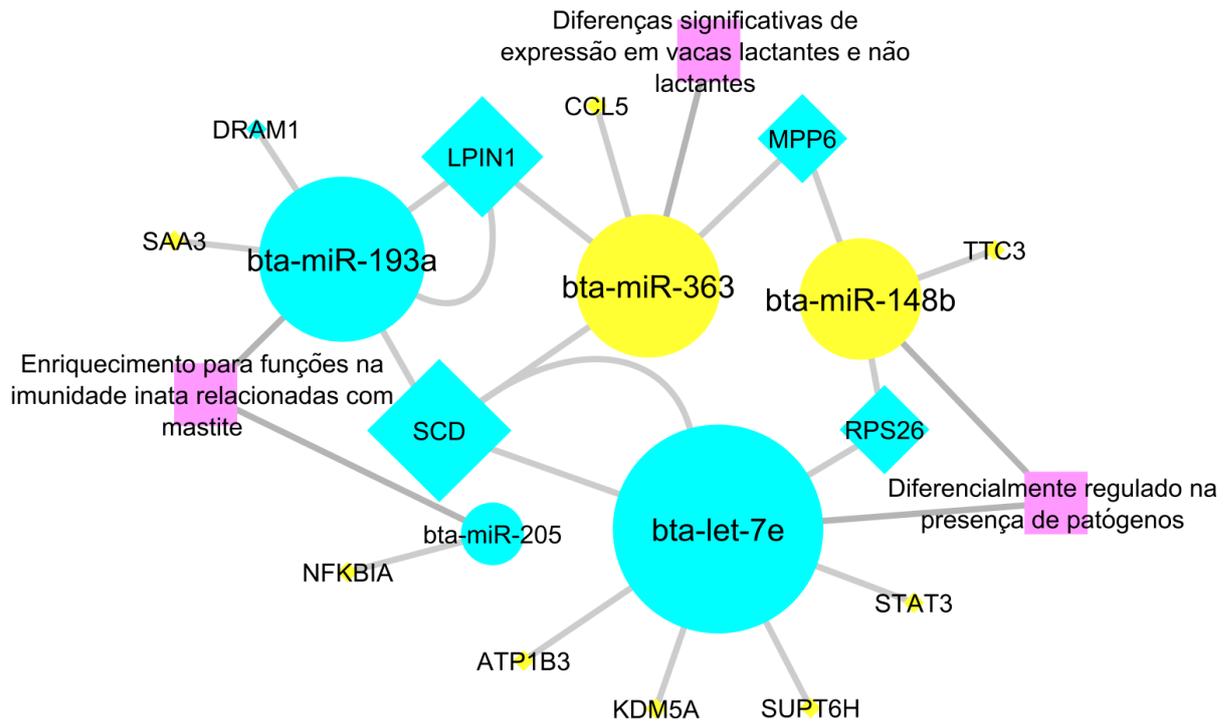


Figura 6. Rede gene-miRNA. Nós azuis circulares miRNAs *down-regulated*; nós amarelos circulares miRNAs *up-regulated*. Nós azuis em forma de diamante são genes *down-regulated*; nós amarelos em forma de diamante genes *up-regulated*. Os nós quadrados rosa representam as evidências na literatura relacionando os miRNAs a resposta inflamatória.

A rede gene-miRNA obtida revela quais genes podem ser regulados pós-transcricionalmente pelos miRNAs (Figura 6). Pode-se observar que dos 49 genes mais enriquecidos na rede gene-FT e os que ficaram em evidência na rede de processos biológicos não foram enriquecidos na rede gene-miRNAs, com exceção do *SAA3* e *CCL5*. O gene *SAA3* apresentou sítio de ligação para o miRNA *bta-miR-193a*, o qual estava *down-regulated* no tecido alveolar mamário 3 h após-inoculação com *S. agalactiae*. Neste caso, o *bta-miR-193a* não deve estar exercendo ação relevante no gene *SAA3* nesse período no tecido alveolar por ser *down-regulated* (*fold change* = -2,87).

Por outro lado, o *CCL5* apresentou sítio de ligação para o miRNA *bta-miR-363*, que estava *up-regulated*. Com isso, sua atuação na resposta inflamatória da glândula mamária é incerta, uma vez que, os miRNAs geralmente atuam inibindo a pós-transcrição gênica, mas, como descrito anteriormente, podem também atuar de forma positiva na transcrição gênica (PORTNOY et al., 2011). Os nossos resultados indicam que o gene *CCL5* foi altamente expresso no tecido alveolar

mamário infectado com *S. agalactiae* (rede gene-FT) e apresentou processos biológicos relacionados à resposta inflamatória (rede gene-processos biológicos).

