

ISABELA FONSECA

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
RESISTÊNCIA À MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

ISABELA FONSECA

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
RESISTÊNCIA À MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2008.

Pesq. Marta F. M. Guimarães
(Co-orientadora)

Prof. Paulo Sávio Lopes
(Co-orientador)

Prof. José Domingos Guimarães

Pesq. Jane de Oliveira Peixoto

Prof^ª. Simone Eliza Facioni Guimarães
(Orientadora)

Aos meus pais, Maurício e Conceição.

Dedico.

“Um homem precisa viajar.

Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou tv.

Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu.

Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor.

Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto.

Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto.

Um homem precisa viajar para lugares que não conhece

para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o

imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser;

que nos faz professores e doutores do que não vimos,

quando deveríamos ser alunos,

e simplesmente ir ver”

Amir Klink

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Zootecnia e do Conselho de Pós-Graduação, pela oportunidade de realização do curso, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Gado de Leite, pela parceria na realização deste trabalho.

À professora Simone, pela orientação, pela confiança, pelas oportunidades, pelo apoio e pelo convívio.

Aos meus co-orientadores: professor Paulo Sávio, pelos ensinamentos, conselhos e por estar sempre pronto a ajudar; e à Marta, pela qual tenho grande admiração, pelos conselhos, sugestões e pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao JD, pela valiosa colaboração durante as coletas de amostras de leite e pelas sugestões; e à Jane, até pouco tempo nossa companheira de laboratório, pelas grandiosas contribuições.

Aos meus colegas de laboratório, pelo rico convívio, pelo companheirismo, pelas sugestões e pela amizade, em especial à Priscila, que me ajudou em todos os momentos que precisei.

Às amigas Ana Marcelina, Hudsara, Ana Flávia, Sandra, Eliana e Cristiana, por serem amigas para todas as horas.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida, pela presença, incentivo, carinho e apoio incondicional. Mesmo estando a quilômetros de distância, sempre estiveram pertinho de mim.

À Gabriela, à Rafaela, ao Matheus, ao Dalmon e ao Ricardo, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e estiveram comigo em todos os momentos, sempre me dando força e coragem.

Agradeço também a Deus, fonte de tudo, sempre presente em minha vida, iluminando-me e dando-me força a todo instante!

BIOGRAFIA

Isabela Fonseca, filha de Antônio Maurício da Fonseca e Maria da Conceição Fonseca, nasceu em São Paulo – SP, em 22 de outubro de 1982. Em julho de 1995 mudou-se para Santa Rita de Ibitipoca (MG), cidade natal de seus pais, permanecendo nesta cidade até janeiro de 1998, quando se mudou com sua família para Juiz de Fora (MG) onde cursou todo o ensino médio.

Em março de 2001, ingressou no curso de Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, concluindo o curso superior nesta Universidade em maio de 2006.

Neste mesmo mês e ano iniciou o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação para obtenção do título *Magister Scientiae* em Zootecnia dia 25 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Mastite bovina e seu impacto sobre a pecuária	5
2.2 Genética da resistência à mastite e genes candidatos	8
2.3 Genes selecionados para análise	11
2.4 PCR quantitativo em tempo real	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais experimentais e coleta das amostras	16
3.2 Extração do RNA total	17
3.3 Síntese do cDNA	18
3.4 Confeção dos sistemas de RT-PCR em tempo real.....	18
3.5 Análise de dados do RT-PCR em tempo real	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

FONSECA, Isabela; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Perfil da expressão de genes relacionados à resistência à mastite em bovinos leiteiros.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Marta Fonseca Martins Guimarães e Paulo Sávio Lopes.

Na produção animal, dentre os problemas de sanidade, as doenças infecto-contagiosas são as que mais se destacam, sendo a mastite uma das principais doenças. Uma das opções mais promissora para a redução dos problemas causados pelas doenças infecto-contagiosas, além dos cuidados sanitários, é a seleção de animais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos. Como ferramenta para a seleção de animais melhores adaptados e mais produtivos pode ser utilizada a estratégia de genes candidatos, e para sua escolha é importante caracterizar a expressão gênica em animais resistentes e susceptíveis às doenças. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão de genes que podem estar relacionados com o fenótipo de resistência/susceptibilidade à mastite. Para tanto, foi investigada a expressão dos genes *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN- γ* e *TNF- α* em células presentes no leite de fêmeas bovinas com e sem mastite, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Foram avaliados seis animais da raça Holandesa Preto e Branco (PB) e seis animais da raça Gir Leiteiro, sendo três com mastite e três sem mastite dentro de cada raça. O RNA total extraído a partir de células presentes no leite de cada animal, foi usado na confecção da primeira fita de cDNA e as reações de qPCR foram realizadas usando-se o gene GAPDH como controle endógeno. Ao todo, cinco comparações foram feitas na análise de expressão de cada gene: vacas sem mastite vs vacas com mastite de ambas as raças; vacas da raça Holandesa sem mastite vs vacas da raça Holandesa com mastite; vacas da raça Gir sem mastite vs vacas da raça Gir com mastite; vacas da raça Holandesa sem mastite vs vacas da raça Gir sem mastite; vacas da raça Holandesa com mastite vs vacas da raça Gir com mastite. Dentre os animais da raça Holandesa PB, aqueles que apresentaram mastite clínica expressaram mais *IL-10* ($p < 0,001$). O gene *IL-10* também foi mais expresso ($p < 0,05$) nas vacas com mastite em

comparação às vacas sem mastite quando consideradas ambas as raças. Dentre as vacas híbridas (sem mastite), as da raça Holandesa PB tenderam a expressar em maior quantidade todos os genes considerados neste estudo, sendo a expressão dos genes *IL-2* e *IFN- γ* significativamente diferente ($p < 0,001$). Foi possível verificar diferença no perfil de expressão dos genes considerados no presente trabalho em relação ao fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite entre as duas raças estudadas. Porém, a mastite é uma doença multifatorial e afetada por muitos genes, portanto são necessários mais estudos que incluam outros genes e maior número de animais em diferentes fases de infecção, de modo que o mecanismo de resposta imune relacionado à mastite seja melhor compreendido e venha gerar estratégias mais eficientes de controle e erradicação da mastite.

ABSTRACT

FONSECA, Isabela; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008.

Gene expression profile related to mastitis resistance on dairy cattle.

Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: Marta Fonseca Martins Guimarães and Paulo Sávio Lopes.

Among health problems in livestock production, infectious contagious diseases are those that stand out most being mastitis one of the main disease conditions. One of the most promising ways to reduce problems caused by infectious contagious diseases, besides sanitary control, is the selection of resistant animals, in order to incorporate this trait within the herd. The candidate gene strategy might be used as a tool for the selection of best adapted and more productive animals, whereas for the selection of the best animals, characterization of genetic expression from susceptible and resistant cows is important. Therefore, the objective of the present study was to characterize the expression of genes that can be related with mastitis resistance/susceptibility phenotype. Thus, an investigation was made on *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN- γ* and *TNF- α* gene expression on milk cells from Dairy Gyr and Holstein black-white (BW) cows with and without clinical mastitis, throughout real-time quantitative PCR (qPCR) technique. Six animals from each breed were evaluated – three with mastitis and three without it. The total RNA was extracted from milk cells in order to synthesize the cDNA's first strand. For qPCR reactions, the GAPDH gene was used as endogenous control. Five comparisons for each gene expression analysis were made: Non-mastitis cows vs Mastitis cows from both breeds; Non-mastitis Holstein cows vs Mastitis Holstein cows; Non-mastitis Dairy Gyr cows vs Mastitis Dairy Gyr cows; Non-mastitis Holstein cows vs Non-mastitis Dairy Gyr cows; Mastitis Holstein cows vs Mastitis Dairy Gyr cows. Within Dairy Holstein BW animals, the *IL-10* gene had the highest expression in mastitis animals ($p < 0.001$), and on both breeds the *IL-10* also had a higher expression on mastitis animals ($p < 0.05$). It was also possible to identify in the healthy group a higher expression of all genes on the Holstein breed ($p > 0.5$), being the expression of the genes *IL-2* and *IFN- γ* significantly different ($p < 0.001$). It was possible to verify a difference, between the two breeds, on

the gene expression profile of mastitis resistance/susceptibility phenotype. However, mastitis is a multifactorial disease and is affected by a large number of genes, so more genes and animals under different infection stages must be used on further studies to a better understanding of the immune response mechanism and design of more efficient strategies for control and eradication of mastitis.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro. O Brasil é o sétimo maior produtor de leite do mundo, sendo responsável por cerca de 4,4% da produção mundial, produzindo em 2006 aproximadamente 25,7 bilhões de litros, além de possuir um dos maiores rebanhos mundial com cerca de 213.583 mil animais (<http://www.agricultura.gov.br/portal/>, acessado em 13/09/07). A cadeia produtiva leiteira é uma das mais importantes no país, são cerca de 1,2 milhões de produtores de leite, está presente em quase todas as regiões, gera cerca de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, usa intensivamente mão-de-obra, fixando deste modo a população rural no campo, sendo que as exportações brasileiras de produtos lácteos geraram uma receita de US\$ 168,6 milhões em 2006 (<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=9105>, acessado em 13/12/07).

Na última década, aconteceram intensas transformações na cadeia produtiva do leite o que levou a re-estruturação de todos os elos da cadeia, possibilitando maior competitividade. Isto tudo culminou em crescimento de quase 60% na produção de leite no período entre 1991 e 2005. Produtos novos e com melhor qualidade têm sido disponibilizados para o mercado consumidor, levando a um faturamento de R\$ 66,3 bilhões em 2005, o maior da indústria de alimentos do Brasil (<http://www.cileite.com.br/cileite.html>, acessado em 13/09/07).

Apesar das estatísticas mostrarem a constante evolução da cadeia produtiva do leite, ainda há vários entraves que precisam ser resolvidos para que se possa manter a sustentabilidade e a competitividade do setor. No Reino Unido, avanços no melhoramento genético ocasionaram rápido aumento na produção leiteira, equivalente a 3,7% ao ano, desde a década de 80. Cerca de 60% deste aumento na produção é atribuído ao progresso da seleção genética, e os demais 40% estão associados às melhorias nas práticas de manejo. A seleção genética direcionada para o aumento da

produção de leite contribuiu indiretamente para o incremento das enfermidades. Pesquisas apontam que os principais problemas associados à seleção para alta produção de leite são: aumento na contagem de células somáticas (CCS) e aumento associado nas taxas de descarte involuntário (<http://www.sac.ac.uk/research/animalhealthwelfare/dairy/breeding/>, acessado em 20/09/07).

Vários fatores, tais como clima, instalações, mão-de-obra, potencial zootécnico e genético, políticas públicas e sanidade fazem com que a atividade de produção de leite seja bastante onerosa e com baixa produtividade. Dentre os problemas de sanidade, as doenças infecto-contagiosas são as que mais se destacam, sendo que a mastite é a principal doença no aspecto econômico. Como prejuízo para a atividade pode-se citar a redução da produtividade e a baixa qualidade dos produtos lácteos, quando analisados os aspectos nutricionais e de contaminação por patógenos e resíduos de antibióticos, aumento dos custos com a mão-de-obra, tratamento dos animais (remédios - antibióticos e antiinflamatórios) e descarte do leite. Pesquisas indicam que as perdas econômicas mundiais causadas pela mastite podem alcançar 35 bilhões de dólares por ano, sendo que, para o Brasil ainda não existem índices confiáveis, mas acredita-se que sejam significativas (Politis et al., 1995; Giraudo et al., 1997; Pereira et al., 2001).

