

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Estudo do gene MUC1 em características de sanidade e produção em vacas de
leite**

Lucas de Vargas

Pelotas, 2018

Lucas de Vargas

Estudo do gene MUC1 em características de sanidade e produção em vacas de leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Arione Augusti Boligon

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Ricardo Pablos de Souza

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V297e Vargas, Lucas de

Estudo do gene MUC1 em características de sanidade e produção em vacas de leite / Lucas de Vargas ; Arione Augusti Boligon, Fabio Ricardo Pablos de Souza, orientadores. — Pelotas, 2018.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Escore de células somáticas. 2. Gado de leite. 3. Gir. 4. Jersey. 5. Mucina. I. Boligon, Arione Augusti, orient. II. Souza, Fabio Ricardo Pablos de, orient. III. Título.

CDD : 636.214

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Lucas de Vargas

Estudo do gene MUC1 em características de sanidade e produção em vacas de leite

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 22/02/2018

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Fabio Ricardo Pablos de Souza (Co-orientador)
Doutor em Genética pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP/USP. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira
Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Gabriel Soares Campos
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof.^a Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha
Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas. Professora Adjunta da Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

A Deus, por uma vida cheia de bênçãos.

A meus pais, pelo amor que me motiva a seguir em frente e pelos ensinamentos que formaram o meu ser.

Aos amigos, sem os quais a caminhada teria sido muito mais difícil.

Aos professores, pelo conhecimento até aqui acumulado e pela oportunidade do aprendizado.

Ao Paulo Kneib, da Chácara Uaitche, à Estância Cinco Salsos, à Prof^a Patrícia Nascente, ao Apta Instituto de Zootecnia e ao André de Castilhos do Sítio Moirão, por cederem os animais para execução deste trabalho e por toda a solicitude durante esse período.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade de tempo e atenção.

Resumo

DE VARGAS, Lucas. **Estudo do gene MUC1 em características de sanidade e produção em vacas de leite** Polimorfismos e associações. 2018. 43f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O presente estudo teve por objetivo identificar as possíveis relações entre o polimorfismo do gene MUC1 e características produtivas de vacas leiteiras, principalmente no tocante aos parâmetros relacionados à sanidade da glândula mamária. Foram utilizadas amostras de sangue de animais das raças Jersey e Gir, provenientes de Pelotas - RS, Aceguá - RS e Capão do Leão - RS (Jersey), Caxias do Sul - RS e Nova Odessa – SP (Gir). As amostras de DNA foram extraídas do material biológico com o auxílio do método salino. Os genótipos foram obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), e observados em gel de agarose. Produtos de PCR de amostras da raça Gir foram submetidas a sequenciamento pelo método de Sanger. Foram estimados os números de repetições, e calculados as frequências alélicas e genotípicas. Na raça Jersey foram empregados modelos mistos para obtenção de análises de associação entre os genótipos do gene MUC1 e as características produção de leite em quilos (PL), percentual de gordura (GORD), percentual de lactose (LAC), percentual de proteína (PROT) e escore de células somáticas (ECS). Foram identificados 3 alelos em ambas as raças, medindo 800 (alelo 1), 950 (alelo 2) e 1.050 (alelo 3) pares de base (pb) (alelo 3) na raça Jersey e 1000 (alelo A), 1050 (alelo B) e 1266 pb (alelo C) na raça Gir. O número de repetições em tandem estimado foi de 6 (alelo 1), 8,6 (alelo 2) e 10,2 (alelo 3) e 13 (alelo A), 14 (alelo B) e 17 (alelo C), para as raças Jersey e Gir respectivamente. Na raça Jersey o alelo 3 foi o mais frequente nas quatro fazendas estudadas, e o alelo 2 demonstrou ser de rara ocorrência. O genótipo 3/3 teve a maior ocorrência em todas as fazendas, exceto na fazenda 4 onde sua presença foi igual ao genótipo 3/1, que por sua vez foi o segundo mais frequente nas demais fazendas. Corroborando a baixa frequência alélica do alelo 2, não foram encontrados animais homozigotos para o mesmo. O alelo A demonstrou predominância nas populações estudadas da raça Gir, compondo 88% do total de alelos encontrados. Os alelos B e C apresentaram menor ocorrência. Um total de 77% dos animais foram identificados como homozigotos para o alelo A, ao passo que apenas 2% dos animais apresentaram homozigose do alelo C, e nenhum apresentou o genótipo homozigoto com o alelo B. O genótipo heterozigoto AC foi o de segunda maior ocorrência, aparecendo em 15% dos animais. As análises de associação realizadas não apresentaram resultados significativos, e podem ser necessários mais estudos a fim de esclarecer de maneira mais efetiva as associações.

Palavras-chave: escore de células somáticas; gado de leite; Gir; Jersey; mucina; polimorfismos; marcadores moleculares

Abstract

DE VARGAS, Lucas. **Study of the MUC1 gene on health and production traits in dairy cattle**. 2018. 43p. Master's Degree Thesis in Animal Science - Graduate Program in Animal Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

The present study aimed to identify possible relations between the polymorphism of the MUC1 gene and the productive traits of dairy cows, especially regarding those related to the health of the mammary gland. Blood samples from Jersey and Gir animals from Pelotas - RS, Aceguá - RS and Capão do Leão - RS (Jersey), Caxias do Sul - RS and Nova Odessa - SP (Gir) were used. The DNA samples were extracted from the biological material with the aid of the saline method. The genotypes were obtained through the polymerase chain reaction (PCR) technique, and observed on agarose gel. PCR products of Gir breed samples were submitted to sequencing by the method of Sanger. The numbers of repeats were estimated, and allele and genotype frequencies were calculated. In the Jersey breed, mixed models were used to obtain associations between the genotypes of the MUC1 gene and the characteristics of milk production in kilos (PL), fat percentage (GORD), lactose percentage (LAC), protein percentage) and somatic cell score (ECS). Three alleles were identified in both breeds, measuring 800 (allele 1), 950 (allele 2) and 1050 (allele 3) base pairs (pb) (allele 3) in Jersey and 1000 (allele A), 1050 (allele B) and 1266 bp (C allele) in the Gir breed. The number of tandem repeats estimated was 6 (allele 1), 8.6 (allele 2) and 10.2 (allele 3) and 13 (allele A), 14 (allele B) and 17 (allele C), for the Jersey and Gir respectively. In the Jersey breed the allele 3 was the most frequent in the four farms studied, and the allele 2 was found to be of rare occurrence. The genotype 3/3 had the highest occurrence in all farms, except in farm 4 where its presence was equal to genotype 3/1, which in turn was the second most frequent in the other farms. Corroborating the low allele frequency of allele 2, no homozygous animals were found. The allele A showed predominance in the studied Gir populations, making up 88% of the total alleles found. Alleles B and C presented less occurrence. A total of 77% of the animals were identified as homozygous for the A allele, whereas only 2% of the animals presented homozygous of the C allele, and none presented the homozygous genotype with the B allele. The heterozygous AC genotype was the second largest occurring in 15% of the animals. The association analyzes performed did not present significant results, and further studies may be necessary in order to clarify associations more effectively.

Keywords: dairy cattle; Gir; Jersey; molecular markers; mucin; polymorphisms; somatic cell score;

Lista de Figuras

Figura 1	Desenho representando a superfície celular da mucosa protegida por mucinas.....	19
Figura 2	Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de cinco amostras de DNA de Jersey.....	25
Figura 3	Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de 4 amostras de DNA de animais Gir.....	34
Figura 4	Sequência de nucleotídeos das repetições do gene MUC1.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1	Número de animais, número de observações, e estatísticas descritivas das características estudadas.....	24
Tabela 2	Número aproximado de repetições em tandem por alelo no gene MUC1 em vacas da raça Jersey.....	26
Tabela 3	Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do MUC1 em cada fazenda e no total das amostras analisadas.....	27
Tabela 4	Valores do critério BIC (Bayesian Information Criterion) para os diferentes modelos testados.....	28
Tabela 5	Efeito dos diferentes genótipos do gene MUC1 sobre as médias das características em vacas Jersey.....	29
Tabela 6	Efeito da presença dos diferentes alelos do gene MUC1 sobre as médias das características em vacas Jersey.....	29
Tabela 7	Efeito aditivo dos diferentes alelos do gene MUC1 sobre as médias das características em vacas Jersey.....	30
Tabela 8	Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene MUC1 nas amostras analisadas.....	35
Tabela 9	Número aproximado de repetições em tandem por alelo no gene MUC1.	36

Sumário

1 Introdução.....	9
1.1 Objetivos.....	9
2 Revisão da Literatura.....	11
2.1 A raça Jersey.....	11
2.2 A raça Gir.....	12
2.3 Lactose.....	13
2.4 Proteína.....	13
2.5 Gordura.....	14
2.6 Mastite.....	14
2.7 Contagem de Células Somáticas.....	16
2.8 Marcadores moleculares.....	17
2.9 MUC1.....	18
3 Capítulo 1 – Associações entre o gene <i>MUC1</i> e características produtivas e de sanidade da glândula mamária de vacas Jersey.....	21
3.1 Introdução.....	21
3.2 Metodologia.....	22
3.3 Resultados e discussão.....	25
3.4 Conclusões.....	31
4 Capítulo 2 – O gene <i>MUC1</i> é pouco variável em bovinos da raça Gir: Short communication.....	32
4.1 Introdução.....	32
4.2 Metodologia.....	32
4.3 Resultados e Discussão.....	34
4.4 Conclusões.....	36
5 Considerações finais.....	37
Referências bibliográficas.....	38

1 Introdução

A mucina MUC1 tem sido tema frequente na pesquisa científica das últimas décadas. Estudos conduzidos na área de oncologia buscaram, principalmente, esclarecer os mecanismos de expressão dessa glicoproteína em células tumorais. Além disso, a gama de funções associadas à mucina MUC1 é ampla, destacando-se a proteção e lubrificação das mucosas, funções estas, que lhe conferem a capacidade de aprisionar detritos ou microrganismos nessas superfícies, contribuindo para a sua remoção, atuando como uma importante barreira contra infecções (GENDLER, 2001; MATHER, 2001).