De forma geral, estes resultados sugerem que aqueles genes em destaque nas redes de processos biológicos e gene-FT, e que não tiveram ligação com miRNAs *up-regulated* são prováveis genes candidatos para a característica de resistência a mastite. A rede gene-FT demonstra quais genes podem atuar no momento da infecção sendo *up* ou *down-regulated* como discutido anteriormente. Por outro lado, a rede gene-miRNA relaciona quais são os genes possivelmente regulados negativamente ou positivamente sendo, por inibição da tradução, degradação do mRNA ou ativação da transcrição por miRNAs.

Para validar nossa hipótese, a metodologia de PCR em Tempo Real poderá confirmar os resultados obtidos nas redes de gene-FT e gene-miRNA, uma vez que, esta ferramenta é utilizada para validação de resultados de expressão gênica em diversos estudos (FONSECA et al., 2015; PINTO et al., 2017.; WELLER et al., no prelo)

5 CONCLUSÃO

O presente estudo é um importante passo para o entendimento dos genes envolvidos na ocorrência de mastite em bovinos de leite infectados por *S. agalactiae*. Os resultados forneceram informações abrangentes sobre os genes associados à resposta imune inata e inflamatória no quarto mamário inoculado com *S. agalactiae*.

Na rede gene-processos biológicos, genes mais relacionados com os processos biológicos envolvidos com a resposta inflamatória ficaram em destaque como: *CD14*, *TLR2*, *CXCL8* e *CCL5*. A rede gene-FT, destacou genes (ex.: *LOC515333*, *SAA3*, *IL8* e *CD14*) mais relacionados a FT-chave para resposta inflamatória (ex.: *STAT3* e *NFKB1*). Além disso, na rede gene-miRNA, miRNAs (ex.: *bta-miR-193a* e *bta-miR-363*) ficaram em destaque, com possível papel na regulação da expressão gênica em glândulas mamárias infectadas por *S. agalactiae*.

De forma geral, a partir destas análises funcionais, foi possível identificar genes e elementos regulatórios da expressão gênica (FT e miRNA) com evidente relação nos processos inflamatórios de glândulas mamárias infectadas por *S. agalactiae* e assim, possíveis genes, FT e miRNAs candidatos para resistência a mastite em bovinos foram apresentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. ed. 4, New York: Garland Science, 2004.

ALLUWAIMI, A. M.; LEUTENEGGER, C. M.; FARVER, T. B.; ROSSITTO, P. V.; SMITH, W. L.; CULLOR, J. S. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, v. 50, p. 105-111, 2003.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. Nature, v. 431, p. 350-355, 2004.

BALDWIN, R. L.; LI, R. W.; JIA, Y.; LI, C. J. Transcriptomic Impacts of Rumen Epithelium Induced by Butyrate Infusion in Dairy Cattle in Dry Period. Gene Regulation and Systems Biology, v. 12, p. 1-11, 2018.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; CHOCKALINGAM, A. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor-alpha, beta1, and beta2. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 112, p. 309-315, 2006.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v. 116, p. 281, 2004.

BEECHER, C.; DALY, M.; CHILDS, S.; BERRY, D. P.; MAGEE, D. A.; McCARTHY, T. V.; GIBLIN, L. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. BMC Genetics, v. 11, p. 99, 2010.

BLAIS, A.; DYNLACHT, B. D. Constructing transcriptional regulatory networks. Genes Dev, v. 19, n. 13, p. 1499-1511, 2005.

BRADEN, C.; TOOZE, J. Introduction to protein structure. ed. 2, New York: Garland Publishing, 1999.

BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. Veterinary Journal, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRITO, M. A. V.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRUNO, D. R.; ROSSITTO, O. V.; BRUNO, R. G. S.; BLANCHARD, M. T.; SITT, T.; YEARGAN, B. V.; SMITH, W. L.; CULLOR, J. S.; STOTT, J. L. Differential levels of mRNA transcripts encoding immunologic mediators in mammary gland secretions from dairy cows with subclinical environmental *Streptococci* infections. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.138, p.15-24, 2010.