A mastite ou mamite caracteriza-se pela resposta de inflamação na glândula mamária causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas ou, mais freqüentemente, por microrganismos patogênicos ambientais ou contagiosos (Oviedo-Boyso et al., 2006). O leite de glândulas mamárias com mastite clínica ou de vacas tratadas com antibióticos é impróprio para o consumo humano. Além disso, o animal com mastite clínica pode ter a sua produção leiteira reduzida de 15 a 20%, e este produto apresenta concentrações menores de caseína, lactose e minerais, alta concentração de proteína total, aumento no número de células somáticas, na concentração de imunoglobulinas e de lípases além de alterações na concentração de cálcio e fósforo, não sendo permitida por lei sua utilização. Quando o animal apresenta mastite subclínica, o leite pode ser consumido e

utilizado na fabricação de derivados. Entretanto, devido às alterações na composição, podem ocorrer significativas reduções no rendimento industrial e na qualidade dos produtos lácteos, sendo os queijos os mais severamente afetados, já que a indústria processa o leite de vacas com mastite juntamente com o de animais hígidos, resultando em produtos de menor rendimento, alterações de sabor e odor e vida de prateleira mais curta (Machado et al., 1993; Gadini et al., 1997; Hortet e Seegers, 1998; Norman et al., 1999; Coulon et al., 2002).

Uma das formas que tem se mostrado mais promissora para redução dos problemas causados pelas doenças infecto-contagiosas, além dos cuidados sanitários, é a seleção de animais resistentes às doenças e a incorporação desta característica aos rebanhos, já que dificilmente serão produzidas vacinas efetivas devido a grande variedade de microrganismos causadores de mastite (Detilleux et al., 1994). Além disso, a atual tendência da conscientização do consumidor quanto à qualidade/procedência do alimento e a busca pela redução do uso da antibioticoterapia nos animais, aumenta a importância da resistência do rebanho às enfermidades.

A busca de maior produtividade dos bovinos sustenta-se, principalmente, na sanidade animal, no melhoramento genético e na alimentação adequada. A adaptação dos animais frente à diversidade de ambientes vem sendo buscada por programas de cruzamentos de raças diferentes ou de subespécies diferentes (*B. taurus* e *B. indicus*), na obtenção de um equilíbrio entre a produção e a adaptabilidade, cujos componentes são relacionados negativamente (Conceição Jr., 1997). Neste sentido, a identificação dos genes responsáveis por conferir resistência à mastite e o seu posterior emprego em programas de melhoramento genético constitui abordagem efetiva para o incremento genético da resistência a esta doença, com aumento de produtividade e competitividade da pecuária leiteira. Estudos com a finalidade de melhor compreender os processos biológicos envolvidos na determinação das respostas de resistência a doenças são fundamentais na resolução de problemas e desenvolvimento de soluções tecnológicas.

As raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na composição da pecuária brasileira, representando cerca de

80% do rebanho bovino efetivo nacional. A raça Gir Leiteiro exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, além de ser eficiente na produção de leite a baixo custo (Ferreira et al., 2007). Esta raça vem crescendo em importância no Brasil e em países da América Latina, África e Ásia, por ser amplamente utilizada nos cruzamentos, principalmente com a raça Holandesa, para a produção de animais leiteiros adaptados às condições tropicais, além de ser importante alternativa para a produção de leite como raça pura. Em venda de sêmen, a raça Gir Leiteiro ocupa o primeiro lugar com mais de 50% do sêmen comercializado para leite produzido no Brasil (Vercesi Filho et al., 2007). Já a raça Holandesa é a mais difundida entre as raças européias criadas no Brasil (Costa et al., 2007), além de ser mundialmente conhecida como a maior produtora de leite dentre as espécies bovinas.

O conhecimento gerado pelo estudo da expressão de genes candidatos pode ser utilizado na seleção de animais melhor adaptados e mais produtivos. Estes genes podem ser usados como marcadores moleculares em programas de melhoramento animal. A seleção de animais mais resistentes baseada no conhecimento do perfil genético dos animais possibilita a redução de aplicações de medicamentos, com conseqüente redução nos níveis de contaminação dos produtos e do meio ambiente. Desta forma, é importante identificar e caracterizar a expressão gênica em animais hígidos e com mastite para posterior utilização destas informações na busca de genes que possam ser testados e validados como marcadores para tais condições fisiológicas. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão de genes relacionados com o fenótipo de resistência/susceptibilidade à mastite. Para tanto, foi investigada a expressão dos genes interleucina 2 (*IL-2*), interleucina 4 (*IL-4*), interleucina 6 (*IL-6*), interleucina 8 (*IL-8*), interleucina 10 (*IL-10*), interferon gama (*IFN- γ*) e fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*) em fêmeas bovinas com e sem mastite clínica das raças Holandesa Preto e Branco (PB) e Gir Leiteiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite bovina e seu impacto sobre a pecuária

A mastite ou mamite bovina é a doença de maior incidência nos rebanhos bovinos no mundo, afetando até mesmo rebanhos que adotam programas de controle. As conseqüências mais sérias são as consideráveis perdas econômicas acarretadas pela diminuição de qualidade e quantidade do leite, aumento nos custos de tratamento e serviços veterinários, e nos casos clínicos, no descarte de toda a produção de leite do animal ou até mesmo em casos extremos, na morte do mesmo (Nonnecke e Harp, 1988; Schutz, 1993; Veiga et al.,1994).

A mastite é uma doença complexa caracterizada pela inflamação da glândula mamária em resposta a microrganismos patogênicos que penetram na glândula através do canal do teto e se multiplicam, podendo invadir o tecido mamário (Oviedo-Boyso et al., 2006). A resposta inflamatória pode ser causada também por fatores químicos, físicos ou traumáticos. Ela é considerada uma doença multifatorial, em que fatores de risco relacionados ao hospedeiro (condições fisiológicas e genéticas), ao microrganismo patogênico e ao ambiente contribuem para a ocorrência da doença (LeBlank et al., 2006).

Existem duas formas de mastite: a subclínica e a clínica. A mastite subclínica ocorre quando o patógeno infecta um ou mais quartos mamários. Neste caso ocorre o desenvolvimento de reação inflamatória, mas não há o aparecimento de sintomas clínicos e, assim, o leite produzido tem aparência normal (Ruegg, 2001). Nesta situação, o sistema imune do animal responde a este desafio por meio do envio de células de defesa, principalmente neutrófilos polimorfonucleados, para o local a fim de combater o patógeno. Esta resposta é verificada por um aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite. Em um animal saudável, a CCS é geralmente menor que 200.000 células/mL, valores maiores estão associados quase

sempre a infecção por bactéria. A mastite clínica, por sua vez, é verificada quando o leite tem uma aparência anormal ou a vaca apresenta sinais sistêmicos da doença. Os sintomas mais comuns são a produção de leite com grumos ou ralo, tetas avermelhadas com temperatura elevada e perda do apetite (Smith et al., 1985; Oviedo-Boyso et al., 2006).

Os microrganismos que causam a mastite são classificados como contagiosos e ambientais, de acordo com o reservatório e/ou a via de transmissão (Hogan e Smith, 1998). O reservatório primário dos patógenos são as tetas da vaca e a via primária de transmissão é de uma vaca para a outra durante a ordenha por meio de equipamentos, má higienização dos tetos antes da ordenha e mãos do ordenhador. Os patógenos mais comuns são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Muitas estirpes destas bactérias são altamente adaptadas aos hospedeiros e estão associadas à mastite subclínica, podendo ocasionalmente, serem responsáveis por casos de mastite clínica (Ruegg, 2001). O habitat de *S. agalactiae* é a glândula mamária, o que permite a sua erradicação do rebanho se animais infectados forem identificados e tratados corretamente (Bartlett et al., 1992; Biggs, 1995; Rebuhn et al., 1995). Já *S. aureus* é mais difícil de ser controlado e pode invadir rapidamente todos os tipos celulares da glândula mamária (Tollersrud et al., 2000). A mastite causada por *S. aureus* geralmente assume a forma subclínica e tem tendência a se tornar crônica, além de apresentar baixa resposta a tratamento com antibióticos devido a sua localização intracelular nas células epiteliais da glândula mamária (Deogo et al., 2002; Leitner et al., 2003). Sendo assim, após tratamento de caso clínico causado por *S. aureus*, a CCS se mantém elevada por um longo período, principalmente nas vacas multíparas.

O reservatório para os patógenos ambientais são a água, o estrume e a sujeira presente no ambiente. As vacas entram em contato com estes patógenos freqüentemente no curral e nas áreas de passagem. Os patógenos ambientais mais comuns são os coliformes (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*) e outras espécies de estreptococos, sendo que aproximadamente 85% das mastites causadas por microrganismos ambientais são causadas por *E. coli*. Antes da ocorrência de um caso de mastite clínica causada por *E. coli*, a CCS é normalmente baixa, sendo

praticamente igual ao número de CCS dos animais hígidos ou com mastite clínica ou subclínica. Além disso, após a resolução do caso clínico, a CCS sofre redução bastante rápida, diferentemente dos casos causados por *S. aureus*. Vacas com mastite clínica causada por *E. coli* apresentam também mais sintomas sistêmicos do que vacas com mastite clínica causada por *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (Haas et al., 2002). Há relatos que alguns agentes causam quadros de mastite mais severa, o que leva a maiores perdas na produção de leite, como nos casos de *Mycoplasma* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (Gröhn et al., 2004).

A mastite causada por microrganismos compreende três estádios: 1) invasão do patógeno: deslocamento do patógeno através do canal do teto; 2) infecção: a bactéria coloniza as cisternas da glândula mamária, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro e da virulência do patógeno; 3) inflamação: aumento da CCS e aparecimento dos sinais clínicos (Oviedo-Boyso et al., 2006). Devido a estes aspectos, a resistência/susceptibilidade à mastite é uma característica complexa, já que vários fatores estão envolvidos na sua fisiopatologia.

Em rebanhos especializados estima-se que a mastite seja a responsável por cerca de 15 a 34% das razões de descarte em vacas adultas e de até 10% em primíparas. A longevidade das vacas de um rebanho é característica que afeta consideravelmente os resultados produtivos das fazendas. Quando a longevidade aumenta, geralmente há incremento da produção de leite, pois se abre a oportunidade de maior descarte das vacas de baixa produção, e conseqüentemente, possibilita maior quantidade de vacas adultas, cuja produção é maior que dos animais jovens. A longevidade de um rebanho tem relação com o descarte voluntário (animais de baixa produção) e involuntário (outras razões, como infertilidade, sanidade, etc). A redução do descarte involuntário é uma forma de reduzir custos e aumentar o lucro dos rebanhos. Por isso, maiores índices de ocorrência de mastite podem aumentar a taxa de descarte e os custos de reposição (Sewalem et al., 2006). Nos últimos anos, as tendências desfavoráveis para fertilidade e susceptibilidade à mastite em bovinos de leite motivaram os países europeus a revisarem os objetivos de seus

programas de seleção e aumentarem a ênfase nas características não produtivas (VanRaden, 2004; Miglior et al., 2005).

2.2 Genética da resistência à mastite e genes candidatos

Devido ao grande número de vias metabólicas, moléculas e células envolvidas na característica de resistência, a mastite é uma característica muito complexa, que depende de componentes genéticos e também de fatores ambientais e fisiológicos. Em uma definição mais ampla, a resistência pode ser conceituada como sendo a habilidade que o hospedeiro tem de evitar a infecção ou de rapidamente recuperar-se dela (Detilleux, 2002). Num sentido mais restrito, a resistência pode ser definida como sendo a capacidade do animal em impedir o estabelecimento, sobrevivência e/ou desenvolvimento de uma bactéria em particular (Rainard e Riollet, 2006).