Entre os tecidos de expressão da MUC1, cabe destacar a glândula mamária, na qual a MUC1, além da barreira sanitária natural, também participa na composição da membrana do glóbulo de gordura do leite (PATTON, 2001). Com base nisso, diversos estudos foram conduzidos em espécies com aptidão leiteira com objetivo de elucidar as relações entre o MUC1 e as características produtivas e de sanidade da glândula mamária (SANDO et al., 2009; DA ROSA et al., 2015).

Considerando a relevância do assunto e a relativa escassez de estudos envolvendo bovinos leiteiros das raças Gir e Jersey, o objetivo do presente trabalho foi de identificar as variantes alélicas para o gene *MUC1* nessas raças e estudar as relações entre os genótipos e as características produtivas e de sanidade normalmente registradas em rebanhos leiteiros.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

Identificar as possíveis relações entre o polimorfismo do gene *MUC1* e características produtivas de vacas leiteiras, principalmente no tocante aos parâmetros relacionados à sanidade da glândula mamária.

1.1.2 Objetivos Específicos

- I. Identificar polimorfismos no gene *MUC1* em bovinos da raça Jersey.
- II. Estimar as frequências alélicas e genotípicas, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações estudadas.
- III. Verificar as associações entre os diferentes genótipos e a produção de leite, percentual de gordura, percentual de lactose, percentual de proteína e contagem de células somáticas.
- IV. Identificar polimorfismos do gene *MUC1* em bovinos da raça Gir.

2 Revisão da Literatura

2.1 A raça Jersey

Originária da ilha britânica de Jersey, localizada no Canal da Mancha, próxima à costa da França, a raça Jersey é uma das mais antigas raças leiteiras do mundo, possuindo registros como raça pura que datam de aproximadamente seis séculos. Desde o ano de 1789, a ilha de Jersey possuía suas fronteiras fechadas à importação de bovinos, de maneira a evitar a entrada de animais oriundos da França, que além de diminuir a qualidade do rebanho da ilha, acabavam por evadir a cobrança de imposto sob a importação para a Inglaterra. Este fechamento teve fim no ano de 2008, quando os estados de Jersey passaram a permitir a importação de sêmen de touros Jersey de outros locais do mundo, desde que provada sua pureza genética. No ano de 1866 foi inaugurado o “herd book” da raça, no qual passaram a ser inclusos os pedigrees dos animais (BRIGGS, 1980; SJSA, 2008) .

Conhecida como gado Alderney nas primeiras importações, as vacas da ilha de Jersey destacavam-se na Inglaterra por sua produção de leite com altos teores de gordura, já no final do século 18 (YOUATT ;MARTIN, 1853). No ano de 1896, o embaixador brasileiro Joaquim Francisco de Assis Brasil trouxera os primeiros exemplares puros da raça Jersey, os quais chegaram ao Brasil no estado do Rio Grande do Sul, provenientes da Granja de Windsor, pertencente à rainha Vitória (SANTOS, 1999).

As vacas Jersey destacam-se por sua alta produtividade, considerando seu baixo peso adulto, quando comparado ao de vacas da raça Holandesa, variando entre 450 e 550 kg, e entre 650 e 850 kg, respectivamente (BRIGGS, 1980). Embora a quantidade total produzida seja inferior, o leite de vacas Jersey é superior em alguns aspectos qualitativos, em relação ao de vacas da raça Holandês. Nos EUA, os dados de 2014 do conselho de melhoramento genético de gado leiteiro (CDCB, 2014),

mostram uma produção nacional média padronizada por lactação de 9.273 kg de leite em vacas Jersey, com teores de gordura e proteína médios de 4,76%, e 3,62%, respectivamente. Esses mesmos dados apontam uma produção média de 12.260 kg de leite na lactação de vacas Holandesas, porém com teores de gordura e proteína inferiores, de 3,72% e 3,03%, respectivamente.

O padrão racial em vacas Jersey é caracterizado por uma pelagem parda de variados tons, de amarelo claro a pardo escuro, com extremidades e face com pelagem próxima ao preto. Possuem cabeça pequena, curta e de perfil côncavo, com olhos grandes e proeminentes. Seu corpo é triangular, típico dos bovinos do tipo leiteiro, com tórax estreito e costelas separadas. É notável na raça Jersey a docilidade das vacas, e a facilidade de manejo (PAULSON et al., 2015).

2.2 A raça Gir

Os bovinos Gir chegaram ao Brasil, entre os anos de 1870 e 1962, com a importação de 700 animais. A raça possui origem na Índia, mais especificamente nas regiões de Gir da península de *Kathiawar*, e se tornou famosa por sua produção leiteira, tolerância a condições de estresse e resistência a diversas doenças tropicais. A instituição do registro genealógico (*Herdbook*) para raças Zebuínas, no ano de 1938, contribuiu para a disseminação da raça Gir pelo Brasil (GAUR et al., 2003; SANTANA JR. et al., 2014).

A seleção desses animais, realizada na década de 60, era voltada tanto ao duplo propósito (carne e leite), quanto à produção leiteira, em função da diversidade de objetivos de seleção dos criadores na época. Por fim, no ano de 1985, teve início o Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, fato que proporcionou novo estímulo ao aumento da população e melhoria dos parâmetros produtivos da raça, os quais, nos dias de hoje, chegam a índices de 1500 a 3000 kg de produção de leite em 305 dias, e mais de 18000 kg de produção máxima por lactação (SANTANA JR. et al., 2014).

O panorama de registros de nascimentos demonstra um considerável aumento no número de animais da raça Gir e Gir mocho nas últimas décadas, passando de aproximadamente 7.500 animais, em 1995, até o pico de 30.000 registros no ano de 2012. No entanto, os dados compilados nos últimos anos demonstram uma diminuição gradual no número de registros, encontrando-se na casa dos 14.000 no ano de 2016 (ABCZ, 2017).

2.3 Lactose

Principal carboidrato encontrado no leite, a lactose é sintetizada no epitélio da glândula mamária a partir de duas moléculas de glicose absorvidas do sangue. As duas funções de destaque desempenhadas pela lactose são de fonte energética para o neonato, provendo 30% do valor energético do leite bovino, e de exercer o equilíbrio osmótico da passagem dos componentes do sangue para o leite, assim, influenciando diretamente o volume produzido pelo animal (LUCEY; HORNE, 2009).

O leite de vacas possui em média 5% de lactose, e a mesma é identificada com o componente de menor variação (RAPACCI, 2000, LINN, 1988). A variação no teor de lactose pode ser atribuída à alteração de outros componentes do leite, como a proteína e as células somáticas, bem como à qualidade da dieta, pelos valores de fibra, teores de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais. Um aumento nos teores de proteína e CCS do leite, maiores níveis de fibras de baixa qualidade, e diminuição nos teores de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais da dieta, podem influenciar negativamente os teores de lactose do leite (FAGAN, 2010; HENAO-VELÁSQUEZ, 2014).

2.4 Proteína

Constituindo cerca de 3,3% do leite de vacas, as proteínas têm diversas funções nutritivas e tecnológicas. Os aminoácidos encontrados nas proteínas do leite são capazes de atender à maioria das exigências nutricionais do ser humano, além disso, suas propriedades físico-químicas de solubilidade, retenção de água e gordura, emulsificação são de interesse à indústria de lácteos (SGABERRI, 2005).

As proteínas do leite incluem caseínas, lactoglobulinas, lactotransferrinas, imunoglobulinas e microglobulinas, e são comumente classificadas em caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento, de acordo com suas propriedades físico-químicas (LOURENÇO, 2000).

Na ocorrência de mastite, o conteúdo proteico do leite pode apresentar alterações devido a uma mudança na permeabilidade da superfície celular da glândula mamária, com o influxo excessivo de albuminas e imunoglobulinas, aumentando a concentração de proteínas totais e no soro (PEREIRA et al., 1999).