BUKHARI, S.; DAS, A. K.; KUMAR, N.; RAGHUWANSHI, P.; TAGGAR, R. K.; CHAKRABORTY, D.; KUMAR, D.; VOHRA, V.; GUPTA, P. Genetic polymorphism of promoter region of lactoferrin gene and its association with mastitis resistance in Jersey crossbred cattle. *Indian J Anim Res*, v. 49, p. 165-167, 2015.

BUTTERWORTH, P. J. *Lehninger: principles of biochemistry* (4th edn) D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), ISBN 0-7167-4339-6 (2004). *Cell Biochemistry and Function*, v. 23, n. 4, p. 293-294, 2005.

CAMPBELL, M. J. Myeloid differentiation continues to reveal the complexity of nuclear receptor signaling. *Cell Cycle*, v. 8, p. 675-676, 2009.

CAIRE-BRÄNDLI, I.; PAPADOPOULOS, A.; MALAGA, W.; MARAIS, D.; CANAAN, S.; THILO, L.; CHASTELLIER, C. Reversible Lipid Accumulation and Associated Division Arrest of *Mycobacterium avium* in Lipoprotein-Induced Foamy Macrophages May Resemble Key Events during Latency and Reactivation of Tuberculosis. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 2, p. 476-490, 2014.

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

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, p. 642, 2009.

CASAS, E.; CAI, G.; KUEHN, L. A.; REGISTER, K. B.; MCDANELD, T. G.; NEILL, J. D. Association of MicroRNAs with Antibody Response to *Mycoplasma bovis* in Beef Cattle. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. e0161651, 2016.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <<http://www.cnabrazil.org.br/>>. Acesso em: 03 setembro 2018.

COPSEL, S.; GARCIA, C.; DIEZ, F.; VERMEULEM, M.; BALDI, A.; BIANCIOTTI, L. G.; RUSSEL, F. G. M.; SHAYO, C.; DAVIO, C. "Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation," *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 6979-6988, 2011.

COSTA, G. M.; PAIVA, L. V.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, U. P.; SILVA, N. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Research in veterinary science*, v. 93, n. 2, p. 733-735, 2012.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

DA SILVA CORREIA, J.; SOLDAU, K.; CHRISTEN, U.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane

receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 24, p. 21129-21135, 2001.

DANIEL, C.W.; ROBINSON, S.; SILBERSTEIN, G. B. The transforming growth factors beta in development and functional differentiation of the mouse mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 501, p. 61-70, 2001.

DAETWYLER, H. D.; SCHENKEL, F. S.; SARGOLZAEI, M.; ROBINSON, J. A. B. A Genome Scan to Detect Quantitative Trait Loci for Economically Important Traits in Holstein Cattle Using Two Methods and a Dense Single Nucleotide Polymorphism Map. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 3225-3236, 2008.

DETILLEUX, J. C.; KOEHLER, K. J.; FREEMAN, A. E.; KEHRLI, M. E.; KELLEY, D. H. Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: genetic variation. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 9, p. 2640-2650, 1994.

DETILLEUX, J. C. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 88, n. 3-4, p. 103-110, 2002.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 856, p. 1-11, 1998.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, p. 1102-1113, 2006.

DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.; GREEN, R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, v. 336, p. 237-240, 2012.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S.; WEBER, A.; MCDONALD, T.; NOLAN, A. M.; FITZPATRICK, J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *The Veterinary Record*, v. 148, n. 2, p. 35-41, 2001.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; NOLAN, A. M.; KNIGHT, C. H.; MCCOMB, C.; WATERSTON, M. M.; HOGARTH, C. J.; SCOTT, E. M.; FITZPATRICK, J. L. Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *S. aureus* Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 5, p. 1488-1501, 2006.

ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDÃO, P. E.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 34-38, 2012.

FARRELL, D.; SHAUGHNESSY, R. G.; BRITTON, L.; MACHUGH, D. E.; MARKEY, B.; GORDON, S. V. The Identification of Circulating MiRNA in Bovine Serum and Their Potential as Novel Biomarkers of Early *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* Infection. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0134310, 2015.

FESSLER, M. B. The challenges and promise of targeting the Liver X Receptors for treatment of inflammatory disease. *Pharmacology e Therapeutics*, 2017.

FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, M. F.; WELLER, M. M.; SOUSA, K. R.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S. E. 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. Gene expression profile in Gyr and crossbreed dairy cows with mastitis. 2014. 63 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

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 *S. agalactiae*. *Livestock Science*, v. 180, p. 47-57, 2015.

FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; ZHANG, Y.; COLLIS, E.; NAGARAJ, S. H.; JONSSON, N. N.; PRAYAGA, K. C.; BARRIS, W.; HAWKEN, R. J. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 31, p. 13642-13647, 2010.

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 *S. aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research*, v. 44, n. 1, p. 40, 2013.

GINJALA, V.; PAKKANEN, R. Determination of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunoassay*, v.19, p.195-207, 1998.

GOVIGNON-GION, A.; DASSONNEVILLE, R.; BALOCHE, G.; DUCROCQ, V. Genetic evaluation of mastitis in dairy cattle in France. *Interbull Bulletin*, v. 46, p. 28-31, 2012.

GREEN, D. S.; YOUNG, H. A.; VALENCIA, J. C. Current prospects of type II interferon gamma signaling and autoimmunity. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 292, p. 13925-13933, 2017.

GRIESBECK-ZILCH, B.; MEYER, H. H.; KÜHN, C. H.; SCHWERIN, M.; WELLNITZ, O. *S. aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. v. 91, n. 6, p. 2215-2224, 2008.

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

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*, v. 32, p. 659-702, 2014.

GRIMSON, A.; FARH, K. K.; JOHNSTON, W. K.; GARRETT-ENGELE, P.; LIM, L. P.; BARTEL, D. P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, v. 27, p. 91, 2007.

GRÖNLUND, U.; JOHANNISSON, A.; WALLER, K. P. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *S. aureus* induced bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, v. 80, n. 2, p. 147-154, 2006.

GUSTAFSON D.; TYRYSHKIN, K.; RENWICK, N. microRNA-guided diagnostics in clinical samples. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 30, p. 563-575, 2016.

HERINGSATD, B.; KLEMETSDAL, G.; RUANE, J. Clinical mastitis in Norwegian cattle: frequency, variance components, and genetic correlation with protein yield. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 6, p. 1325-1330, 1999.

HEYEN, D. W.; WELLER, J. I.; RON, M.; BAND, M.; BEEVER, J. E.; FELDMESSER, E.; DA, Y.; WIGGANS, G. R.; VANRADEN, P. M.; LEWIN, H. A. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics*, v. 1, n. 3, p. 165-175, 1999.

HE, X.; LIU, W.; SHI, M.; YANG, Z.; ZHANG, X.; GONG, P. Docosahexaenoic acid attenuates LPS-stimulated inflammatory response by regulating the PPAR γ /NF- κ B pathways in primary bovine mammary epithelial cells. *Research in veterinary science*, v. 112, p. 7-12, 2017.

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

HUI, X.; LI, H.; ZHOU, Z.; LAM, K. S.; XIAO, Y.; WU, D.; DING, K.; WANG, Y.; VANHOUTTE, P. M.; XU, A. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 14, p. 10273-10280, 2010.

HUNT, C.R.; RO, J. H.; DOBSON, D. E.; MIN, H. Y.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 83, n. 11, p. 3786-3790, 1986.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; IBEAGHA, A. E.; MESSIER, S.; ZHAO, X. Proteomics, genomics, and pathway analyses of *Escherichia coli* and *S. aureus* infected milk

they reveal molecular pathways and networks involved in mastitis. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 9, p. 4604-4619, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2017. Rio de Janeiro, v. 7, p. 1-108, 2017.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, n. 327, p. 291-295, 2010.

JANOWSKI, B. A.; YOUNGER, S. T.; HARDY, D. B.; RAM, R.; HUFFMAN, K. E.; COREY, D. R. Activating gene expression in mammalian cells with duplex RNAs directed to the promoter. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 3, p. 166-173, 2007.

JIN, W.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LIANG, G.; BEAUDOIN, F.; ZHAO, X. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *S. aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 181, 2014.

KANNAIYAN, R.; HAY, H. S.; RAJENDRAN, P.; LI, F.; SHANMUGAM, M. K.; VALI, S.; ABBASI, T.; KAPOOR, S.; SHARMA, A.; KUMAR, A. P.; CHNG, W. J.; SETHI, G. Celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization by reducing the regulation of the regulated *NF- κ B* and *STAT3* gene products in multiple myeloma cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 5, p. 1506-1521, 2011.

KEEFE, G. P. *S. agalactiae* mastitis: A review. *Canadian Veterinary Journal*, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.