Existem, todavia, recursos genéticos nas regiões tropicais que, se adequadamente identificados, podem contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção animal. A variação genética existente entre as raças de *B. taurus* e *B. indicus* permite a identificação de características associadas à resistência às doenças, aos parasitas, ao calor e à qualidade dos produtos. As atuais ferramentas da genética molecular possibilitam a prospecção e o isolamento de genes associados à saúde animal e à qualidade de produtos. Grande parte dos trabalhos realizados para identificar e estudar genes envolvidos na resposta de resistência à mastite foi conduzido em raças de origem européia (*B. taurus*). Além disso, a resposta de animais zebuínos comparada com animais europeus ainda é pouco caracterizada e entendida.

A maioria dos estudos sobre resistência a mastite focalizam o fenótipo de CCS no leite e mastite clínica para inferir sobre o genótipo de resistência. Vários trabalhos têm estabelecido herdabilidade moderada para CCS, $h^2 = 0,10$ a $0,14$ e baixa para mastite clínica, $h^2 < 0,10$ (Detilleux et al., 1994; Mrode e Swanson, 1996; Heringstad et al. 1999; Rupp e Boichard, 1999).

Também tem sido observado que vacas com baixa produção são menos susceptíveis à mastite, com correlação genética entre mastite clínica e produção de proteína e leite de 0,45 e 0,25, respectivamente. A CCS também está geneticamente correlacionada com mastite clínica, em que $r_G = 0,30$ a $0,70$ (Rupp e Boichard, 1999; Henringstad et al., 1999). No Brasil, os dados para incidência de mastite são escassos, não fazendo parte dos arquivos de dados zootécnicos dos bovinos de leite, o que prejudica a realização de levantamentos e análises genéticas para identificação e seleção de animais resistentes. A dificuldade em obter dados sobre os índices de ocorrência da doença tem levado à utilização do índice de CCS pelas indústrias, cooperativas laticinistas e centros de pesquisa, como medida indireta da ocorrência de mastite.

Várias abordagens moleculares são destinadas a incrementar a seleção de animais resistentes às diversas enfermidades para posterior emprego em programas de melhoramento genético, dentre elas pode-se citar a varredura genômica com marcadores microssatélites para detecção de QTL (*Quantitative Trait Locus*). Desta forma, muitos autores têm identificado regiões de QTL para resistência à mastite (Ashwell et al., 1996; Ashwell et al., 1997; Boichard e Bishop, 1997; Klungland et al., 2001; Heyen et al., 1999). Nos cromossomos BTA1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, e 29 têm sido encontrados QTL para resistência à mastite (Rupp e Boichard, 2003). Pode-se notar que foram identificados QTL em quase todos os cromossomos, isto se deve principalmente aos tipos de população utilizada e delineamentos. Alguns destes QTL foram confirmados em mais de um trabalho que usaram populações e delineamentos diferentes dos iniciais.

Em estudo de identificação de QTL para resistência à mastite, foram encontrados QTL fortemente correlacionado à CCS nos cromossomos BTA21 e BTA22 (Sugimoto et al., 2006). A partir de dados de correlação genética, mapeamento fino, seqüenciamento e expressão gênica, identificou-se o gene *FEZL* (*forebrain embryonic zinc-finger-like*) como candidato ao fenótipo de resistência/susceptibilidade à mastite; este gene está mapeado no BTA22. Vacas da raça Wagyu - *Japanese black* (*B. taurus*) suscetíveis à mastite apresentavam no gene *FEZL* uma inserção de três

bases na região que codifica para resíduos contíguos de glicina, alterando esta seqüência de 12 resíduos de Gly (12G) para 13 (13G). Animais homozigotos 13G eram duas vezes mais susceptível à mastite do que vacas homozigotas 12G. Além disto, a expressão do gene *FEZL* é maior em vacas com mastite do que em vacas hípidos. Sugimoto et al. (2006) constataram também que a proteína FEZL liga-se à região promotora do gene *SEMA5A* (*semaphorin 5A*), na seqüência GCAG, ativando a sua expressão. FEZL 12G induz a expressão de *SEMA5A* a níveis maiores que FEZL 13G. Estes mesmos autores, em ensaios *in vitro*, também verificaram que *SEMA5A* por sua vez, induz a expressão de nove genes relacionados à resposta de inflamação e que FEZL 12G induz maior expressão de *TNF- α* e *IL-8* do que FEZL 13G.

Dados biológicos anteriores corroboram a hipótese postulada por Sugimoto et al. (2006) de que o *FEZL* é um dos genes responsáveis pela resistência à mastite em bovinos. Heyen et al. (1999) identificaram QTL para CCS no BTA22, onde o *FEZL* está mapeado. A FEZL atua como um fator de transcrição que controla o desenvolvimento de neurônios monoaminérgicos (Matsuo-Takasaki et al., 2000). A proteína *SEMA5A* pertence à família de proteínas Semaforinas que exercem funções conservadas no desenvolvimento neuronal. Estudos recentes mostram que o sistema imune e neuronal tem várias vias em comum (Kantor et al., 2004).

Nem sempre o fenótipo de resistência/susceptibilidade está correlacionado com mutações no gene responsável diretamente pela característica, algumas vezes este fenótipo pode ser dado pela simples mudança do nível de expressão ou então a expressão tardia do gene, quando comparado com outro fenótipo. Por isto, a determinação dos níveis de expressão dos genes relacionados à resposta de resistência é de grande importância para se compreender e poder intervir no processo. 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. Esse processo é especialmente importante no caso de características de baixa e moderada herdabilidade e de caráter complexo como a mastite.

2.3 Genes selecionados para análise

Como a resposta de resistência é uma característica complexa, vários genes podem estar envolvidos na determinação desta função. Assim, os genes envolvidos na resposta imune têm sido apontados como fortes candidatos para o fenótipo de resistência, sendo que os principais genes envolvidos nestas rotas são *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α* , além dos receptores *Toll-like* (Alluwaimi et al., 2003; Ferens et al., 1998; Oviedo-Boyso et al., 2006; Rambeaud et al., 2003; Shuster et al., 1993).

Os linfócitos são considerados elementos chave na regulação e na função efetora do sistema imune, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células (Brossard e Wikel, 2004). A ativação de células T antígeno-específicas dispara vias de sinalização para produção de citocinas, diferenciação e proliferação celular (Janeway et al. 2002), podendo diferenciar-se em células Th₁ (células T auxiliares ou Th – *Helper*), que determinam a imunidade celular e Th₂, determinando a imunidade humoral, de acordo com as citocinas secretadas. Células Th₁ secretam interleucinas IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IFN- γ e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), enquanto células Th₂ secretam, preferencialmente, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Cher e Mosmann, 1987; Else e Finkelman, 1998). As citocinas com perfil Th₁ e Th₂ atuam como sinais imunorregulatórios para geração de resposta imune mediada por células e anticorpos, respectivamente (Wikel, 1997). A análise de citocinas constitui poderosa ferramenta para caracterização da resposta imune aos parasitas e a outros agentes infecciosos. Deste modo, o nível de expressão de IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α , relacionados à resposta do tipo Th₁, foi avaliado, assim como IL-4, IL-6 e IL-10 que apresentam perfil Th₂.

A proteína IL-2 é produzida por linfócitos CD4⁺ e regula a resposta imune adquirida, por meio do estímulo ao crescimento e a diferenciação dos linfócitos B, do aumento da proliferação de linfócito T, da ativação das células *natural killer* (NK) e da indução da ativação e aumento da proliferação do linfócito T. Alterações na produção de IL-2 diminuem a capacidade de resposta imune da glândula mamária, o que contribui para a

proliferação da bactéria patogênica (Sordillo et al., 1991; Sordillo e Streicher, 2002). A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, expressa em linfócitos com função antagônica ao IFN- γ , estimulando a diferenciação de LTh₀ em LTh₂ (Belardelli, 1995). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, células endoteliais e linfócitos e está envolvida no choque séptico agudo durante a mastite causada por coliformes ou *S. aureus*, facilitando a mudança de neutrófilos por monócitos na glândula mamária, que é necessária para a redução dos efeitos deletérios dos neutrófilos (Slebozinski et al., 2002; Ohtsuka et al., 2001).

A IL-8 é uma quimocina pró-inflamatória produzida por monócitos, linfócitos T, macrófagos e células endoteliais e epiteliais. Além disso, esta proteína induz a inflamação, auxilia a IL-1 na indução da migração dos neutrófilos para o tecido da glândula mamária e é um forte quimoatraente. Ela é ativamente produzida na mastite causada por *E. coli*, porém, quando a mastite é causada por *S. aureus* a IL-8 apresenta baixa concentração (Alluwaimi, 2004; Persson Waller et al., 2003). A IL-10 também é uma interleucina anti-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados e LTh₂, responsável por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-2) pelos macrófagos (Belardelli, 1995). A proteína IFN- γ é produzida pelas células CD4⁺/CD8⁺ e células NK em resposta à presença de estímulo mitogênico e antigênico. Ela ativa a resposta imune adquirida, linfócito T e a produção de IL-12. Também aumenta a capacidade fagocitária de neutrófilos recrutados para a glândula mamária (Strichman e Samuel, 2001; Nonnecke et al., 2003). TNF- α (*Tumor necrosis factor- α* ou fator de necrose tumoral α) é produzida por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. Ela participa da atividade quimiotática dos neutrófilos, induzindo a expressão de moléculas de adesão pelas células epiteliais e a expressão de *IL-8*, na fase tardia da infecção, sendo a principal citocina produzida durante o estágio inicial de infecção, além de ser responsável pelo choque agudo causado por *E. coli* e ser a principal mediadora da resposta contra bactérias Gram negativas (Oviedo-Boyso et al., 2006; Sordillo e Streicher, 2002).

Segundo Wellnitz e Kerr (2004) as células epiteliais da glândula mamária de bovinos, quando agredidas, auxiliam na resposta inflamatória

produzindo as citocinas IL-8 e TNF- α . Bannerman et al. (2004a) verificaram diferentes padrões de produção de citocinas entre infecções com *E. coli* e *S. aureus* em bovinos: no caso de infecção com a primeira, há produção de IL-8 e TNF- α , o que não foi verificado na infecção causada pela última. Isso explica, em parte a maior capacidade da *S. aureus* de estabelecer mastites crônicas, quando comparada com coliformes.

2.4 PCR quantitativo em tempo real

Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos como humanos, ratos, suínos, bovinos e outras espécies. A maioria dos estudos em suínos e bovinos tem a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como no caso das reprodutivas e aquelas relacionadas à resistência a doenças, sendo esta importante ferramenta para a seleção e avaliação de genes candidatos (Fahrenkrug et al., 2002).

Dentre as metodologias disponíveis para a identificação e a expressão de determinados genes, encontra-se a análise genômica funcional, que possibilita caracterizar os padrões de expressão de mRNA e proteína e tem se mostrado ser estratégia muito informativa. O produto inicial da expressão gênica em um organismo é denominado transcriptoma e refere-se ao conjunto de RNA mensageiro, cuja informação é requerida pela célula em determinado momento (Binneck, 2004). Portanto, a quantidade de mRNA indica a expressão de determinado gene (Hocquette, 2005).

A Transcrição Reversa combinada à Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) é um método *in vitro* para amplificar seqüências definidas de RNA mensageiro, sendo utilizada especialmente em situações em que somente pequenas quantidades de material são disponíveis para análise. Pode ser utilizado para determinar a presença ou a ausência de determinado transcrito, comparar níveis de mRNAs em diferentes amostras e para caracterizar padrões de expressão de mRNAs. A PCR convencional não pode ser usada em estudos que visam quantificar ou mesmo medir

diferenças de níveis de expressão de diferentes amostras, pois, ao contrário da PCR convencional, o método de PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) monitora a reação a cada ciclo, permitindo a detecção direta dos produtos de PCR na fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial. Este método é muito sensível e pode ser usado para quantificar mRNA em baixos níveis, assim ele tem se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica (Livak e Schmittgen, 2001; Wong e Medrano, 2005).