2.5 Gordura

Secretada na forma de glóbulos envoltos em uma membrana, a gordura pode ser considerada como o componente do leite de vacas que apresenta maior variação (3,3% a 4,7%), uma vez que é influenciada diretamente por fatores como dieta e raça dos animais. Os glóbulos de gorduras são constituídos quase em sua totalidade por triacilglicerois, ao passo que em sua membrana estão presentes lipídeos mais complexos (CHRISTIE, 1983; PERES JR, 2001).

O comportamento desta característica em casos de mastite não é claramente definido, uma vez que alguns estudos encontram associações positivas entre o aumento de células somáticas e o teor de gordura e outros apontam o oposto (PEREIRA et al., 1999; SCHÄELLIBAUM, 2000).

2.6 Mastite

O Brasil possui o 2º maior rebanho de vacas leiteiras do mundo, atrás somente da Índia, constituído por mais de 17 milhões de animais no ano de 2015. Em contrapartida, o país é apenas o 5º maior produtor de leite mundial, com um total de 26.300.000 toneladas de leite nesse mesmo ano. Esses dados indicam uma baixa produtividade leiteira das vacas atualmente criadas no Brasil. Esse fato pode estar atrelado, parcialmente, à incidência de mastite nos rebanhos, uma vez que essa é a doença de maior prevalência e geradora de altos custos na produção de leite no mundo todo (SHOOK, 1989; USDA, 2016)).

Com ampla ocorrência em rebanhos leiteiros, a mastite é reconhecida como um dos maiores problemas da cadeia produtiva do leite, provocando perdas econômicas significativas, na casa dos bilhões de dólares anualmente em países como os Estados Unidos (HARMON, 1994). As perdas nos quesitos de saúde e bem-estar das vacas colocam em risco a rentabilidade de um sistema produtivo leiteiro, uma vez que são necessárias várias lactações para que uma vaca retorne o capital nela investido, e isso só é possível mediante sua boa condição sanitária. Além disso, é crescente a preocupação, não somente com a qualidade dos produtos lácteos, mas com a segurança com a qual os mesmos são oferecidos, o que vai de encontro ao uso de antibióticos em larga escala (DE VLIEGHER et al., 2012).

A mastite pode ser definida como a resposta inflamatória da glândula mamária à infecção intramamária causada pela invasão de microrganismos através do orifício do teto. Estes agentes de mastite podem ser divididos em dois grupos, com base em

sua origem e forma de transmissão, sendo estes, microrganismos contagiosos e microrganismos ambientais (COSTA, 1998).

Por microrganismos contagiosos entendem-se aqueles transmitidos de uma vaca para outra, principalmente através da mão do ordenhador ou equipamentos de ordenha, e que estão presentes no corpo do animal, mesmo ocasionalmente sem a manifestação de sintomas. Neste grupo classificam-se o *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* (COSTA, 1998). Os ambientais, por outro lado, são definidos como aqueles presentes no ar, no solo, na água e nas fezes. Os representantes dessa classe são *Streptococcus uberis* e demais estreptococos não classificados como contagiosos, Enterobacteriaceae, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas sp* e alguns tipos de fungos (COSTA, 1998).

A infecção causada por estes microrganismos pode variar em intensidade e duração, sendo a mesma dividida em casos clínicos e subclínicos. Os casos clínicos caracterizam-se pela fácil identificação do processo inflamatório, uma vez que há alterações visíveis na glândula mamária (edema, temperatura elevada e dor) e no aspecto do leite (grumos, pus ou sangue). Nos casos subclínicos, por outro lado, não há nenhum sintoma visível, o que dificulta seu diagnóstico. Por outro lado, há uma diminuição na produção e mudança na composição do leite (HARMON, 1994).

Em um estudo sobre a prevalência de mastite em São Paulo, Bueno et al. (2002) evidenciaram a presença de mastite subclínica em pelo menos um dos quartos do úbere em média em 63,7% das vacas em lactação, contra apenas 7,65% de casos de mastite clínica. Em estudo semelhante no estado do Mato Grosso, 85,2% dos animais examinados apresentava quadro de mastite, sendo 65% dos quartos mamários acometidos por mastite subclínica em contraste com apenas 5,8% apresentando a forma clínica (MARTINS et al., 2010). Neste sentido, Acosta et al. (2016) definem a mastite subclínica como uma doença de alta prevalência e responsável pelas maiores perdas na indústria leiteira.

No Brasil, de forma geral, observa-se uma elevada prevalência do gênero *Staphylococcus spp.* nos casos de mastite. Este gênero é comumente dividido quanto à capacidade do microrganismo em produzir a enzima coagulase, enzima que transforma o fibrogênio em fibrina. Os Staphylococci Coagulase Negativa (SCN) são os principais agentes de mastite subclínica dentro do gênero *Staphylococcus spp.* (ACOSTA et al., 2016; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

2.7 Contagem de Células Somáticas

Desde o início de sua utilização, no fim da década de 1970, a contagem de células somáticas (CCS) tem sido utilizada mundialmente como um indicador para o monitoramento, tanto da mastite, em nível individual, quanto da qualidade do leite (SANTOS, 2006).

Células somáticas são os leucócitos, macrófagos e neutrófilos liberados como resposta do sistema imune às infecções, com objetivo de eliminá-las. Consequentemente na ocasião de infecções da glândula mamária as células somáticas estarão presentes no leite, alterando sua composição (HARMON, 1994).

A CCS individual de vacas em rebanhos leiteiros possibilita a identificação de infecção intramamária, sendo utilizado normalmente um limiar de 200.000 células/ml, a partir do qual há indicativo da presença de infecção (MADOUASSE et al., 2008). A CCS média nacional nos EUA no ano de 2015 foi de 204.000 células/ml, porém, a média de CCS não é um valor confiável (CDCB, 2015). Isso se deve ao fato de que os registros dessa medida, de modo geral, não seguem uma distribuição normal, ou seja, os parâmetros de média, moda e mediana apresentam ampla divergência. Dessa forma, os valores de CCS devem ser convertidos a escore de células somáticas (ECS) para que possibilite avaliação estatística sobre o comportamento desta característica de forma mais precisa. O ECS consiste basicamente em uma conversão dos valores de CCS utilizando um logaritmo de base 2, onde o aumento (ou diminuição) em uma unidade no escore é associado a dobrar (ou dividir por dois) os valores de CCS (SHOOK; SCHUTZ, 1994).

Elevados níveis de CCS no leite não se traduzem em ameaça à segurança alimentar do consumidor final, uma vez que os possíveis patógenos, via de regra, são destruídos durante o processo de pasteurização. Entretanto, as enzimas produzidas por estes podem ser de natureza termoestável, permanecendo nos produtos lácteos e prejudicando sua qualidade e vida de prateleira. Além disso, baixos níveis de CCS estão associados a maiores produções de leite (DANTAS; OLIVEIRA, 2012; SHOOK; SCHULTZ, 1994).

Os valores de herdabilidade encontrados tanto para CCS quanto para ECS são moderadamente baixos, em torno de 0,09. Porém, esse resultado sugere que pode ser de interesse a seleção de matrizes e touros com menores valores para essas características como forma de reduzir suas médias na população (EL-SAIED et al.,

1998; ROMAN et al., 2000). A seleção para menores médias de ECS e CCS também pode se dar com o auxílio de marcadores moleculares.

2.8 Marcadores moleculares

Da necessidade de identificar alelos de interesse cuja expressão seja de difícil detecção, os estudos com marcadores moleculares vêm se desenvolvendo desde o ano de 1923, quando uma primeira ideia foi esboçada em uma pesquisa com linhagens de feijão (SAX, 1923). É diverso o seu emprego na genética animal, seja em estudos de parentesco, testes de paternidade, estimativas de taxas de cruzamento, diversidade genética e identificação de polimorfismos (RAMALHO et al., 2012).

O mapeamento através de marcadores moleculares é realizado, principalmente, por polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e polimorfismos de tamanho de sequência repetitiva simples. A grande maioria dos marcadores presentes no genoma de qualquer espécie é baseada em diferenças de único nucleotídeo. Há registro de vários milhões de SNPs já catalogados em animais de produção, porém, apenas uma parcela consideravelmente menor é utilizada efetivamente em estudos de seleção genômica, genética de populações, desequilíbrio de ligação e estudos de associação genômica ampla (GWAS) (DADI et al., 2012).

O conhecimento sobre a grande proporção de DNA repetitivo em genomas de vertebrados já era difundido entre cientistas mesmo vários anos antes dos primeiros métodos confiáveis de sequenciamento, através do parâmetro C_0t . Este parâmetro é definido como o valor no qual o 50% do DNA desnaturado se reassocia sob condições controladas. Regiões altamente repetitivas apresentam o maior valor C_0t , o que corresponde a aproximadamente 10% do genoma de ratos. Sequências moderadamente repetitivas representam 20% e sequências únicas 70% (RICHARD et al., 2008).