KHAN, A.; FORNES, O.; STIGLIANI, A.; GHEORGHE, M.; CASTRO-MONDRAGON, J. A.; VAN DER LEE, R.; BESSY, A.; CHÈNEBY, J.; KULKARNI, S. R.; TAN, G.; BARANASIC, D.; ARENILLAS, D. J.; SANDELIN, A.; VANDEPOELE, K.; LENHARD, B.; BALLESTER, B.; WASSERMAN, W. W.; PARCY, F.; MATHELIER, A. JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Research*, v. 46, p. 260-266, 2018.

KLUYTMANS, J. A. J. W. Methicillin-resistant *S. aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 1, p. 11-15, 2010.

KOSCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; JARCZAK, J.; MAJEWSKA, A.; RZEWUSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. Transcriptome profiling of *Staphylococci*-infected cow mammary gland parenchyma. *BMC Veterinary Research*, v. 13, n. 1, p. 161, 2017.

LAWLESS, N.; REINHARDT, T. A.; BRYAN, K.; BAKER, M.; PESCH, B.; ZIMMERMAN, D.; ZUELKE, K.; SONSTEGARD, T.; O'FARRELLY, C.; LIPPOLIS, J. D.; LYNN, D. J. MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 4, n. 6, p. 957-971, 2014.

LEE, D. WADA, K.; TANIGUCHI, Y.; AL-SHAREEF, H.; MASUDA, T.; USAMI, Y.; AIKAWA, T.; OKURA, M.; KAMISAKI, Y.; KOGO, M. Expression of fatty acid binding

protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, v.31, n. 3, p. 1116-1120, 2014.

LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, v. 424, p. 147-151, 2003.

LEWIS, B. P.; SHIH, I.; JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, v. 115, p. 787, 2003.

LI, C.; SUN, D.; ZHANG, S.; WANG, S.; WU, X.; ZHANG, Q.; LIU, L.; LI, Y.; QIAO, L. Genome Wide Association Study Identifies 20 Novel Promising Genes Associated with Milk Fatty Acid Traits in Chinese Holstein. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e96186, 2014.

LI, C. M.; CLARK, M. E.; CHIMENTO, M. F.; CURCIO, C. A. Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression. *Investigative Ophthalmology e Visual Science*, n. 47, p. 3119-3128, 2006.

LI, L. C.; OKINO, S. T.; ZHAO, H.; POOKOT, D.; PLACE, R. F.; URAKAMI, S.; ENOKIDA, H.; DAHIYA, R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 46, p. 17337-17342, 2006.

LI, Z.; LIU, H.; JIN, X.; LO, L.; LIU, J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 731, 2012.

LIANG, G.; MALMUTHUGE, N.; GUAN, Y.; REN, Y.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. Altered microRNA expression and pre-mRNA splicing events reveal new mechanisms associated with early stage *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Scientific Reports*, v. 6, p. 24964, 2016.

LIM, J.K.; BURNS, J. M.; LU, W.; DEVICO, A. L. Multiple pathways of amino terminal processing produce two truncated variants of RANTES/CCL5. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 78, n. 2, p. 442, 2005.

LU, L. F.; LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, v. 127, p. 291, 2009.

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

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, v.21, ed.16, p.3448-3449, 2005.

MAKOWSKI, L.; BOORD, J. B.; MAEDA, K.; BABAIEV, V. R.; UYSAL, K. T.; MORGAN, M. A.; PARKER, R. A.; SUTTLES, J.; FAZIO, S.; HOTAMISLIGIL, G. S.;

LINTON, M. F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine*, v. 7, n. 6, p. 699-705, 2001.

MALVISI, M.; PALAZZO, F.; MORANDI, N.; LAZZARI, B.; WILLIAMS, J. L.; PAGNACCO, G.; MINOZZI, G. Responses of Bovine Innate Immunity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection Revealed by Changes in Gene Expression and Levels of MicroRNA. *PLoS ONE*, v. 11, n. 10, p. e0164461, 2016.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Current Molecular Medicine*, v. 10, n. 4, p. 369-373, 2010.

MARK, T. Applied genetic evaluations for production and functional traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 8, p. 2641-2652, 2004.

MATSUNAGA, K.; TAOKA, M.; ISOBE, T.; IZUMI, T. Rab2a and Rab27a cooperatively regulate the transition from granule maturation to exocytosis through the dual effector Noc2. *Journal of Cell Science*, n. 130, p. 541-550, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do Agronegócio. Brasília, 2017.