A técnica de qPCR associa amplificação do gene alvo em cada ciclo com emissão de fluorescência. Assim, a quantidade gerada de produto gênico é proporcional à quantidade de fluorescência emitida em cada ciclo (Bustin e Nolan, 2004; Wong e Medrano, 2005). Várias metodologias para amplificação em qPCR vêm sendo desenvolvidas e variam quanto à especificidade do alvo de amplificação, custo e precisão. Dentre elas, pode ser citado o sistema *SYBR Green* que é um fluoróforo com sistema de detecção não específico, que se liga a qualquer dupla fita de DNA gerada durante a reação de PCR, emitindo fluorescência (Bustin, 2000; Bustin e Nolan, 2004). O uso deste método de detecção tem sido bastante empregado em ensaios de qPCR, pois tem a vantagem de ser mais barato em relação à construção de sondas marcadas. Um aspecto importante do uso de *SYBR Green* é que os *primers* específicos utilizados na reação de PCR devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que esse corante se liga a qualquer dupla fita de DNA.

Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar (*threshold*) e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requeridos para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido como ciclo limiar (*cycle threshold*) ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação (Bustin e Nolan, 2004).

Na técnica de qPCR, duas estratégias de quantificação podem ser empregadas: a quantificação absoluta ou a quantificação relativa. Na quantificação absoluta, o número de cópias de mRNA é determinada pela construção de uma curva padrão. Para construção desta curva padrão é utilizado diluições seriadas de uma amostra de concentração conhecida. Neste tipo de quantificação não é necessário o emprego da referência endógena, somente é elaborada a curva padrão em que os valores de Ct ou intensidade de fluorescência de uma diluição seriada são plotados com relação à quantidade presente em cada ponto da diluição. A quantificação relativa, ou método comparativo, se baseia na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna por meio dos Cts de cada amostra (Pfaffl et al., 2002). Este método é mais usado quando existem muitos genes a serem testados em muitas amostras. Ele tem a vantagem de não necessitar da construção de curvas padrão, porém as eficiências de amplificação dos genes de interesse e controle têm de ser similares para obtenção de resultados confiáveis (Leutenegger et al., 2000).

Em ambos os casos recomenda-se o uso de genes de caráter constitutivo, os quais mantêm as funções celulares básicas com mRNA expresso em todos os tipos celulares e estádios de desenvolvimento (Bas et al., 2004). Estes genes são denominados como genes referência, ou controles endógenos, em que as mensurações no final da reação de PCR são estimadas a partir dele, evitando-se, assim, erros comumente associados a tais sistemas de amplificação. Tais genes devem ter expressão em todos os tecidos e em todas as fases do desenvolvimento e não devem ser afetados pelo tratamento experimental. Vários são os genes referência utilizados, sendo os mais comuns: β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e o RNA ribossomal (rRNA) 18S (Huggett et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais e coleta das amostras

Foram utilizadas seis vacas PO da raça Holandesa PB (*B. taurus*) e seis vacas PO da raça Gir Leiteiro (*B. indicus*). As vacas da raça Holandesa PB foram provenientes da Fazenda São Bento, localizada no Distrito São Venâncio, Coimbra (MG), enquanto as vacas da raça Gir Leiteiro foram oriundas da Fazenda Brasília, em São Pedro dos Ferros (MG), ambas as fazendas realizam o controle leiteiro regular. Dois grupos diferentes de animais foram selecionados para cada raça. Um grupo livre de infecção da raça Holandesa PB e o outro com mastite clínica da mesma raça. Da mesma forma foram formados grupos de vacas Gir Leiteiro sem mastite clínica e com mastite clínica, sendo cada um composto por três animais.

Todas as amostras de leite foram coletadas no início da ordenha, porém antes desta, todos os animais passaram por exame clínico do úbere (palpação) e pelo teste da caneca. As amostras de leite das vacas com mastite foram coletadas imediatamente após o aparecimento dos sinais clínicos e antes do tratamento com medicamentos (antibiótico, antiinflamatório, etc.), e, portanto, não houve infecção artificial das vacas em questão. Para cada uma das vacas foram coletadas três amostras de 50 mL de leite em tubos esterilizados, os quais foram transportados em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa para as vacas da raça Holandesa PB, enquanto as amostras dos animais da raça Gir Leiteiro foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora. Todas as amostras foram submetidas ao exame microbiológico no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite ou do Departamento de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa.

3.2 Extração do RNA total

O RNA total das amostras de leite foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Para isso, as amostras de leite foram incubadas por um período de 24 horas a temperatura de 2 a 8°C para isolamento dos leucócitos. Após este período, a camada superior de creme (gordura) formada foi descartada e o leite foi homogeneizado a 37°C com agitação. Em seguida as amostras foram centrifugadas para separação das células brancas e o pelete formado foi ressuscitado em PBS 1X (Cloreto de potássio 2,7 mM, Fosfato de potássio 1,8 mM, Cloreto de Sódio 137 mM, Fosfato de Sódio 10,1 mM) e centrifugado novamente. Após duas ou mais lavagens com PBS 1X, o pelete foi ressuscitado em tampão RLT fornecido no kit mais β -mercaptoetanol, sendo que, em cada 1 mL de tampão, foram adicionados 10 μ L β -mercaptoetanol. O lisado formado foi armazenado a -70°C até uso posterior.

Passou-se o lisado por uma seringa com agulha 20 gauge por pelo menos cinco vezes para que as células se rompessem e então as amostras foram centrifugadas num microtubo a 6000 x g por 3 minutos, quando os restos celulares formaram um pelete. Adicionou-se álcool etílico 70% ao sobrenadante e todo volume foi transferido para a coluna RNeasy, onde o RNA ligou-se ao suporte por afinidade (fase estacionária). Foi realizado tratamento com DNase na coluna, de acordo com as recomendações do fabricante, depois disto, a coluna foi lavada com o tampão RPE por duas vezes e o RNA ligado à coluna foi eluído em 50 μ L de água livre de RNase por centrifugação a 5000 xg, durante três minutos. O RNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria, sendo a relação OD_{260}/OD_{280} utilizada para avaliação da qualidade, pois, devido às baixas concentrações do material, não foi possível visualizá-lo e avaliar a qualidade em gel. O RNA foi armazenado a -70°C até o momento de seu uso.

3.3 Síntese do cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), sendo que 6 µL de RNA total foram adicionados a 1µL oligo(dT)₂₀ (50 µM) e 1 µL de *Anneling Buffer*, correspondendo a um volume total de 8 µL. A reação foi incubada a 65°C durante 5 minutos e, posteriormente, incubada em gelo por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados 10 µL de *2X First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). A reação foi incubada à temperatura de 50°C durante 50 minutos e a 85°C por 5 minutos para inativação enzimática, sendo então, armazenada no gelo.

As concentrações médias do cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria e o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na reação de qPCR.

3.4 Confeccção dos sistemas de RT-PCR em tempo real

A análise da expressão dos genes *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN-γ* e *TNF-α* foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real. Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes foram desenhados usando o programa *Primer Express (Applied Biosystem)* ou *Primer3* a partir de seqüências obtidas do banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou da TIGR (<http://www.tigr.org>). Como referência endógena foi utilizado o gene GAPDH - desidrogenase 3-fosfato gliceraldeído (Leutenegger et al., 2000).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit de SYBR Green® PCR Master Mix (BioRad, Hercules, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Neste Kit estão incluídos todos os componentes para realização das reações de PCR: 2X reaction buffer, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dGTP, 0,8 mM dUTP, iTaq DNA polymerase (50

units/mL), 6 mM Mg⁺², SYBR Green I dye, 1 µM ROX, exceto o par de primers e o cDNA. As reações constaram de 12,5 µL desse mix, 5 µL de cDNA, 100, 200 ou 400 nM de primer e água, totalizando um volume final de 25 µL. Antes da quantificação em tempo real, as reações de PCR foram otimizadas para todos os genes. Para tanto, foram testadas três quantidades de cDNA (10, 100 e 200 ng/µL) e três diluições de *primer* (100, 200 e 400 nM). As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C. Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sendo cada amostra amplificada separadamente.

Os dados obtidos durante a reação de PCR em Tempo Real, gerados pelo equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*, foram exportados para arquivos de planilhas do tipo XLS para posterior análise estatística.

3.5 Análise de dados do RT-PCR em tempo real

Os dados de expressão gênica foram anotados como valores de Ct (*cycle threshold*). O valor de Ct refere-se ao número de ciclos de PCR no qual o sinal de fluorescência é detectado e está acima do valor de limiar da curva de amplificação (Bustin, 2000). Valores de Ct são representativos do número de cópias de moléculas de RNA ou molde inicial e serve como base para comparação entre amostras. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação (Bustin e Nolan, 2004), ele é a base para a quantificação baseada em PCR

quantitativo. O limiar (*threshold*) pode ser estabelecido pelo usuário, e deve estar posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência de PCR é maior.

Após a determinação das melhores condições para a reação de PCR, foi construída uma curva padrão para cada gene, em que diluições seriadas de cDNA (10, 100, 200 ng/μL) foram plotadas contra seus respectivos Ct para cálculo da eficiência de PCR, já que na quantificação relativa é necessário que a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno sejam aproximadamente iguais. A inclinação da reta foi calculada a partir de regressão linear simples e posteriormente foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$, em que E é a eficiência da reação, a qual teoricamente vai de 1 a 2, sendo 2 considerado como valor ótimo (Bustin, 2000). A quantificação relativa foi baseada no método descrito por Pfaffl et al. (2001), que utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref}}}}$$

Em que:

E_{alvo} = Eficiência da reação de PCR dos genes alvo (*IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN-γ*, *TNF-α*).

E_{Ref} = Eficiência da reação de PCR do gene controle endógeno (*GAPDH*).

$\Delta CT = CT_{\text{controle}} - CT_{\text{amostra}}$

Controle = animais hígidos.

Amostra = animais com mastite.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa REST[®] (Pfaffl et al., 2002), disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification> que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*[®] para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos. Este modelo tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição e de se adequar a dados cuja variância pode ser grande, quando não é possível a aplicação de

testes paramétricos. O *software* REST[®] foi desenvolvido com base em testes de permutação, que consideram os resultados obtidos a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento, sendo realizado da seguinte maneira: a taxa de expressão é calculada para os dados experimentais, então os dados são permutados (rearranjados) repetidamente e a cada permutação é calculado o diferencial da taxa de expressão para cada par de dados e esses resultados são comparados aos dados experimentais. No presente trabalho foram consideradas 2000 permutações, o mínimo recomendado de acordo com Pfaffl et al. (2002), suficiente para obtenção de boa estimativa do valor de p (erro-padrão da média ou $EP < 0,005$ quando $p = 0,05$). A proporção desses dados permutados que têm o diferencial da taxa de expressão com valores maiores ao valor dos resultados obtidos experimentalmente fornece o valor de p . Se essa proporção for pequena, então há evidência de que o efeito observado no tratamento não é simplesmente resultado do acaso, resultando em valores de p menores, ou seja, mais significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados seis animais da raça Holandesa PB e seis animais da raça Gir Leiteiro, sendo três com mastite e três sem mastite dentro de cada raça. Os exames microbiológicos indicaram que as três vacas da raça Holandesa PB que apresentaram mastite tinham como agente causador a bactéria *Streptococcus spp.*, enquanto uma das vacas Gir Leiteiro teve a infecção causada por *Klebsiela pneumoniae* e para as demais não foi possível fazer o isolamento da cultura, pois eram vários os agentes causadores.