Marcadores baseados em polimorfismos de tamanho de sequência repetitiva simples são encontrados no genoma em menor quantidade, quando comparados a SNPs, e consistem em locais onde o DNA apresenta-se altamente repetitivo. De acordo com o tamanho da unidade de nucleotídeos repetitiva estes polimorfismos são divididos em microssatélites e minissatélites. No entanto, não há um consenso sobre a definição precisa do número mínimo de nucleotídeos necessários para a caracterização de um microssatélite, ou do número mínimo de repetições para

categorizar micro ou minissatélites, sendo proposto que a divisão entre estes marcadores é puramente acadêmica (CANTSILIERES, 2017; RICHARD et al., 2008).

Entende-se por microssatélites curtas repetições em tandem (STR), com uma unidade repetitiva contendo entre 2 e 4 ou 2 e 9 pares de bases (pb), cujo tamanho total pode alcançar até 400 pb. “Ilhas” microssatélite são regiões altamente variáveis e multialélicas, de grande conteúdo informativo que constituem boa parte do DNA de organismos multicelulares (RICHARD et al., 2008).

Minissatélites são regiões do genoma com repetições em tandem de até 100 pb, sendo estimado a presença de até 1500 marcadores desse tipo em um genoma haploide. É comum que essas regiões sejam altamente polimórficas devido à variação no número de repetições, chamado de variável número de repetições em tandem (**VNTR**) (RAMEL, 1997).

2.9 MUC1

O reconhecimento da mucina como um componente do corpo animal diferente dos demais data de mais de 150 anos. A introdução do termo “mucina” é atribuída a Nicolas Theodore de Saussure, no ano de 1835, como opção ao termo alemão “schleimstoff”, usado até então como definição do que foi estabelecido inicialmente como uma secreção límpida e viscosa (GOTTSCALK, 1960). As mucinas são definidas como glicoproteínas grandes, abundantes e filamentosas, presentes em locais de encontro entre muitos epitélios e seus ambientes extracelulares, seja o lúmen de órgãos ocos, no trato gastrointestinal, ou ductos para o ambiente externo, na glândula mamária (DEKKER et al., 2002).

Mucinas são fortemente glicosiladas, encontradas em secreções mucosas e como glicoproteínas transmembranares da superfície celular, com a porção glicano exposta ao ambiente externo. As mucinas secretadas, formadoras de gel, apresentam-se como primeira linha de defesa das superfícies epiteliais servindo de barreira física entre o ambiente externo e a mucosa. A segunda linha de defesa pode ser atribuída às mucinas transmembranares, agindo possivelmente como sensores de distúrbios do ambiente extracelular e sinalização para o interior da célula. Oito mucinas secretadas foram identificadas e caracterizadas em humanos (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9 e MUC19) e dez mucinas transmembranares (MUC1, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 e MUC21). A MUC1, portanto, é uma glicoproteína

transmembranar fortemente O-glicosilada, na qual os carboidratos são responsáveis por mais da metade de sua massa, como demonstrado na Figura 1 (GENDLER, 2001; CORFIELD, 2015).

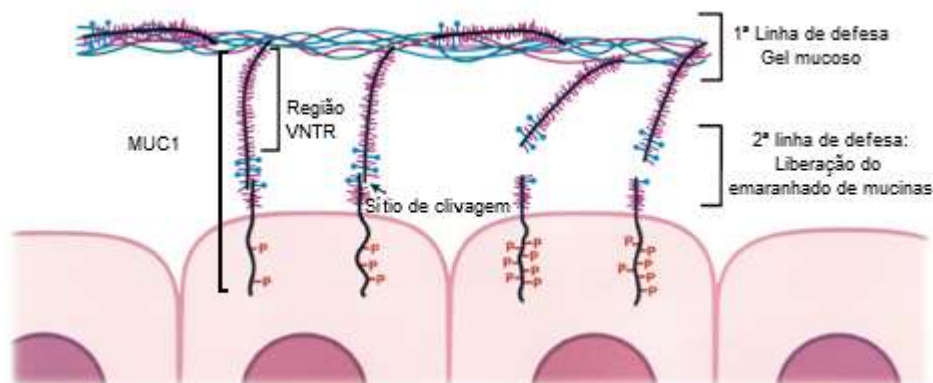


Figura 1 - Desenho representando a superfície celular da mucosa protegida por mucinas.

Fonte: Adaptado de Gendler, 2001.

Uma das características marcantes das mucinas de superfície celular, como a MUC1, é seu grande domínio extracelular, variando de 1000 a 2200 aminoácidos, com uma região de variável número de repetições em tandem (VNTR) de 20 aminoácidos, que carrega as cadeias de glicanos (GENDLER, 2001). Esta região pode variar em tamanho e composição, e é caracterizada pela presença marcante dos aminoácidos prolina (Pro), serina (Ser) e treonina (Thr). Os glicanos presentes na região VNTR são iniciados por uma N-acetilgalactosamina (GalNac), ligada de maneira O-glicosídica à hidroxila dos resíduos de Ser e Thr. Em nível molecular, a região VNTR da MUC1 é composta em grande parte pelas bases Guanina (G) e Citosina (C), e cada repetição é constituída por 60 pares de base (pb). Dependendo do número de repetições, a região VNTR pode representar 80% do tamanho total do gene. (BROCKHAUSEN; STANLEY, 2017).

Apesar de inicialmente atribuída somente à função de proteção epitelial, ligando-se a restos celulares, bactérias e vírus, a MUC1 demonstrou estar envolvida em inúmeros processos, como de interação célula-célula e célula-matriz, através do mecanismo de adesão e anti-adesão. Diversos estudos têm sido desenvolvidos na área de oncologia com base na expressão da MUC1 em tumores e sua participação no processo de metástase (GENDLER, 2001).

Igualmente, com animais de produção, diversos trabalhos com o gene *MUC1* vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos. Na espécie ovina, Rasero et al. (2007) estudaram a estrutura da região repetitiva e do polimorfismo. Resultados de associação entre o gene *MUC1* e características produtivas foram obtidos em estudos com búfalos, bovinos da raça Nelore e Holandês, e demonstraram existir a relação entre o polimorfismo deste gene e algumas destas características (DA ROSA et al., 2015; SANDO et al., 2009; SOUZA et al., 2011).

3 Capítulo 1 – Associações entre o gene *MUC1* e características produtivas e de sanidade da glândula mamária de vacas Jersey.

3.1 Introdução

A mastite consiste em uma resposta inflamatória à invasão da glândula mamária por microrganismos através do canal do teto, e pode se manifestar de maneira clínica ou subclínica. A forma clínica se caracteriza por sua visibilidade a olho nu, através da presença de grumos, sangue e pus no leite, podendo também estar associada a sintomas mais avançados como inchaço do úbere, febre e dor. A forma subclínica não pode ser diagnosticada a olho nu, mas pode ser detectada entre outras formas por meio da contagem de células somáticas (CCS) (DE VLIEGHER et al., 2012; BRITO et al., 2008; SANTOS, 2002).

Com ampla ocorrência em rebanhos leiteiros, a mastite é reconhecida como um dos maiores problemas da cadeia produtiva do leite, provocando perdas econômicas significativas, na casa dos bilhões de dólares anualmente em países como os Estados Unidos (HARMON, 1994). Em vista deste fato, a resistência à mastite é uma característica desejável em rebanhos leiteiros, porém, de difícil obtenção, uma vez que é dependente de componentes genéticos, fisiológicos e ambientais. Do ponto de vista genético, é possível que inúmeros genes candidatos estejam envolvidos com o estabelecimento dessa característica (RUPP; BOICHARD, 2003). Recentes estudos sugerem uma importante capacidade de diversos parâmetros imunológicos no combate e prevenção da mastite. Esses “protetores” podem vir a serem bons marcadores moleculares em estudos de determinação genética de susceptibilidade ou resistência à mastite (PLOEGAERT et al., 2010).

A mucina MUC1 é uma glicoproteína filamentosa transmembranar abundantemente expressa na superfície apical das células epiteliais secretoras em vários órgãos, incluindo a glândula mamária (HANISCH; MULLER, 2000). Na

superfície desses epitélios, a MUC1 está estrategicamente posicionada para formar uma barreira física entre as células epiteliais e seus ambientes externos com a função de proteger as células da infecção por microrganismos, de mediar mecanismos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular e, adicionalmente, monitorar o ambiente extracelular (GENDLER, 2001). A MUC1 bovina é bem caracterizada e mostra alguns traços comuns aos de outras espécies, dentre eles, a presença de um longo domínio extracelular onde se encontra a região com um VNTR (Número Variável de Repetições em Tandem) altamente glicosilado. O número variável de repetições da sequência de 20 aminoácidos origina alelos codominantes que podem formar proteínas com massas que variam de 87 a 283 kilodaltons (KDa) em humanos, ou de 120 a 220 KDa em bovinos (SANDO et al., 2009).