MOLENAAR, A. J.; HARRIS, D. P.; RAJAN, G. H.; PEARSON, M. L.; CALLAGHAN, M. R.; SOMMER, L.; FARR, V. C.; ODEN, K. E.; MILES, M. C.; PETROVA, R. S.; GOOD, L. L.; SINGH, K.; MCLAREN, R. D.; PROSSER, C. G.; KIM, K. S.; WIELICZKO, R. J.; DINES, M. H.; JOHANNESSEN, K. M.; GRIGOR, M. R.; DAVIS, S. R.; STELWAGEN, K. The acute-phase protein serum amyloid A3 is expressed in the bovine mammary gland and plays a role in host defence. *Biomarkers*, v.14, n. 1, p. 26-37, 2009.

MOREIRA-FILHO, C. A.; BANDO, S. Y.; BERTONHA, F. B.; SILVA, F. N.; COSTA, L. F. Methods for gene coexpression network visualization and analysis. In: Passos GA. *Transcriptomics in health and disease*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 79, 2014.

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 pathways analysis of bovine mammary tissue challenged with *S. uberis* reveal induction of cell proliferation and inhibition of PPAR γ signaling as potential mechanism for the negative relationship between immune response and lipid metabolism. *BMC Genomics*, v. 10, p. 542, 2009.

MRODE, R. A.; SWANSON, G. J. T.; Genetic and statistical properties of somatic cell counts and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Animal Breeding Abstracts*, v. 64, p. 847-857, 1996.

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.

O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 475-527, 2013.

O'NEILL, L.A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 3-9, 2006

OVIEDO-BOYSO, 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, n. 4, p. 399-409, 2007.

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

PEREIRA, M. F. V. As atividades modernas da genética bovina no Brasil: Funções e lógicas da especialização em Uberaba (MG). *Boletim Goiano de Geografia*, v. 32, n. 2, p. 13-32, 2012.

PHILLIPS, T.; HOOPES, L. Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education*, v.1, n. 1, p.119, 2008.

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

PISONI, G.; MORONI, P.; GENINI, S.; STELLA, A.; BOETTCHER, P.J.; CREMONESI, P.; SCACCABAROZZI, L.; GIUFFRA, E.; CASTIOGLIONI, B. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.135, p.208-217, 2010.

PORTNOY, V.; HUANG, V.; PLACE, R. F.; LI, L. C. Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 2, p. 748, 2011.

PUTCHA, B. D.; JIA, X.; KATKOORI, V. R.; SALIH, C.; SHANMUGAM, C.; JADHAV, T.; BOVELL, L. C.; BEHRING, M. P.; CALLENS, T.; MESSIAEN, L.; BAE, S.; GRIZZLE, W. E.; SINGH, K. P.; MANNE, U. Clinical Implications of Rabphilin-3A-Like Gene Alterations in Breast Cancer *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0129216, 2015.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

RALSTON, A. Do transcription factors actually bind DNA? DNA footprinting and gel shift assays. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 121, 2008.

RAMAYO-CALDAS, Y. BALLESTER, M.; FORTES, M. R.; ESTEVE-CODINA, A.; CASTELLÓ, A.; NOGUERA, J. L.; FERNÁNDEZ, A. I.; PÉREZ-ENCISO, M.; REVERTER, A.; FOLCH, J. M. From SNP co-association to RNA co-expression: Novel insights into gene networks for intramuscular fatty acid composition in porcine. *BMC Genomics*, v. 15, p. 232, 2014.