Na Tabela 1 observa-se a quantidade de cDNA e *primer* otimizada para cada gene e, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos para nenhum gene alvo e nem para o controle endógeno. Exemplos destas curvas de dissociação podem ser vistos nas Figuras 1 e 2. Para os genes *IL-2* e *IL-6* foram utilizados 400 ng/μL de cDNA, já que estes genes não estavam amplificando com a quantidade máxima de *primer* e cDNA testada (400 nM e 200 ng/μL, respectivamente). A curva padrão construída utilizando as condições definidas após a otimização permitiu o cálculo da eficiência de PCR dos genes *GAPDH*, *IL-4*, *IL-8* e *IL-10*, para os demais genes foi atribuída eficiência alternativa de 2,0 (Tabela 1), de acordo com Pfaffl et al. (2002).

Tabela 1 - Concentração de *primer*, cDNA, temperatura de dissociação (TD) do fragmento amplificado, eficiência da reação (E) e coeficiente de correlação de Pearson (r) de cada gene analisado.

Gene	Primer (nM)	CDNA (ng/μL)	TD (°C)	E	r
IL-2	400	400	65,4°C	2,00*	-
IL-4	400	200	79,3°C	4,66	-0,91
IL-6	400	400	72,6°C	2,00*	-
IL-8	400	100	77,2°C	1,66	-0,98
IL-10	200	100	80,2°C	2,38	-1,00
TNF-α	400	100	83,0°C	2,00*	-
IFN-γ	400	200	87,5°C	2,00*	-
GAPDH	400	100	82,6°C	2,23	-1,00

* Eficiência alternativa

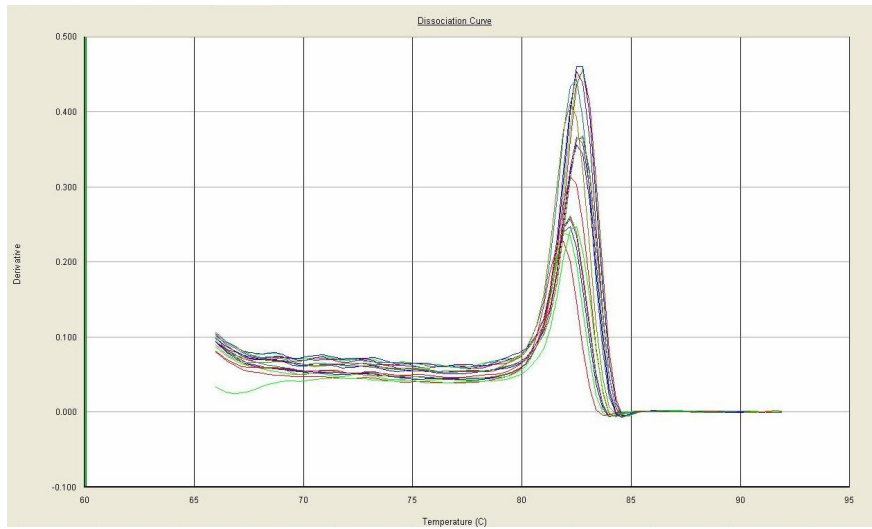


Figura 1 - Curva de dissociação do gene *GAPDH* gerada pelo *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*.

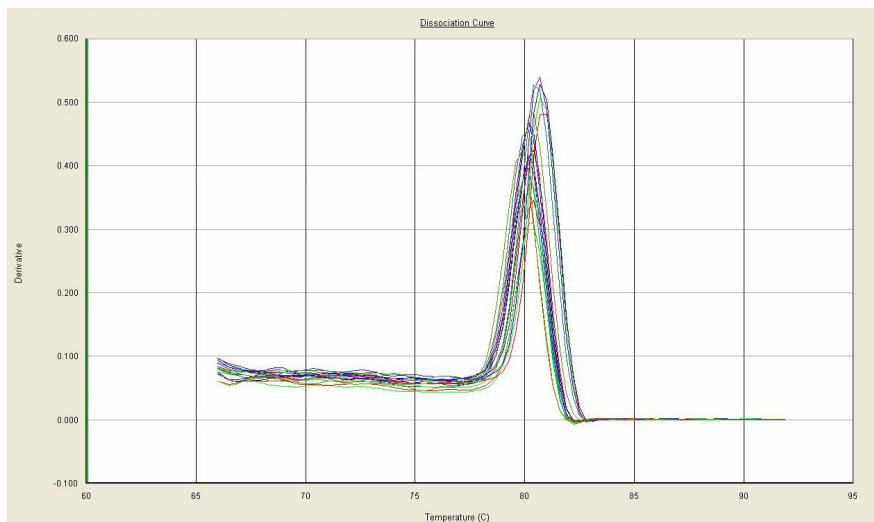


Figura 2 - Curva de dissociação do gene *IL-10* gerada pelo *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*.

O coeficiente de variação das duplicatas de Ct de cada amostra não ultrapassou 5%, sendo a maior variação registrada no gene *IL-6* em uma das vacas da raça Gir Leiteiro sem mastite (2,95%). Porém, grande variação foi observada em relação às médias obtidas entre as amostras de cada grupo (com e sem mastite) de ambas as raças, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de animais (n), média dos Cts (AvgCt), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) para cada grupo de animais e gene.

Gene	Grupo de Animais	n	AvgCt	DP	CV(%)
IL-2	HSM	3	38,06	1,94	8,83
	HCM	3	40,00	0,00	0,00
	GSM	3	40,00	0,00	0,00
	GCM	3	36,97	1,61	7,52
IL-4	HSM	3	36,29	1,86	8,86
	HCM	3	37,12	2,23	10,41
	GSM	3	36,26	1,87	8,94
	GCM	3	38,34	1,66	7,48
IL-6	HSM	3	39,55	0,45	1,97
	HCM	3	40,00	0,00	0,00
	GSM	3	38,59	1,41	6,31
	GCM	3	36,78	3,22	15,15
IL-8	HSM	3	25,64	4,10	27,72
	HCM	3	25,96	0,78	5,23
	GSM	3	23,95	1,58	11,41
	GCM	3	24,31	4,21	29,98
IL-10	HSM	3	33,14	3,48	18,20
	HCM	3	29,81	1,89	10,95
	GSM	3	31,37	0,80	4,44
	GCM	3	29,76	3,29	19,14
TNF- α	HSM	3	31,91	3,32	18,00
	HCM	3	35,25	1,62	7,98
	GCM	3	30,53	0,83	4,69
	GSM	3	32,31	2,99	16,04
IFN- γ	HSM	3	35,49	2,26	11,03
	HCM	3	37,01	1,51	7,08
	GSM	3	37,24	0,97	4,50
	GCM	3	37,62	2,38	10,97
GAPDH	HSM	3	27,55	3,63	22,82
	HCM	3	28,42	0,93	5,65
	GSM	3	24,51	0,12	0,82
	GCM	3	25,87	4,19	28,06

HSM: Holandês sem mastite; HCM: Holandês com mastite; GSM: Gir sem mastite; GCM: Gir com mastite.

Foram realizados cinco tipos de comparações: I) Animais sem mastite vs Animais com mastite de ambas as raças, Tabela 3; II) Vacas da raça Holandesa PB sem mastite vs Vacas da raça Holandesa PB com mastite, Tabela 4; III) Vacas da raça Gir sem mastite vs Vacas da raça Gir com mastite, Tabela 5; IV) Vacas da raça Holandesa PB sem mastite vs Vacas da raça Gir sem mastite, Tabela 6; V) Vacas da raça Holandesa PB com mastite vs Vacas da raça Gir com mastite, Tabela 7.

No geral, considerando as duas raças, os animais com mastite expressaram 20,71 vezes mais IL-10 que os animais sem mastite ($p < 0,05$), e os demais genes avaliados não apresentaram aumento ou diminuição de expressão significativa em relação ao outro grupo ($p > 0,05$), porém houve uma tendência dos animais com mastite expressarem mais IL-8 (2,05 vezes) e menos IL-4 (3,85 vezes), como pode ser observado na Tabela 3 e Figura 3. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e estudos demonstraram que ela é capaz de inibir células *Natural Killer* (Barral-Neto et. al, 1995), produção de IL-1 e TNF- α por macrófagos (Fiorentino et. al., 1991) e IFN- γ e IL-2 por linfócitos Th₁ (Mosmann e Moore, 1991). Isto sugere que os altos níveis de IL-10 possam ter suprimido a expressão de IL-2, assim como também podem ter suprimido a expressão do TNF- α e IFN- γ . Esses resultados corroboram os achados de Riollot et al. (2001) onde animais com mastite crônica causada por *S. aureus* tiveram maior expressão de IL-10 em células do leite que animais hígidos. Além disso, vários estudos mostram que a IL-10 se expressa em células do leite de úberes infectados com diferentes patógenos (Bannerman et al., 2004a; Bannerman et al., 2004b; Bannerman et al., 2005).

Tabela 3 Expressão relativa dos genes em animais com mastite em relação aos animais sem mastite de ambas as raças, com respectivos erros-padrão da média.

Gene	IL-2	TNF- α	IL-8	IL-10*	IL-4	IFN- γ	IL-6
Expressão Relativa	3,55	-2,43	2,05	20,71	-3,85	1,26	3,90
Erro-padrão	$\pm 8,33$	$\pm 1,10$	$\pm 5,26$	$\pm 61,33$	$\pm 0,92$	$\pm 3,09$	$\pm 9,60$

Números positivos: maior expressão em animais com mastite; números negativos: menor expressão em animais com mastite (* $p < 0,05$).

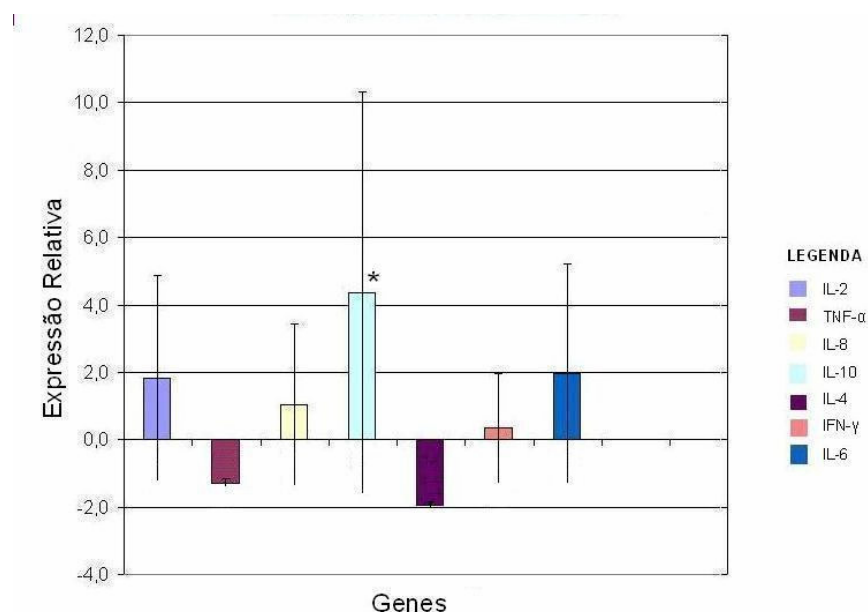


Figura 3 - Expressão relativa em escala logarítmica dos genes da resposta imune (média ± EP) em animais com mastite em relação aos animais sem mastite de ambas raças, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST® (* $p < 0,05$).

Da mesma forma, quando considerados somente os animais da raça Holandesa PB, Tabela 4, as vacas com mastite também expressaram mais IL-10 em comparação aos animais livres de infecção, sendo este valor 35,66 vezes maior ($p < 0,001$), enquanto não houve diferença de expressão ($p > 0,05$) entre os animais com e sem infecção intramamária para todos os demais genes analisados (Figura 4). Na Tabela 5, quando consideradas somente vacas da raça Gir Leiteiro (Figura 5) a expressão do gene IL-10 nas vacas com e sem mastite não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$), porém os animais com mastite tenderam a expressar 12,03 vezes mais IL-10 que os animais hígidos.