Assumindo a função protetiva da mucina MUC1 para a glândula mamária, e a participação efetiva da região extracelular altamente glicosilada com variável número de repetições (PATTON, 1999), é de interesse avaliar se a variação no tamanho desta região pode proporcionar mudanças significativas no tocante a características indicadoras de sanidade da glândula mamária e de qualidade do leite na raça Jersey, como sugerido por estudos prévios em outras espécies e raças de bovinos (SANDO et al., 2009; DA ROSA et al., 2015). Portanto, o presente estudo objetivou a identificação de polimorfismos alélicos do gene *MUC1* e suas associações com características de produtividade e qualidade do leite da raça Jersey utilizando medidas repetidas.

3.2 Metodologia

Foram utilizadas amostras de sangue de 135 vacas da raça Jersey criadas em quatro fazendas, localizadas no estado do Rio Grande do Sul, nos municípios de Pelotas (Fazenda 1 – 56 animais), Aceguá (Fazenda 2 – 46 animais), Capão do Leão (Fazenda 3 – 18 animais) e Santa Rosa (Fazenda 4 – 15 animais). As amostras de DNA foram extraídas do sangue com o auxílio do método salino (ZADWORNÝ; KUHNLEIN, 1990).

As amplificações e demais análises do DNA foram realizadas no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética na Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. As regiões intragênicas específicas do gene *MUC1* foram amplificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* desenhados a partir das sequências deste gene, proveniente do banco de dados do site do Centro Nacional

de Informação Biotecnológica (NCBI); *primer forward*: 5' – CGCAGAACTACGCCA GTTTC – 3' e *primer reverse*: 5' – AGAGCGGGTGGTCATGGA – 3'.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12,5µL, com uma incubação inicial de 95°C, por 15 minutos, seguidos de 37 ciclos, com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, utilizando como tampão SB 1x, como corante o *GelRed (Biotium)* e como marcador de peso molecular o *GeneRuler (ladder mix)*. A observação do gel foi realizada em transluminador de UV.

A estimativa do número de repetições Tandem em cada alelo foi realizada com a metodologia descrita por SOUZA et al. (2007), utilizando as seguintes fórmulas:

$$ETR = (NCR)(NR) - (L1036 \text{ pb}),$$

onde ETR é o tamanho (pb) da sequência não repetitiva, NCR o número de pb na sequência consenso, NR o número de repetições na sequência 1036 e L1036 pb o tamanho em pb do alelo 1036.

$$NTR(X) = \frac{FNS(X) - ETR}{60},$$

onde X é o alelo, NTR o número de repetições e FNS o tamanho do alelo.

As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre as quatro fazendas através do teste exato de Fisher, utilizando o módulo de diferenciação populacional, e o teste exato de Hardy-Weinberg do software GENEPOP, versão 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (ROUSSET, 2008). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

Para a realização das análises de associação, foram utilizados os dados do controle leiteiro mensal realizado nas fazendas. As características estudadas foram: produção de leite em quilos (PL), percentual de gordura (GORD), percentual de lactose (LAC), percentual de proteína (PROT) e contagem de células somáticas (CCS). Observações de animais com tempo máximo de lactação maior do que 12 meses e medidas discrepantes (outliers) foram excluídas. Além disso, a variável CCS foi transformada em escore de células somáticas (ECS) a partir da seguinte equação, adaptada de Wiggans & Shook (1987):

$$ECS = \log_2(CCS/100.000) + 7$$

onde: *ECS* é o escore de células somáticas (arredondado para o inteiro mais próximo) e *CCS* é a contagem de células somáticas por mL de leite. A descrição das informações utilizadas pode ser observada na tabela 1.

Tabela 1. Número de animais, número de observações, e estatísticas descritivas das características estudadas.

Características ¹	N ²	Obs ³	Média ± DP			Mediana	Mín	Máx
PL	106	937	16,2	±	5,5	15,5	4,00	46
GORD	103	790	4,55	±	1,19	4,44	2,00	10,67
LAC	88	671	4,44	±	0,2	4,46	2,88	5,01
PROT	103	789	3,67	±	0,4	3,70	2,7	5,51
ECS	105	828	8,87	±	2,38	9	1	14

¹PL: Produção de Leite (Kg); GORD: Gordura (%); LAC: Lactose (%); PROT: Proteína (%); ECS: Escore de células somáticas. ² Número de animais. ³ Número de observações, DP: Desvio padrão, Mín: Mínimo, Máx: Máximo.

Para a análise dos dados foram empregados modelos mistos considerando medidas repetidas. Foram testadas as seguintes estruturas de (co)variâncias entre as mensurações seguindo o critério de informação Bayesiano (BIC) (SCHWARZ, 1978): Simetria composta (SIMCOMP), autorregressiva de primeira ordem [AR(1)] e autorregressiva de primeira ordem e com média móvel [ARMA(1,1)].

Os procedimentos estatísticos para o ajuste dos modelos e obtenção das análises de associação entre os genótipos do gene *MUC1* e as características estudadas, seguindo a estrutura adequada de (co)variâncias entre as observações foram implementados no software R, e baseados na metodologia descrita por Souza et al, 2011 (R Core Team, 2014).

Os fatores incluídos nos modelos foram: data de nascimento, número do controle leiteiro, mês do controle leiteiro, estação do ano, ano, idade, classe de idade e genótipo. Exceto o genótipo, os demais fatores foram testados em sua significância, restando nos modelos definitivos, apenas os fatores estatisticamente significativos ao nível $p < 0,05$. Todos os genótipos foram incluídos na análise..

Um segundo conjunto de análises foi realizado com objetivo de avaliar o efeito da presença ou ausência dos diferentes alelos do *MUC1* em cada característica. A presença ou ausência do alelo foi considerada no lugar do genótipo. De maneira

semelhante, o número de cópias de cada alelo foi considerado, de modo a avaliar o seu efeito em cada característica.

Para as análises de associação os valores de P foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.3 Resultados e discussão

Alelos de três diferentes tamanhos foram identificados, sendo definidos como alelos 1, 2 e 3, e originaram cinco diferentes genótipos nas populações estudadas (Figura 2). O tamanho aproximado variou de 800 a 1.050 pb, nos alelos 1 e 3 respectivamente, com um alelo intermediário (2) de 950 pb. Este resultado vai ao encontro de demais estudos que relatam a presença de três variantes alélicas para o gene *MUC1*, como os resultados obtidos por Sando et al. (2009) em um estudo com a raça de bovinos leiteiros Holandês e Da Rosa et al. (2015) em estudo com búfalos. Porém a variação no número de alelos é ampla tanto da perspectiva interespecífica quanto nas diferentes raças de uma mesma espécie. Nas raças zebuínas Nelore e Brahman a genotipagem evidenciou a presença de cinco alelos para ambas nas populações estudadas por Souza et al. (2011) e Sando et al. (2009), respectivamente. Em cabras, o resultado obtido por Sacchi et al. (2004), em um estudo com seis diferentes raças, foi de sete a 12 variações alélicas.

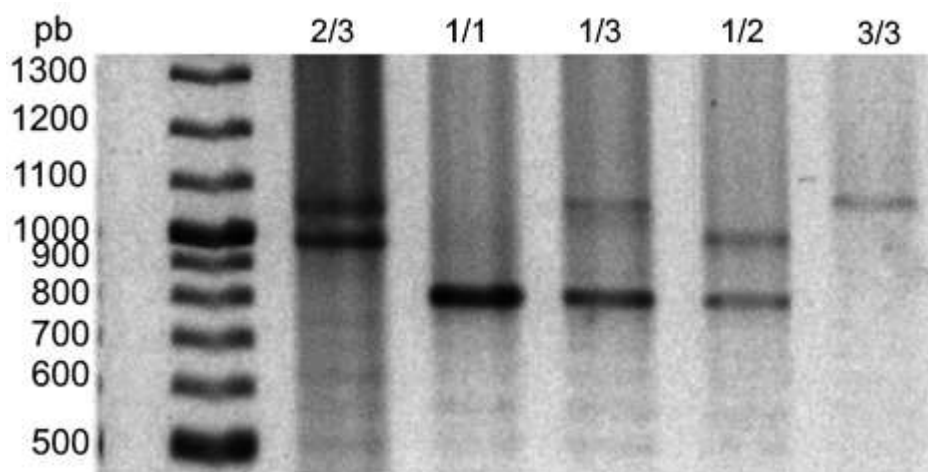


Figura 2. Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de cinco amostras de DNA de Jersey. Da esquerda para a direita: DNA ladder, genótipos 2/3, 1/1, 1/3, 1/2 e 3/3

O gene *MUC1* bovino é formado por sete éxons e seis íntrons e, nesse caso, a diferença entre os alelos é descrita pelo número variável de repetições em tandem de

60 nucleotídeos presente no exón 2 (RASERO et al., 2007). O número aproximado de repetições na região VNTR dos alelos do gene *MUC1* em bovinos da raça Jersey é demonstrado na tabela 3, a variação entre os alelos foi de 1,6 repetições do alelo 1 para o alelo 2 e 1,6 repetições do alelo 2 para o 3. O alelo 3 foi o mais frequente nas quatro fazendas estudadas, e o alelo 2 demonstrou ser de rara ocorrência (Tabela 2). O genótipo 3/3 teve a maior ocorrência em todas as fazendas, exceto na fazenda 4 onde sua presença foi igual ao genótipo 3/1, que por sua vez foi o segundo mais frequente nas demais fazendas. Corroborando a baixa frequência alélica do alelo 2, não foram encontrados animais homozigotos para o mesmo (Tabela 3).