- RIECHMANN, J. L. HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O. J.; SAMAHA, R. R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J. Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B. K.; YU, G. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science*, v.290, n.5499, p.2105-2110, 2000.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. Doenças de ruminantes e equinos. *Varela: São Paulo*, v.2, p.294-295, 2001.
- ROLPH, M. S.; YOUNG, T. R.; SHUM, B. O.; GORGUN, C. Z.; SCHMITZ-PEIFFER, C.; RAMSHAW, I. A.; HOTAMISLIGIL, G. S.; MACKAY, C. R. Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2. *The Journal of Immunology*. v. 177, n. 11, p. 7794-7801, 2006.
- RUEGG, P. L. Mastitis Control. *Milking and Milk Quality*, n. 405, 2001. 8 p.
- RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, v. 34, n. 5, p. 671-688, 2003.
- RUSHTON, P. J.; BOKOWIEC, M. T.; LAUDEMAN, T. W.; BRANNOCK, J. F.; CHEN, X.; TIMKO, M. P. TOBFAC: the database of tobacco transcription factors. *BMC Bioinformatics*, v.9, p.53-60, 2008.
- SANDELIN, A.; ALKEMA, W.; ENGSTRÖM, P.; WASSERMAN, W. W.; LENHARD, B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 91-94, 2004.
- SBARDELLA, A. P.; WELLER, M. M. D. C. A.; FONSECA, I.; STAFUZZA, N. B.; BERNARDES, P. A.; E SILVA, F. F.; DA SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; MUNARI, D. P. Ribonucleic acid sequencing differential gene expression analysis of isolated perfused bovine udders experimentally inoculated with *S. agalactiae*. *Journal of Dairy Science*, 2019.
- SCHALETZKI, Y.; KROMREY, M. L.; BRÖDERDORF, S.; HAMMER, E.; GRUBE, M.; HAGEN, P.; SUCIC, S.; FREISSMUTH, M.; VÖLKER, U.; GREINACHER, A.; RAUCH, B. H.; KROEMER, H. K.; JEDLITSCHKY, G. Several adaptor proteins promote intracellular localisation of the transporter MRP4/ABCC4 in platelets and haematopoietic cells. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 117, n. 01, p. 105-115, 2017.
- SEYEDNASROLLAH, F.; LAIHO, A.; ELO, L. L. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Briefings in Bioinformatics*, v. 16, n. 1, p. 59-70, 2015.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, v.13, n.11, p.2498-2504, 2003.
- SHIN, M. K.; PARK, H. T.; SHIN, S. W.; JUNG, M.; IM, Y. B.; PARK, H. E.; CHO, Y. I.; YOO, H. S. Whole-Blood Gene-Expression Profiles of Cows Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Reveal Changes in Immune

Response and Lipid Metabolism. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, n. 2, p. 255-267, 2015.

SHUM, B. O.; MACKAY, C. R.; GORGUN, C. Z.; FROST, M. J.; KUMAR, R. K.; HOTAMISLIGIL, G. S.; ROLPH, M. S. The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. The Journal of Clinical Investigation, v. 116, n. 8, p. 2183-2192, 2006.

SCHUURHUIS, D. H.; FU, N.; OSSENDORP, F.; MELIEF, C. J. Insights into dendritic cells. International Archives of Allergy and Immunology, v. 140, p. 53-72, 2006.

SHWEASH, M. ADRIENNE, MCGACHY H.; SCHROEDER, J.; NEAMATALLAH, T.; BRYANT, C. E.; MILLINGTON, O.; MOTTRAM, J. C.; ALEXANDER, J.; PLEVIN, R. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. Molecular Immunology, v. 48, n. 15-16, p.1800-1808, 2011.

SIMMONS, D. The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. Nature Education, v. 1, n. 1, p. 70, 2008.

SMITH, A.J. SANDERS, M. A.; JUHLMANN, B. E.; HERTZEL, A. V.; BERNLOHR, D. A. Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. Journal Biological Chemistry, v. 283, n. 48, p. 33536-33543, 2008.

SOKOLOVA, O.; NAUMANN, M. *NF- κ B* Signaling in Gastric Cancer. Toxins, v.9, n. 4, p.119, 2017.

SPIEGELMAN, B.M.; FRANK, M.; GREEN, H. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. Journal Biological Chemistry, v. 258, n. 16, p. 10083-10089, 1983.

STAEDEL, C.; DARFEUILLE, F. MicroRNAs and bacterial infection. Cellular Microbiology, v.15, n.9, p. 1496-1507, 2013.

STILLIE, R.; FAROOQ, S. M.; GORDON, J. R.; STADNYK, A. W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. Journal of Leukocyte Biology, v. 86, p. 529-543, 2009.

SUGIMOTO, M.; FUJIKAWA, A.; WOMACK, J. E.; SUGIMOTO, Y. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 103, n. 17, p. 6454-6459, 2006.

SUN, J.; ASWATH, K.; SCHROEDER, S. G.; LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; SONSTEGARD, T. S. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *S. aureus* infection. BMC Genomics, v. 16, n. 1, p. 806, 2015.