Tabela 4 Expressão relativa dos genes em animais da raça Holandesa PB com mastite em relação aos animais sem mastite de mesma raça, com respectivos erros-padrão da média.

Gene	IL-2	TNF-α	IL-8	IL-10***	IL-4	IFN-γ	IL-6
Expressão Relativa	-1,92	-5,07	1,70	35,66	-1,80	-1,44	1,46
Erro-padrão	±1,71	±0,78	±6,25	±162,70	±3,01	±2,47	±4,42

Números positivos: maior expressão em animais com mastite; números negativos: menor expressão em animais com mastite (***) $p < 0,001$).

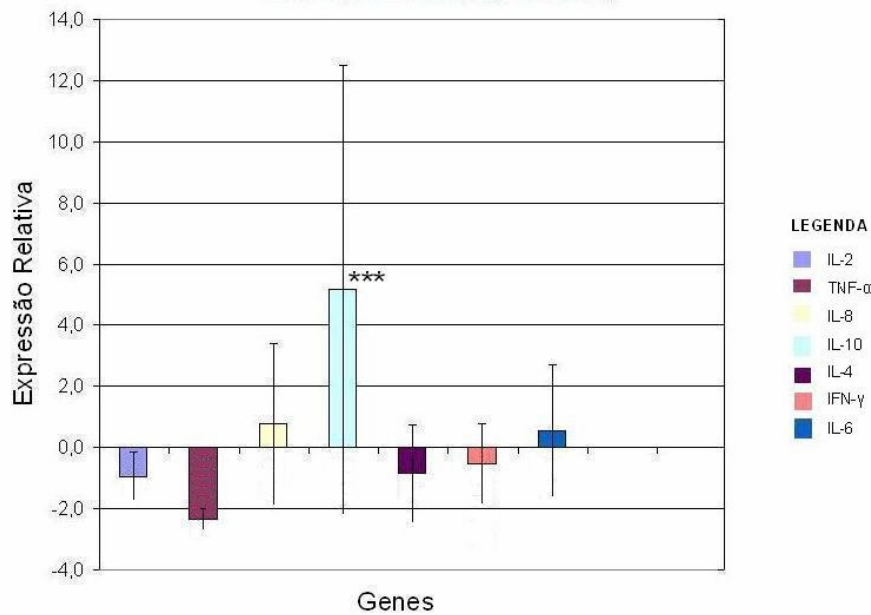


Figura 4 - Expressão relativa em escala logarítmica dos genes da resposta imune (média \pm EP) em animais da raça Holandesa PB com mastite em relação aos animais sem mastite de mesma raça, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®] (***) $p < 0,001$).

Esses resultados sugerem que animais da raça Holandesa PB com mastite expressam mais IL-10 que os da raça Gir Leiteiro também com mastite. De fato, como pode ser observado na Tabela 7 e Figura 7, as vacas da raça Gir Leiteiro com mastite tenderam a expressar 7,35 vezes menos este gene quando comparadas às vacas da raça Holandesa PB com mastite, porém esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

Dentre os animais da raça Gir Leiteiro (Tabela 5 e Figura 5) as vacas com mastite expressaram 8,27 vezes menos IL-4 que as vacas sadias, porém esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). A IL-4 possui ação antagônica ao IFN- γ e sua principal função é regular as respostas imunes mediadas pela IgE, além de estimular a diferenciação de linfócitos Th₀ em Th₂, ou seja, estimular a resposta imune humoral. Os demais genes também não apresentaram alteração de expressão ($p > 0,05$) quando os dois grupos de animais foram comparados, porém os genes IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-8 e IL-10 foram menos expressos em animais hígidos. Estes achados não são conclusivos, uma vez que se espera que o padrão de expressão da IL-4 e IL-10 fossem semelhantes, já que são interleucinas derivadas de linfócitos Th₂ responsáveis pela resposta imune humoral. Além disso, como já

mencionado, espera-se também que IL-10 tenha padrão de expressão oposto ao dos genes IL-2, TNF- α e IFN- γ , porém isso só pode ser observado no caso do IFN- γ . Apesar da diferença de expressão não significativa e da divergência de resultados para alguns genes, estes achados sugerem que os animais com mastite estejam desenvolvendo preferencialmente resposta imune mediada por células. Porém, mais estudos são necessários para que o perfil de expressão gênica em animais com mastite, principalmente da raça Gir Leiteiro, seja melhor caracterizado e compreendido, já que não há estudos desta natureza em zebuínos, não sendo possível realizar nenhum tipo de comparação destes resultados com os de outros autores.

Tabela 5 Expressão relativa dos genes em animais da raça Gir Leiteiro com mastite em relação aos animais sem mastite de mesma raça, com respectivos erros-padrão da média.

Gene	<i>IL-2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-4</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>IL-6</i>
Expressão Relativa	24,23	-1,16	2,47	12,03	-8,27	2,29	10,41
Erro-padrão	$\pm 85,82$	$\pm 3,44$	$\pm 10,03$	$\pm 53,69$	$\pm 0,64$	$\pm 8,72$	$\pm 43,21$

Números positivos: maior expressão em animais com mastite; números negativos: menor expressão em animais com mastite.

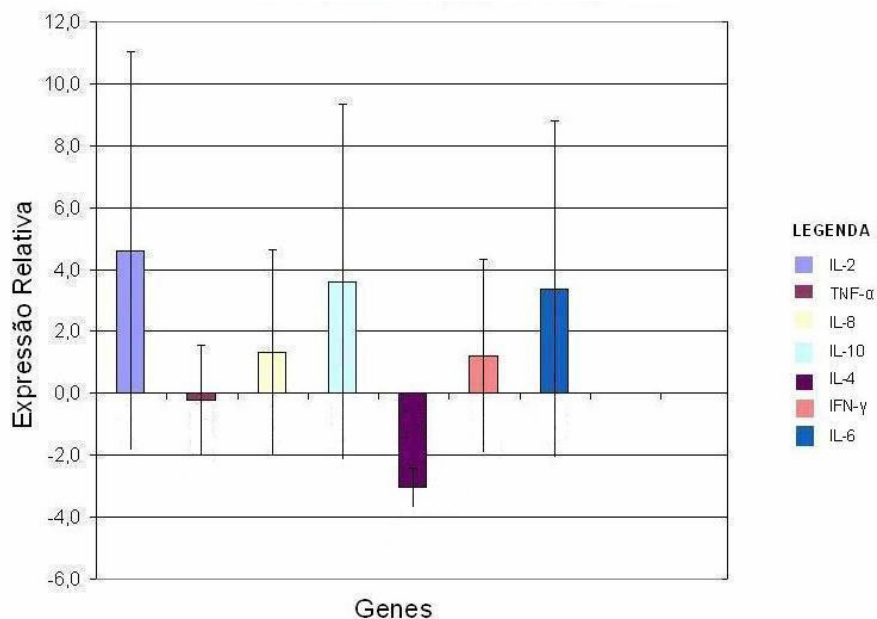


Figura 5 - Expressão relativa em escala logarítmica dos genes da resposta imune (média \pm EP) em animais da raça Gir com mastite em relação aos animais sem mastite da mesma raça, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®].

Além da importância da raça Gir como raça pura e como material genético selecionado para produção leiteira nas condições tropicais do Brasil, a raça também tem sido utilizada em cruzamentos com raças de clima temperado com a finalidade de combinar a alta produção do gado europeu com a adaptabilidade das raças zebuínas ao estresse térmico, doenças, baixa qualidade dos alimentos e manejo inadequado (Martinez et al., 1988). Por isso, torna-se necessária à realização de mais estudos que incluam estes tipos de animais.

Quando os animais de ambas as raças que não apresentaram mastite foram comparados, Tabela 6, todos os genes foram menos expressos nos animais da raça Gir Leiteiro em relação aos animais da raça Holandesa PB (Figura 6). Os genes *IL-2* e *IFN-γ* foram significativamente diferentes ($p < 0,001$), enquanto os demais genes não apresentaram diferença de expressão significativa ($p > 0,05$). Todos esses genes dão origem a citocinas, que são proteínas ou glicoproteínas de sinalização intercelular, que regulam a intensidade e a duração das respostas imunes, tendo influência também sobre respostas inflamatórias, cicatrização de feridas e hematopoiese (Abbas et al., 1994), portanto, os transcritos destes genes podem ser observados em animais que não estejam com mastite clínica, já que não são citocinas específicas de resposta imunológica à mastite, além do que não havia controle se esses animais poderiam estar com qualquer outro tipo de infecção ou enfermidade. Como exemplo, Lahouassa et al. (2007) verificaram níveis significantes de *IL-8* em células da glândula mamária que não estavam infectadas por nenhum tipo de patógeno.

Tabela 6 Expressão relativa dos genes em animais da raça Gir Leiteiro sem mastite em relação aos animais da raça Holandesa PB também sem mastite, com respectivos erros-padrão da média.

Gene	<i>IL-2</i> ***	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-4</i>	<i>IFN-γ</i> ***	<i>IL-6</i>
Expressão Relativa	-43,87	-4,40	-4,85	-2,48	-10,98	-38,57	-5,89
Erro-padrão	±0,07	±0,85	±0,76	±1,72	±0,45	±0,09	±0,52

Números negativos: menor expressão em animais sem mastite da raça Gir em relação aos animais da raça Holandesa PB também sem mastite (***) $p < 0,001$.

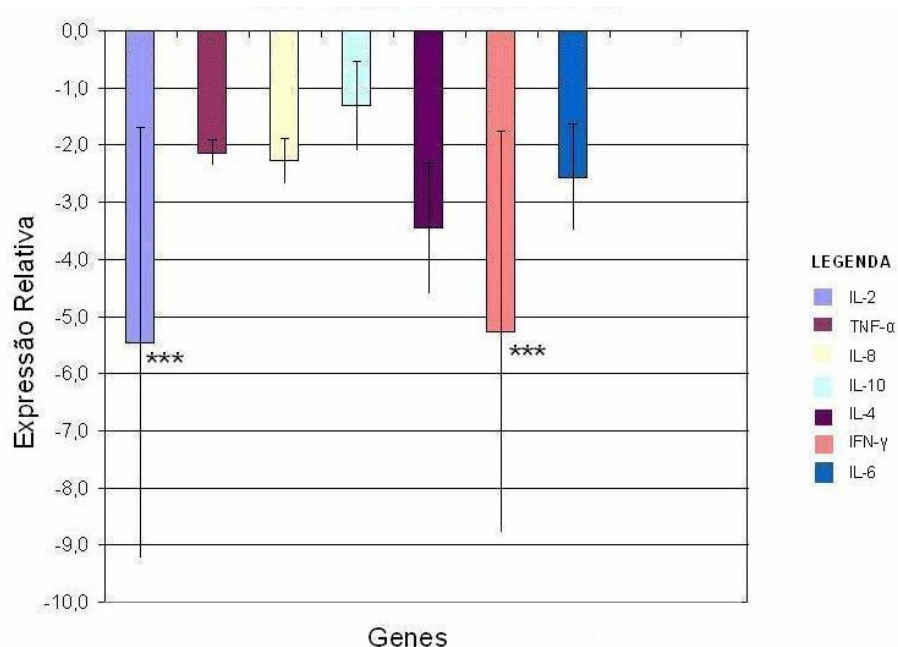


Figura 6 - Expressão relativa em escala logarítmica dos genes da resposta imune (média \pm EP) em animais da raça Gir sem mastite em relação aos animais da raça Holandesa PB também sem mastite, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®] (***) $p < 0,001$.