São diversos os estudos que apresentam o número de repetições da região VNTR no gene *MUC1* em diferentes espécies, e é possível constatar a grande variação entre os resultados. Em bovinos, Sando et al. (2009) apontam a variação de sete a 23 repetições para 9 alelos de diferentes raças zebuínas e taurinas, com a predominância dos alelos que apresentavam 11, 14 e 16 repetições. Na raça Nelore, o número de repetições encontradas foi de 10, 12, 15, 18 e 24, sendo a maior frequência alélica atribuída aos 3 menores (SOUZA et al., 2007). Estes resultados sugerem que o número de repetições estimado para a raça Jersey no presente estudo seja relativamente menor que o reportado por outros autores em bovinos.

Tabela 2 – Número aproximado de repetições em tandem por alelo no gene *MUC1* em vacas da raça Jersey.

Alelos	Nº de repetições
1	6
2	9
3	10

O teste exato de Fisher demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) nas frequências alélicas e genotípicas e entre a fazenda 3 e as fazendas 1 e 4, não havendo diferença entre as demais. Este resultado possivelmente se atribua ao reduzido número de animais utilizados no estudo pertencentes às fazendas 3 e 4. As fazendas estudadas apresentaram-se em equilíbrio pelo teste de Hardy-Weinberg, o que pode ser interpretado como ausência de seleção para este gene, como reportado por Falconer (1960).

Tabela 3 - Frequências alélicas e genótípicas do gene *MUC1* de vacas Jersey em cada uma das fazendas estudadas e no total das amostras

	Alelos	Frequências alélicas	Genótipos	Frequências genótípicas
Fazenda 1	1	0,36	1/1	0,16
	2	0,02	1/2	0,02
	3	0,63	1/3	0,38
	-	-	2/3	0,02
	-	-	3/3	0,43
Fazenda 2	1	0,26	1/1	0,07
	2	0,03	1/3	0,39
	3	0,71	2/3	0,07
	-	-	3/3	0,48
Fazenda 3	1	0,14	1/3	0,28
	2	0,06	2/3	0,11
	3	0,81	3/3	0,61
Fazenda 4	1	0,40	1/1	0,20
	3	0,60	1/3	0,40
	-	-	3/3	0,40
Total	1	0,30	1/1	0,11
	2	0,03	2/1	0,01
	3	0,67	1/3	0,37
	-	-	2/3	0,04
	-	-	3/3	0,47

Na tabela 4 podem ser observados os valores do critério BIC (Bayesian Information Criterion) obtidos para as diferentes estruturas de (co)variância testadas. Observou-se que dentre os três modelos testados a estrutura autorregressiva de primeira ordem [AR(1)] foi a que apresentou menores valores, e portanto, melhor ajustou os modelos para todas as características estudadas.

Ao analisar o efeito dos diferentes genótipos as médias variaram de 17,93 kg a 20,16 kg, 3,83% a 4,74%, 4,33% a 4,48%, 3,61% a 3,69% e 7,35 unidades a 9,07 unidades para PL, GORD, LAC, PROT e ECS respectivamente (Tabela 5). No entanto o efeito do genótipo não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Testando a associação entre os alelos do *MUC1* e características similares às estudadas no presente trabalho (exceto a LAC), Sando et al. (2009) não encontraram associação entre genótipo, escore de células somáticas e produção leiteira, entretanto encontrou evidências que sugerem associação entre genótipo e porcentagem de proteína e gordura no leite. A associação entre a *MUC1* e a porcentagem de gordura pode estar relacionada ao papel da *MUC1* como componente da membrana do glóbulo de gordura do leite (MATHER, 2001).

Tabela 4. Valores do critério BIC (Bayesian Information Criterion) para os diferentes modelos testados.

Análise	Características ¹	Alelo	Estruturas ²		
			SIMCOMP	((AR(1))	ARMA (1,1)
PRESENÇA E AUSÊNCIA	PL	1	4786,07	4777,70	4784,07
		2	4783,40	4775,19	4781,50
		3	4785,93	4777,96	4784,32
	GORD	1	2570,49	2564,16	2570,10
		2	2568,94	2562,60	2568,48
		3	2570,07	2563,74	2569,65
	LAC	1	3,79	1,56	7,60
		2	2,32	0,15	6,15
		3	2,98	0,77	6,80
	PROT	1	913,11	900,89	907,54
		2	910,93	898,87	905,52
		3	912,22	900,05	906,70
	ECS	1	3751,12	3750,45	3755,07
		2	3749,63	3748,99	3753,68
		3	3748,83	3748,20	3752,93
EFEITO ADITIVO	PL	1	4791,92	4783,54	4789,90
		2	4783,40	4775,19	4781,50
		3	4792,49	4784,34	4790,71
	GORD	1	2579,11	2572,77	2578,76
		2	2568,94	2562,60	2568,48
		3	2579,74	2573,37	2579,31
	LAC	1	14,86	12,65	18,67
		2	2,32	0,15	6,15
		3	15,37	13,16	19,19
	PROT	1	924,17	911,99	918,64
		2	910,93	898,87	905,52
		3	923,93	911,73	918,38
	ECS	1	3756,83	3756,11	3760,68
		2	3749,63	3748,99	3753,68
		3	3755,79	3755,10	3759,70

¹PL: Produção de Leite (Kg); GORD: Gordura (%); LAC: Lactose (%); PROT: Proteína (%); ECS: Escore de células somáticas. ² SIMCOMP: Simetria composta; AR(1): autorregressiva de primeira ordem; ARMA(1,1) autorregressiva de primeira ordem e com média móvel.

Tabela 5. Efeito dos diferentes genótipos do gene *MUC1* sobre as médias de características de produção e sanidade em vacas Jersey.

Genótipo	Características ¹				
	Média ± erro padrão				
	PL	GORD	LAC	PROT	ECS
1/1	18,00 ± 0,83	4,74 ± 0,14	4,48 ± 0,04	3,65 ± 0,05	8,49 ± 0,35
1/2	20,16 ± 2,94	3,83 ± 0,59	4,33 ± 0,14	3,63 ± 0,22	7,35 ± 1,38
1/3	17,93 ± 0,48	4,63 ± 0,09	4,45 ± 0,02	3,67 ± 0,03	9,07 ± 0,21
2/3	19,85 ± 1,42	4,72 ± 0,26	4,42 ± 0,06	3,61 ± 0,10	9,01 ± 0,62
3/3	18,45 ± 0,44	4,71 ± 0,09	4,43 ± 0,02	3,69 ± 0,03	8,75 ± 0,19

¹PL: Produção de Leite (Kg); GORD: Gordura (%); LAC: Lactose (%); PROT: Proteína (%); ECS: Escore de células somáticas. A diferença entre as médias não foi significativa ao nível de 0,05% de significância.

O efeito da presença e ausência de cada um dos alelos encontrados na raça Jersey proporcionou pequena variação entre as médias e não foi significativo $p < 0,05$ (Tabela 6). Em um estudo conduzido com bubalinos com aptidão leiteira, Da Rosa et al. (2015) encontraram efeitos significativos entre a presença de dois dos alelos encontrados e características produtivas. O menor alelo apresentou as maiores médias para o escore de células somáticas, e a ausência do maior alelo apresentou as maiores médias para o teor de proteína do leite.

Tabela 6. Efeito da presença dos diferentes alelos do gene *MUC1* sobre as médias de características de produção e sanidade em vacas Jersey.

Característica	Alelo	Média ± erro padrão						p-valor
		Ausência			Presença			
PL	1	18,55	±	0,42	17,96	±	0,42	0,28
	2	18,17	±	0,32	19,94	±	1,25	0,16
	3	18,16	±	0,78	18,26	±	0,34	0,91
GORD	1	4,71	±	0,08	4,65	±	0,08	0,54
	2	4,68	±	0,07	4,58	±	0,24	0,68
	3	4,70	±	0,14	4,67	±	0,07	0,87
LAC	1	4,43	±	0,02	4,45	±	0,01	0,46
	2	4,44	±	0,01	4,41	±	0,06	0,52
	3	4,39	±	0,38	4,44	±	0,01	0,47
PROT	1	3,68	±	0,03	3,67	±	0,03	0,63
	2	3,68	±	0,02	3,61	±	0,09	0,49
	3	3,65	±	0,05	3,68	±	0,02	0,59
ECS	1	8,76	±	0,19	8,90	±	0,18	0,56
	2	8,84	±	0,14	8,70	±	0,57	0,82
	3	8,42	±	0,34	8,90	±	0,15	0,19

¹PL: Produção de Leite (Kg); GORD: Gordura (%); LAC: Lactose (%); PROT: Proteína (%); ECS: Escore de células somáticas. A diferença entre as médias não foi significativa ao nível de 0,05% de significância.