- TAXIS, T. M.; BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; CASAS, E. Circulating microRNAs in serum from cattle challenged with bovine viral diarrhea virus. *Frontiers in Genetics*, v. 8, p. 91, 2017.
- THORGERSEN, E. B.; HELLERUD, B. C.; NIELSEN, E. W.; BARRATT-DUE, A.; FURE, H.; LINDSTAD, J. K.; PHARO, A.; FOSSE, E.; TONNESSEN, T. I.; JOHANSEN, H. T.; CASTELLHEIM, A.; MOLLNES, T. E. CD14 inhibition efficiently attenuates early inflammatory and hemostatic responses in *Escherichia coli* sepsis in pigs. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 24, n. 3, p. 712-722, 2010.
- TRIGO, G.; DINIS, M.; FRANÇA, A.; ANDRADE, E.B.; COSTA, R.M.G.; FERREIRA, P.; TAVARES, D. Leukocyte populations and cytokine expression in the mammary gland in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58 n. 7, p. 951-958, 2009.
- TRUSCA, V.G.; FLOREA, I. C.; KARDASSIS, D.; GAFENCU, A. V. STAT1 Interacts with RXR α to Upregulate ApoCII Gene Expression in Macrophages. *PLoS One*, v. 7, e40463, 2012.
- TSUKAMOTO, H.; FUKUDOME, K.; TAKAO, S.; TSUNEYOSHI, N.; KIMOTO, M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *International Immunology*, v. 22, n. 4, p. 271-280, 2010.
- UDVARDI, M. K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J.; ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J. Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J. M.I.; CHUENG, F.; TOWN, C. D. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. *Plant Physiology*, v.144, n.2, p.538-549, 2007.
- URIOSTE, J. I.; FRANZÉN, J.; WINDIG, J. J.; STRANDBERG, E. Genetic variability of alternative somatic cell count traits and their relationship with clinical and subclinical mastitis. *Interbull Bulletin*, v. 44, p. 26-29, 2011.
- VAQUERIZAS, J. M.; KUMMERFELD, S. K.; TEICHMANN, S. A.; LUSCOMBE, N. M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, p. 252-263, 2009.
- VEN, R. V.; SCHEFFER, G. L.; REURS, A. W.; LINDENBERG, J. J.; OERLEMANS, R.; JANSEN, G.; GILLET, J. P.; GLASGOW, J. N.; PEREBOEV, A.; CURIEL, D. T.; SCHEPER, R. J.; GRUIJL, T. D. "A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration," *Blood*, v. 112, n. 6, p. 2353-2359, 2009.
- VERARDO, L.L.; SILVA, F. F.; LOPES, M. S.; MADSEN, O.; BASTIAANSEN, J. W. M.; KNOL, E. F.; KELLY, M.; VARONA, L.; LOPES, P. S. GUIMARÃES, S. E. F. Revealing new candidate genes for reproductive traits in pigs: combining Bayesian GWAS and functional pathways. *Genetics Selection Evolution*, v. 48, n. 1, p. 1, 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v.10, n. 1, p.57-63, 2009.

WATTS, G. F.; OOI, E. M.; CHAN, D. C. Demystifying the management of hypertriglyceridaemia. *Nature Reviews Cardiology*, v. 10, n. 11, p. 648-661, 2013.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 41-66, 1988.

WELLER, M. M. D. C. A.; FONSECA, I.; SBARDELLA, A. P.; PINTO, I. S. B.; VICCINI, L. F.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; CARVALHO, W. A.; GUIMARÃES, A. S.; BRITO, M. A. V. P.; MUNARI, D. P.; SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M.F. Transcriptome analyses in extracorporeal udders of cows in response to *S. agalactiae*, no prelo.

WHELEHAN, C.J., MEADE, K.G., ECKERSALL, PD., YOUNG, F.J., O'FARRELLY, C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 140, p. 181-189, 2011.

YOSHIDA, H.; IMAIZUMI, T.; MATSUMIYA, T.; SEYA, K.; KAWAGUCHI, S.; TANAKA, H. Gnetin C suppresses double-stranded RNA-induced CC motif chemokine ligand 2 (CCL2) and CCL5 production by inhibiting Toll-like receptor 3 signaling pathway. *Biomedical Research*, v. 39, n. 5, p. 231-240, 2018.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011.

ZANNIS, V. I.; COLE, F. S.; COLE, F. S.; JACKSON, C. L.; KURNIT, D. M.; KARATHANASIS, S. K. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry*, v. 24, n. 16, p. 4450-4455, 1985.