Neste estudo, a IL-2 só foi significativamente diferente ($p < 0,001$) quando considerado o grupo de animais sem mastite (Tabela 6 e Figura 6), no qual as vacas da raça Holandesa PB apresentaram maior expressão (43,87 vezes) que as vacas da raça Gir Leiteiro, porém neste caso, apesar de não significativamente diferente ($p < 0,05$), as primeiras também expressaram maior quantidade de *IL-10* (2,48 vezes). A IL-2 induz a proliferação de células mononucleares ativadas assim como algumas células epiteliais ativadas. Ela pode ser suprimida pela expressão de IL-10, uma vez que o aumento de IL-10 promove, indiretamente, a inibição da diferenciação dos linfócitos T em linfócitos Th₁. Isto resulta em diminuição da IL-2, visto que esta citocina é produzida, principalmente, por linfócitos Th₁. Este estudo não foi conclusivo, portanto são necessários mais estudos para que o perfil da expressão do gene *IL-2* seja melhor compreendido nas diferentes raças sob diferentes condições.

Tabela 7 Expressão relativa dos genes em vacas da raça Gir com mastite em relação às vacas da raça Holandesa PB também com mastite, com respectivos erros-padrão da média.

Gene	<i>IL-2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-4</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>IL-6</i>
Expressão Relativa	1,06	-1,01	-3,34	-7,35	-50,59	-11,70	1,21
Erro-padrão	$\pm 3,83$	$\pm 4,14$	$\pm 1,22$	$\pm 0,65$	$\pm 0,11$	$\pm 0,34$	$\pm 4,95$

Números positivos: maior expressão em animais com mastite da raça Gir; números negativos: menor expressão em animais da raça Gir com mastite.

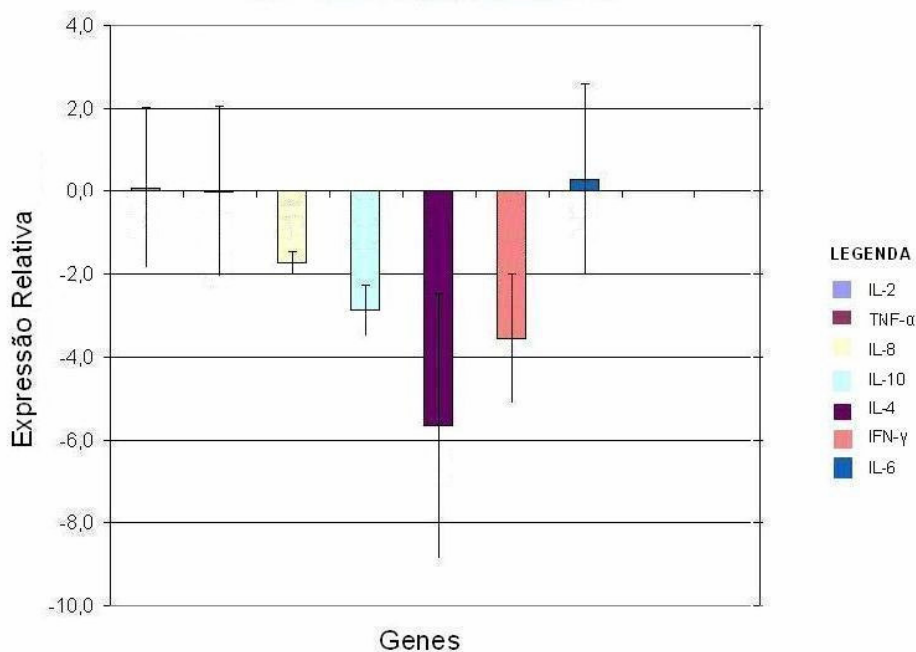


Figura 7 - Expressão relativa em escala logarítmica dos genes da resposta imune (média \pm EP) em vacas da raça Gir com mastite em relação às vacas da raça Holandesa PB também com mastite, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®].

No presente estudo, assim como os resultados obtidos para *IL-2*, o gene *IFN- γ* só apresentou expressão diferencial significativa ($p < 0,001$) no caso dos animais sem mastite (Tabela 6 e Figura 6), sendo menos expresso nas vacas da raça Gir Leiteiro (38,57 vezes). De acordo com o esperado, mas apesar da diferença não significativa ($p > 0,05$), houve uma tendência do *TNF- α* se expressar mais nas vacas da raça Holandesa PB (4,4 vezes). O *IFN- γ* está associado à conversão de linfócitos Th_0 em linfócitos Th_1 , ativação de macrófagos e neutrófilos, além de potencializar a ação do *TNF- α* (Janeway et al., 2002). Portanto, esta citocina está relacionada ao perfil de resposta imunológica Th_1 , ou seja, resposta imunológica do tipo celular.

Além disso, a deficiência de $IFN-\gamma$ está associada à maior susceptibilidade às infecções por microrganismos intracelulares. Apesar da diferença significativa na expressão de $IFN-\gamma$, mais estudos são necessários para que se possa inferir sobre o perfil de expressão nas duas raças, já que não existem outros estudos que comparam a expressão desses genes nas raças Holandesa PB e Gir Leiteiro.

Como mencionado, o presente estudo mostrou que os animais da raça Holandesa PB sem mastite tenderam a expressar mais $TNF-\alpha$ (4,4 vezes) que os animais da raça Gir Leiteiro sem mastite. O $TNF-\alpha$ é uma citocina pró-inflamatória responsável pela ativação de linfócitos T e B, aumento da expressão de moléculas de adesão, ocasionando o acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação, favorecendo o aumento de proteínas de fase aguda (Janeway et al., 2002), sendo, portanto, importante no processo inflamatório inicial, além de estimular a síntese de IL-1 e IL-6. Da mesma forma, as vacas da raça Holandesa PB também tiveram maior expressão de $IL-6$ (quase 6 vezes mais), porém esta diferença não foi significativa ($p>0,05$).

A $IL-8$, juntamente com a $IL-1$ e o TNF tem sido apontada como importante mediadora do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Alguns estudos mostraram que $TNF-\alpha$ e $IL-8$ estão presentes em grande quantidade no leite de úberes infectados por bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa*, porém estão em menores concentrações, ou não são detectadas no leite de vacas com a glândula mamária infectada por *S. aureus* (Bannerman et al., 2004a; Bannerman et al., 2004b; Bannerman et al., 2005; Riollet et al., 2000; Shuster et al., 1997). Neste estudo observou-se que $TNF-\alpha$ e $IL-8$ não apresentaram diferença de expressão significativamente diferente ($p>0,05$), porém ambos parecem se expressar mais nas vacas Holandesas (Tabela 6 e Figura 6). Na Tabela 7 e Figura 7 nota-se que, apesar de não significativo ($p>0,05$), os dois genes tiveram menor expressão em vacas da raça Gir Leiteiro com mastite que em vacas da raça Holandesa PB também com mastite (1,01 e 3,34 vezes, para $TNF-\alpha$ e $IL-8$, respectivamente), o que não corrobora os resultados dos demais autores, já que todas as vacas da raça

Holandesa PB com mastite estavam infectadas por *Staphylococcus spp.* e uma das vacas da raça Gir Leiteiro tinha como agente causador da mastite a *K. pneumoniae*.

Observa-se que o erro-padrão da média exerce grande influência sobre a significância dos resultados, além disso, estes resultados de expressão relativa foram normalizados pela referência endógena, por isso não só as médias de Cts, desvios-padrão e CV dos genes de interesse observados na Tabela 2 devem ser considerados nas análises dos resultados, mas também as médias de Cts, desvios-padrão e CV do gene *GAPDH*.

Estas divergências de resultados podem ser devidas ao fato de que a resposta imunológica pode diferir de acordo com a cepa da bactéria e com o hospedeiro, já que existe muita variação individual. Corroborando os achados aqui descritos, Lahouassa et al. (2007) demonstraram, por meio de estudos *in vitro*, que diferentes cepas de *S. aureus* promovem diferentes respostas em células epiteliais da glândula mamária. Além disso, a intensidade e o nível de expressão dos genes considerados naquele estudo (*IL-8*, *GRO- α* , *GRO- β* , *TNF- α* , *IL-1 β* , *TGF- β 1* e *IL-10*) variaram de acordo com a fase de infecção (3, 10 e 24h após a adição da bactéria à cultura de células). Segundo estes autores, estas respostas diferenciadas implicam em vias de ativação alternativas ou em diferentes níveis de transdução de sinais, refletindo o que é observado *in vivo*. No presente estudo as amostras de leite foram coletadas logo após a manifestação dos sinais clínicos da mastite, ou seja, não houve o controle de quanto tempo o animal havia sido infectado, já que dois animais podem manifestar a doença em dias diferentes, mesmo que a infecção tenha ocorrido ao mesmo tempo. Além disso, não houve controle do tipo de cepa que causou a infecção e, em alguns casos, não foi possível identificar nem a espécie causadora da mastite, como no caso de duas das vacas da raça Gir Leiteiro, onde vários eram os agentes causadores. Vale ressaltar também que as amostras de leite foram coletadas em animais oriundos de rebanhos comerciais, portanto não foi possível afirmar se esses animais estavam livres de outras infecções ou doenças, o que também poderia influenciar nos resultados deste trabalho.

De forma geral, parece que a resposta imune durante a mastite

desenvolve-se com a participação de todos os mecanismos imunes que o organismo dispõe sem a prevalência de uma determinada resposta em detrimento da outra, indicando que não há presença de eventos imunossupressores. Porém, neste trabalho, não se pode afirmar se os genes estudados estão expressando somente o RNA mensageiro ou estão expressando também a proteína, já que existem fatores de regulação pós-transcricional que não foram abordados neste estudo. Por esse motivo seria interessante a realização de estudos proteômicos para a confirmação destes resultados. Além disto a análise da estrutura gênica dos genes diferencialmente expressos neste estudo, como a IL-10, pode ser útil na identificação SNPs marcadores para os fenótipos de resistência e susceptibilidade à mastite.

A mastite é uma doença multifatorial e influenciada por muitos genes, portanto são necessários mais estudos que incluam mais genes e maior número de animais em diferentes fases de infecção, de modo que o mecanismo de resposta imune seja melhor compreendido e venha gerar estratégias mais eficientes de controle e erradicação desta doença. Além disto, um estudo que utilizasse população experimental, incluindo histórico de mastite e CCS de cada animal, ordem de parto, estágio de lactação, além de realizar inoculação de cepas de bactérias específicas e coletar amostras em diferentes horários após a inoculação seria de grande utilidade no entendimento da fisiopatologia desta doença.

Ressalta-se que os genes *IL-4*, *IL-6*, *IL-8* e *TNF- α* não foram diferencialmente expressos ($p > 0,05$) em nenhuma das condições avaliadas, mostrando que estes genes não seriam bons marcadores ou indicadores para mastite nas condições estudadas. Outros experimentos serão iniciados com o objetivo de validar não só os genes considerados neste trabalho, mas outros que podem estar envolvidos na resposta de resistência à mastite em animais taurinos e também zebuínos, uma vez que a maioria dos trabalhos realizados com esta finalidade foi realizada somente com raças de origem européia. Estas pesquisas podem ajudar a entender como ocorrem as reações imunológicas em resposta a esta doença e que afeta de maneira significativa a qualidade e a produção de leite em especial nas raças zebuínas que constituem a base da pecuária em nosso país.

5. CONCLUSÃO

Foi possível verificar diferença no perfil de expressão para alguns genes considerados no presente trabalho em relação ao fenótipo resistência/susceptibilidade à mastite entre as duas raças estudadas. Estudos incluindo maior número de amostras e condições experimentais específicas devem ser iniciados, não apenas para a avaliação do potencial dos genes aqui estudados como marcadores, mas que venham a incluir novos genes e vias metabólicas de modo que se adquira um maior entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da mastite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Celular and Molecular Immunology*. 2^o edition. W. B. Saunders, Philadelphia, 1994, 457 p.