O efeito aditivo dos alelos não se mostrou significativo para nenhuma das características (Tabela 7). Estudando o efeito aditivo dos alelos do gene *MUC1* em linhagens de Nelore, Souza et al. (2011), encontrou diferenças significativas para as medidas de peso ao nascer e peso aos 550 dias, onde uma cópia de um dos alelos apresentou médias menores e duas cópias de outro alelo médias maiores, respectivamente.

Tabela 7. Efeito aditivo dos diferentes alelos do gene *MUC1* sobre as médias de características de produção e sanidade em vacas Jersey.

Característica ¹		Média ± erro padrão								
		0 cópia			1 cópia			2 cópias		
PL	1	18,55	±	0,42	17,95	±	0,47	17,99	±	0,82
	2	18,17	±	0,32	19,94	±	1,25	-	±	-
	3	18,16	±	0,80	18,07	±	0,46	18,44	±	0,43
GORD	1	4,71	±	0,08	4,62	±	0,09	4,74	±	0,14
	2	4,68	±	0,07	4,58	±	0,24	-	±	-
	3	4,70	±	0,14	4,64	±	0,09	4,71		0,09
LAC	1	4,43	±	0,02	4,44	±	0,02	4,48	±	0,04
	2	4,44	±	0,01	4,41	±	0,06	-	±	-
	3	4,47	±	0,04	4,44	±	0,02	4,43	±	0,02
PROT	1	3,68	±	0,03	3,67	±	0,03	3,65	±	0,05
	2	3,68	±	0,02	3,61	±	0,09	-	±	-
	3	3,65	±	0,05	3,67	±	0,03	3,69	±	0,03
ECS	1	8,77	±	0,19	9,03	±	0,21	8,50	±	0,35
	2	8,84	±	0,14	8,70	±	0,57	-	±	-
	3	8,43	±	0,34	9,07	±	0,20	8,76	±	0,19

¹PL: Produção de Leite (Kg); GORD: Gordura (%); LAC: Lactose (%); PROT: Proteína (%); ECS: Escore de células somáticas. A diferença entre as médias não foi significativa ao nível de 0,05% de significância.

Em estudo com camundongos modificados geneticamente para não expressarem o gene *MUC1*, DeSouza et al. (2000) verificaram que esses animais apresentaram infecções crônicas e inflamação no trato reprodutivo quando mantidos em ambientes não estéreis, em comparação com animais expressando a *MUC1* humana. Nesse sentido, a barreira que a mucina promove nas mucosas pode ser importante também na fisiologia da glândula mamária. No entanto, no presente estudo não foi possível verificar influência do tamanho da região VNTR do gene *MUC1* da raça Jersey sobre o ECS.

3.4 Conclusões

Foram encontrados 3 alelos na raça Jersey, e os resultados demonstraram uma alta frequência do alelo 3 e do genótipo 1/3 nas fazendas estudadas. Não foram encontradas associações entre as variantes alélicas e as características estudadas em nenhuma das análises realizadas. Contudo, estudos mais minuciosos com maior número de animais e condições experimentais menos sujeitas a erro podem ser necessários para a obtenção de resultados mais acurados.

4 Capítulo 2 – O gene *MUC1* é pouco variável em bovinos da raça Gir: Short communication

4.1 Introdução

O gene *MUC1* codifica para uma glicoproteína transmembranar altamente glicosilada presente em pontos de encontro entre mucosas e o ambiente externo, com função principal de lubrificar e proteger a superfície celular através de uma barreira física (PATTON, 1999). Uma das características marcantes do gene *MUC1* é sua região VNTR, que compõe grande parte de sua região codificadora, na qual ocorrem variadas repetições de 60 pb. Essa porção do gene é responsável por codificar a região extracelular da molécula de mucina *MUC1* que pode variar de 1000 a 2200 aminoácidos, através de repetições de 20 aminoácidos compostas predominantemente por prolina (Pro), serina (Ser) e treonina (Thr). A esses aminoácidos ligam-se os glicanos, de maneira O-glicosídica, para compor mais da metade da massa da mucina (BROCKHAUSEN; STANLEY, 2017, GENDLER, 2001). A sequência do gene *MUC1* é bem conhecida, e foco de diversos estudos em bovinos. Com exceção à região VNTR, todas as outras regiões são relatadas como sendo bem conservadas em diferentes espécies (PALLESEN et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi de analisar os polimorfismos do gene *MUC1* na raça Gir, bem como determinar suas sequências, de maneira a possibilitar estudos de associação entre os diferentes genótipos e características de interesse, como as relacionadas a produção leiteira e sanidade da glândula mamária.

4.2 Metodologia

Foram utilizadas 48 amostras de DNA de vacas Gir, 14 de uma fazenda localizada em Caxias de Sul – RS (Fazenda 1), e 34 provenientes do APTA - Instituto

de Zootecnia de São Paulo, Nova Odessa - SP (Fazenda 2). O DNA foi obtido a partir de amostras de sangue, através de extração pelo método salino (ZADWORNÝ; KUHNLEIN, 1990).

As amplificações do DNA extraído e suas análises foram realizadas no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética na Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. A região intragênica específicas do gene *MUC1* foram amplificadas pela técnica de PCR, utilizando primers desenhados a partir das sequências deste gene, proveniente do banco de dados do site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI); primer forward: 5' – CGCAGAACTACGCCA GTTTC – 3' e primer reverse: 5' – AGAGCGGGTGGTCATGGA – 3'.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12,5µL, com uma incubação inicial de 95°C, por 15 minutos, seguidos de 37 ciclos, com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72°C, sendo finalizadas com extensão a 72°C por 10 minutos.

A checagem da amplificação foi realizada em gel de agarose 2%, utilizando como tampão TBE 0,5x, como corante o GelRed (Biotium) e como marcador de peso molecular o GeneRuler (ladder mix). A observação do gel foi realizada em transluminador de UV.

Com objetivo de caracterizar os alelos, cinco produtos de PCR foram sequenciados pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977; MacroGen, Korea). O software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/>) foi utilizado para comparar a homologia entre a sequência obtida e outras sequências do GenBank. O número de repetições em Tandem da sequência foi estimado pelo software Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/cgi-bin/trf/trf.300.pl>; BENSON, 1999).

O número de repetições das amostras não sequenciadas foi estimado utilizando as seguintes fórmulas:

$$DR = \frac{TA(C) - TA(x)}{60}$$

Onde: DR é a diferença em repetições entre os alelos, TA(C) é o tamanho em pb do alelo C e TA(x) é o tamanho em pb de um alelo x.

$$NR(x) = NR(C) - DR$$

Onde NR(x) é o número de repetições de um alelo x e NR(C) é o número de repetições do alelo C.

4.3 Resultados e Discussão

Foi possível a identificação de três alelos e quatro genótipos nas populações estudadas, um alelo com aproximadamente 1000 pb (alelo A), um segundo com 1050 pb (alelo B), e o último com 1266 pb (alelo C) (Figura 3).

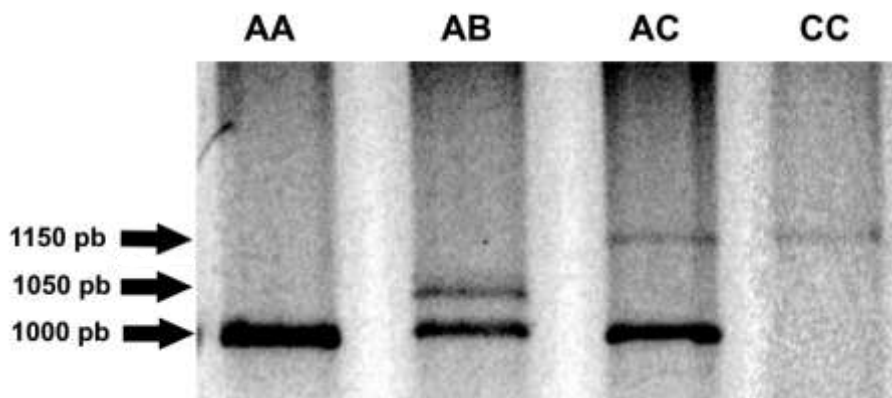


Figura 3. Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de 4 amostras de DNA de animais Gir. Da esquerda para a direita: genótipos AA, AB, AC e CC

O sequenciamento pelo método de Sanger demonstrou-se satisfatório apenas no maior alelo (C). As falhas de sequenciamento podem ser atribuídas às limitações do método quanto a sua capacidade de sequenciar fragmentos grandes de DNA (KIRCHER; KELSO, 2010). Rasero et al. (2002) relataram insucesso no sequenciamento da região repetitiva do gene *MUC1* em um alelo de aproximadamente 1600 pb, devido à impossibilidade de obter duas sequências sobrepostas a partir dos dois primers.