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*, v.50, n.3, p.105-111, 2003.

ALLUWAIMI, A.M. The cytokine of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy, *Research in Veterinary Science*, v.77, p.211–222, 2004.

ASHWELL, M.S.; REXROAD Jr., C.E.; MILLER, R.H.; van RADEN, P.M. Mapping economic trait loci for somatic cell score in Holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. *Animal Genetics*, v. 27, p. 235-242, 1996.

ASHWELL, M.S.; REXROAD Jr., C.E.; MILLER, R.H.; van RADEN, P.M.; DA, Y. Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Animal Genetics*, v. 28, p. 216-222, 1997.

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

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; HARE W.R.; HOPE, J.C. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2420-2432, 2004(b).

BANNERMAN, D.D.; CHOCKALINGAM, A.; PAAPE, M.J.; HOPE, J.C. The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.107, p.201-215, 2005.

BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M. e REED, S.B. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.17, p. 21-28, 1995.

BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HANCOCK, D. D.; HEIDER, L. E. Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio. *Am. Journal of Veterinary Research*, v. 53, n. 9, p. 1715-1721, 1992.

BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTRÖM, S.; HAMMARSTRO, M.L. Utility of the Housekeeping Genes 18SrRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 59, p. 566–573, 2004.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.103, p.161–179, 1995.

BIGGS, A. *Streptococcus agalactiae*: to blitz or not to blitz. *Cattle Practice*, v.3, p.333-346, 1995.

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

BOICHARD, D. e BISHOP, M.D. Detection of QTLs influencing milk production and mastitis resistance with a granddaughter design in Hostein cattle, In: PROCEEDINGS OF THE 48TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF ANIMAL PRODUCTION, 25–28, 1997, *Anais*. Vienna, Austria, paper G1.2, p. 1, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. *Portal do MAPA*. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,2789141&_dad=portal&_schema=PORTAL>. Acesso em: 13 set. 2007.

BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunology. *Parasitology*, v. 129, p. S161-S176, 2004.

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

BUSTIN, S.A. e NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, v.15, p.155-166, 2004.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO LEITE. *CiLeite*. Juiz de Fora MG, 2007. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/cileite.html>> Acesso em: 13 set. 2007.

CHER, D.J.; MOSMANN, T.R. *Journal Immunology*, v. 138, p.3688, 1987.

CONCEIÇÃO, J.R. *Estudo das relações entre resistência genética a carrapatos e características produtivas na espécie bovina*. Belo Horizonte, MG, 1997, 97p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, UFMG.

COSTA, C.N.; FREITAS, A.F.; COBUCI, J.A.; VALLOTO, A.A.; RIBAS NETO, P.G.; HORST, J.A.; BARRA, R.B.; CAMPOS, L.S.; MARQUES, A. Sumário nacional de touros da raça Holandesa – 2007. *Documentos*, n.121, 2007, 64 p.

COULON, J.B.; GASQUI, P.; BARNOUIN, J.; OLLIER, A.; PRADEL, P.; POMIÈS, D. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research*, v. 51, p. 383-393, 2002.

DEGO, O.K.; DIJK, J.E.van; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Veterinary quarterly*, v. 24, p. 181-98, 2002.

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, p.2640-2650, 1994.

DETILLEUX, J.C. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, p. 103-110, 2002.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D. *International Journal Parasitology*, v. 96, p. 1145-1158, 1998.

FAHRENKRUG, S.C.; SMITH, T.P.I.; FREKING, B.A.; CHO, J.; WHITE, J.; VALLET, J.; WISE, T.; ROHER, G.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; QUACHENBUSH, J.; KEELE, J.W. Porcine gene discovery normalized

cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. *Mammalian Genome*, v.13, p.475-478, 2002.

FERENS, W.A.; GOFF, W.L.; DAVIS, W.C.; FOX, L.K.; DEOBALD, C.; HAMILTON, M.J.; BOHACH, G.A. Induction of type-2 cytokines by a Staphylococcal enterotoxins superantigen. *Journal of Natural Toxins*, v.7, p.193-213, 1998.

FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; LEDIC, I.L.; FERNANDES, L.O.; RIBEIRO, S.A. Características reprodutivas de touros da raça Gir. *Revista Gir Leiteiro*, n.7, p.30-38, 2007.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A; VIEIRA, P. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology*, v. 146, p. 3444-3451, 1991.

GADINI, C.H.; KEOWN, J.F.; VLECK, L.D.V. Parâmetros genéticos das produções de leite, gordura e proteína, e do escore de células somáticas em 305 dias de lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34. Juiz de Fora, 1997. *Anais*. Juiz de Fora: SBZ, v.3, p.41-43, 1997.

GENE QUANTIFICATION. Disponível em: <<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification>> Acesso em: 14 abril 2007.

GIRAUDO, J.A.; CALZOLARI, A.; RAMPONE, H.; RAMPONE, A.; GIRAUDO, A.T.; BOGNI, C.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.845-853, 1997.

GRÖHN, Y.T.; WILSON, D.J.; GONZÁLEZ, R.N.; HERTL, J.A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y.H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.87, p. 3358-3374, 2004.

HAAS, Y.; BARKEMA, H.W.; VEERKAMP, R.F. The Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on the Lactation Curve for Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1314-1323, 2002.

HERINGSTAD, 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, 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, p. 165-175, 1999.

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

HOGAN, J.S. e SMITH, K.L. A practical look at environmental mastitis. *Current concepts of bovine mastitis*. National Mastitis Council.1998.

HORTET, P. e SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, v. 37, p. 1-20, 1998.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes and Immunity*, p.1-6, 2005.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Exportações de produtos lácteos:um negócio de futuro. Análises e Indicadores do Agronegócio, 2007, disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=9105>> Acesso em 13 dez. 2007.

JANEWAY, C.A.; TAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLMCHIK, M.J. *Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença*, Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

KANTOR, D.B.; CHIVATAKARN, O.; PEER, K.L.; OSTER, S.F.; INATANI, M.; HANSEN, M.J.; FLANAGAN, J.G.; YAMAGUCHI, Y.; SRETAVA, D.W.; GIGER, R.J., et al. *Neuron*, v. 44, p. 961-975, 2004.

KLUNGLAND, H.; SABRY, A.; HERINGSTAD, B.; OLSEN, H.G.; GOMEZ-RAYA, L., VAGE, D.I., OLSAKER, I., ODEGARD, J., KLEMETSDAL, G., SCHULMAN, N., VILKKI, J., RUANE, J., AASLAND, M.; RONNINGEN, K.; LIEN, S. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome*, v. 12, p. 837-842, 2001.

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

LEBLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1267-1279, 2006.

LEITNER, G., ELIGULASHVILY, R., KRIFUCKS, O., PERL, S., SARAN, A. Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, v.50, p.45-52, 2003.

LEUTENEGGER, C.M.; ALLUWAIMI, A.M.; SMITH, W.L.; PERANI, L.; CULLOR, J.S. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan[®] polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 77, p.275-287, 2000.

LIVAK, K.J. e SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACHADO, S.G.; CARDOSO, V.L.; SILVA, A.M.S.; FREITAS, M.A.R. Influência da ocorrência da mastite na produção de leite e duração da lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30, Rio de Janeiro, 1993. *Anais*. Rio de Janeiro: SBZ, p.587, 1993.

MARTINEZ, M.L.; LEE, A.J.; LIN, C.Y. Age and Zebu-Holstein additive and heterotic effects on lactation performance and reproduction in Brazil. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.800-808, 1988.

MATSUO-TAKASAKI, M.; LIM, J.H.; BEANAN, M.J.; SATO, S.M.; SARGENT, T.D. Cloning and expression of a novel zinc finger gene, *Fez*, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos, *Mechanisms of Development*, v. 93, p.201-204, 2000.

MIGLIOR, F.; MUIR, B.L.; VANDOORMAL, B.J. Selection indices in Holstein cattle of various countries. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.1255-1263, 2005.

MOSMANN, T.R. e MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunology Today*, v. 12, p. A49-A53, 1991.

MRODE, R.A. e 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.

NONNECKE, B.J. e HARP, J.A. Function and regulation of Lymphocyte-Mediated responses: Relevance to bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.5, p.1313-1327, 1988.

NONNECKE, B.J.; KIMURA, K.; GOFF, J.P.; KEHRLI Jr, M.E. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows, *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2359–2368, 2003.

NORMAN, H.D.; VANRADEN, P.M.; WRIGHT, J.R.; SMITH, L.A. Mathematical representations of correlations among yield traits and somatic cell score on test day. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.2205-2211, 1999.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis, *Journal of Veterinary Medical Science*, v.63, p.675–678, 2001.

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, p.399-409, 2006.

PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRÍES, G.A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça Holandesa em lactação. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 4, p. 649-654, 2001.

PERSSON WALLER, K.; COLDITZ, I.G.; LUN, S.; ÖSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis, *Research in Veterinary Science*, v.74, p.31–36, 2003.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.9 e45. 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v.30, n.9 e36, 2002.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 509-515, 2004.

POLITITIS, I.; HIDIROGLOU, M.; BATRA, T.R.; GILMORE, J.A.; GOREWIT, R.C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p.179-184, 1995.

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

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

REBUHN, W. C. *Diseases of dairy cattle*. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1995. 530 p.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.7, p.161-167, 2000.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

RUEGG, P.L. Mastitis Control. *Milking and Milk Quality*, n.405, 8 p., 2001.

RUPP, R. e BOICHARD, D. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2198-2202, 1999.

RUPP, R. e BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, v.34, p.671-688, 2003.

SAC (Scottish Agricultural College). Health and Welfare Index. International Dairy Topics. Disponível em: <<http://www.sac.ac.uk/research/animalhealthwelfare/dairy/breeding/>> Acesso em: 20 set. 2007.

SCHUTZ, M.M. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 7, p. 2113-2129, 1993.

SEWALEM, A.; MIGLIOR, F.; KISTEMAKER, G.J.; VAN DOORMAAL, B.J. Analysis of the Relationship Between Somatic Cell Score and Functional Longevity in Canadian Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v.89, n.9, p. 3609-3614, 2006.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI Jr, M.E.; STEVENS, M.G. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, n.1, p.80-85, 1993.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI Jr, M.E.; RAINARD, P.; PAAPE, M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokinas in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.65, p.3286-3292, 1997.

SLEBODZINSKI, A.B.; MALINOWSKI, E.; LIPCZAK, W. Concentrations of triiodothyronine (T₃), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows, *Research in Veterinary Science*, v.72, p.17-21, 2002.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental Mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, v.68, p.1531-1553, 1985.

SORDILLO, L.M.; SNIDER, M.; HUGHES, H.; AFSETH, G.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.4164-4174, 1991.

SORDILLO, L.M. e STREICHER, K.L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.

STRICHMAN, R. e SAMUEL, C.E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.251-259, 2001.

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; p. 6454-6459, 2006.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ JR., A.J.; LEE, J.C. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2998-3003, 2000.

VANRADEN, P.M. Invited review: selection on net merit to improve lifetime profit. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.3125-3131, 2004.

VEIGA, V.M.O.; TEIXEIRA, M.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. *Controle da mamite dos ovinos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora (MG), 70 p., 1994.

VERGESI FILHO, A.E.; FARO, L.E.; PAZ, C.C.P.; CARDOSO, V.L.; SILVA, D.A.L.; JUNQUEIRA, F.S. Fatores que influenciam o preço do sêmen de touros da raça Gir Leiteiro. *Revista Gir Leiteiro*, n.7, p.78-81, 2007.

WELLNITZ, O. e KERR, D.E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.101, p.191-202, 2004.

WIKEL, S.K. Tick host immunology: significance advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, v. 13, n.10, 1997.

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