A sequência obtida apresentou um total de 1266 pb e foram estimadas 17 repetições pelo software Tandem Repeats Finder, cada uma delas apresentando 60 pb na sequência consenso, com 87% de combinação entre as repetições sequenciadas. O percentual de indel foi de 3% entre as repetições, podendo-se destacar a troca de A por G no sexto nucleotídeo da região repetitiva em 13 das 17 repetições (Figura 4). Na região VNTR da sequência obtida foi possível encontrar 10 locais onde os nucleotídeos divergiram da sequência consenso de *Bos taurus taurus*, e um local no qual divergiu da sequência encontrada em *Bos taurus indicus* por Souza et al. (2007). A homologia da sequência foi de 95% com a sequência submetida ao NCBI (GenBank: EU629154.1) por Sando et al. (2009) referente ao genoma da

espécie *Bos taurus indicus*. Esses resultados sugerem que a sequência consenso para a região repetitiva diverge entre as espécies de bovinos.



Figura 4 – Sequência de nucleotídeos das repetições do gene *MUC1*. Em preto a sequência consenso em *Bos taurus taurus*, em vermelho sequência e mutações em *Bos taurus indicus*, em cinza sequência e mutações no presente estudo. Os nucleotídeos sublinhados indicam diferença entre as sequências. *Pontos onde ocorreram diferenças entre os nucleotídeos do presente trabalho e da sequência consenso.

O alelo A demonstrou predominância nas populações estudadas da raça Gir, compondo 88% do total de alelos encontrados. Os alelos B e C apresentaram menor ocorrência. Um total de 77% dos animais foram identificados como homozigotos para o alelo A, ao passo que apenas 2% dos animais apresentaram homozigose do alelo C, e nenhum apresentou o genótipo homozigoto com o alelo B. O genótipo heterozigoto AC foi o de segunda maior ocorrência, aparecendo em 15% dos animais. É possível observar uma maior ocorrência dos alelos B e C na fazenda 1 quando comparado à fazenda 2, na qual a predominância do alelo A foi quase total (Tabela 8). A baixa variabilidade alélica do gene *MUC1* também é reportada no estudo conduzido por Souza et al. (2011) na raça Nelore, onde observaram 82% de frequência de um dos cinco alelos encontrados. Esse resultado pode sugerir que essa é uma característica inerente a animais zebuínos.

Tabela 8 - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene *MUC1* de bovinos da raça Gir nas fazendas analisadas.

da raça Sh. Nas fazendas analisadas:					
Total		Fazenda 1		Fazenda 2	
Frequência					
Alélica	Genotípica	Alélica	Genotípica	Alélica	Genotípica
A 0,88	AA 0,77	A 0,71	AA 0,43	A 0,94	AA 0,91
B 0,03	AB 0,06	B 0,07	AB 0,14	B 0,01	AB 0,03
C 0,09	AC 0,15	C 0,21	AC 0,43	C 0,04	AC 0,03
	CC 0,02		CC -		CC 0,03

É conhecida e matéria de diversos estudos a endogamia e consequente baixa variabilidade genética da raça Gir no Brasil. Isto pode dever-se ao reduzido número de animais importados que foram responsáveis pela expansão da raça no país, bem como o rápido crescimento da raça em um curto período de tempo, fato que induziu ao intenso uso como reprodutores de poucos animais melhoradores (SANTANA et al.

2014). Em estudo envolvendo a identificação de genes relacionados a características produtivas na raça Gir através de ilhas de homozigose, Peripolli et al. (2018) relataram regiões de corridas de ilha de homozigose em cinco cromossomos, envolvendo 282 genes, os quais podem estar sofrendo efeito de seleção. Todavia, nenhuma ilha de homozigose foi encontrada no cromossomo 3, e consequentemente, na região cromossômica do gene *MUC1*.

O número estimado de repetições em tandem foi de 13 e 14 para os alelos A e B, respectivamente, como demonstrado na tabela 9. A diferença entre o maior e o menor alelo foi de quatro repetições. O número de repetições reportado por Rasero et al. (2002) para os alelos com 958 pb e 1078 pb foi de 13 e 15, respectivamente. Esses valores se assemelham aos encontrados para os alelos do presente estudo, com 1000 pb e 1060 pb e 13 e 14 repetições respectivamente. Por outro lado, pode ser observada discrepância no número de repetições estimado por Souza et al. (2007), onde ao alelo medindo 1036 pb foram atribuídas 10 repetições (Tabela 9).

Tabela 9 – Número aproximado de repetições em tandem por alelo no gene *MUC1*.

Gir ¹		Souza et al. 2007		Rasero et al. 2002	
TA	NR	TA	NR	TA	NR
1000	13	1036	10	778	10
1060	14	1175	12	958	13
1266	17	1323	15	1078	15
		1526	18	1600	24
		1894	24		

¹presente estudo; TA: Tamanho do alelo (pb); NR: Número de repetições em tandem.

4.4 Conclusões

Conclui-se que, apesar da observação de 3 alelos do gene *MUC1* na raça Gir, há baixa variabilidade alélica, sendo o alelo A predominante nas populações. A sequência encontrada para o gene *MUC1* da raça Gir assemelhasse quase totalmente à sequência da espécie *Bos indicus*. Contudo, os resultados indicaram uma baixa variabilidade deste gene, dificultando o uso do mesmo em estudos de associação.

5 Considerações finais

A busca por marcadores moleculares que possibilitem a seleção de animais com maior resistência ou menor susceptibilidade à mastite tem sido um tema recorrente nos últimos anos. A mucina *MUC1* exerce um papel notório no tocante à sanidade da glândula mamária, haja vista a gama de funções protetivas a ela atribuídas. Entretanto, a influência do número de repetições da região VNTR sobre as características estudadas ainda não pode ser totalmente desvendada.

As frequências alélicas encontradas na raça Jersey dão suporte a futuros estudos de associação entre o gene *MUC1* e características de interesse, porém, podem ser necessárias técnicas mais sensíveis para a detecção de diferenças significativas. Na raça Gir, estudos de associação podem ser dificultosos, uma vez que há predominância de um dos alelos encontrados. Contudo, o presente estudo pode servir de suporte para estudos posteriores a serem desenvolvidos com o gene *MUC1* nas raças Jersey e Gir.

Referências bibliográficas

ABCZ., ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU. 2017
(<http://www.abcz.org.br>)

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G. D.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastite em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acid Research**. v. 27, n. 2, p. 573-580. 1999.

BRIGGS, H. M. **Modern Breeds of Livestock**. 4 ed. Macmillan Publishing Co. 1980

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Controle da mastite: como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. **Embrapa Gado de Leite** (Documentos). 2008.

BROCKHAUSEN I.; STANLEY P. O-GalNAc Glycans. In: VARKI Ajit; CUMMINGS Richard D; ESKO Jeffrey D. **Essentials of Glycobiology**. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press;.2017. C. 10.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; DE MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; DA COSTA, E. O.; NEVES, R. B. S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.

CANTSILIERES, S. **Genotyping methods and protocols**. Hertfordshire: Humana Press, 2017. Cap.1, p. 1-16

CDCB - COUNCIL ON DAIRY CATTLE BREEDING. State and national standardized lactation averages by breed for cows calving in 2014. Disponível em: <<https://queries.uscdcb.com/publish/dhi/dhi16/laall.shtml>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

CDCB - COUNCIL ON DAIRY CATTLE BREEDING. Characteristics of test-day milk yield and somatic cell count from Dairy Herd Improvement herds by state during 2015. Disponível em: <<https://queries.uscdcb.com/publish/dhi/dhi16/sccrpt.htm>>. Acesso em: 05 nov.2017.

CHRISTIE, W. W.; FOX, P. F. Developments in Dairy Chemistry 2. Lipids. 1983.

CORFIELD, Anthony P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 1, p. 236-252, 2015.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

DADI, H.; KIM, J. J.; YOON, D.; KIM, K. S. Evaluation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyped by the Illumina Bovine SNP50K in cattle focusing on Hanwoo breed. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 28-32, 2012.

DANTAS, TVM; DE OLIVEIRA, A. A. Mastite bovina: considerações e impactos econômicos. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.

DA ROSA, F., MOREIRA, C., MORTATI, M., BORQUIS, R., BOLIGON, A., TONHATI, H., MOREIRA, H., SOUZA, F. MUC1 gene polymorphism in Murrah water buffaloes and its association with milk production traits. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 801-802, 2015.

DEKKER, J.; ROSSEN, J. W.; BÜLLER, H. A.; EINERHAND, A. W. The MUC family: an obituary. **Trends in biochemical sciences**, v. 27, n. 3, p. 126-131, 2002.

DESOUZA, M. M.; SURVEYOR, G. A.; PRICE, R. E.; JULIAN, J.; KARDON, R.; ZHOU, X.; GENDLER, S.; HILKENS, J.; CARSON, D. D. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. **Journal of reproductive immunology**, v. 45, n. 2, p. 127-158, 2000.

DE VliegHER, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, S. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.

EL-SAIED, U. M.; CARRIEDO, J. A.; PRIMITIVO, F. S. Heritability of test day somatic cell counts and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 2956-2961, 1998.

FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics Ronald Press, New York. 1960.

FAGAN, E. P.; CABREIRA JOBIM, C.; JUNIOR, M. C.; SIMILI DA SILVA, M.; DOS SANTOS, G. T. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas leiteiras do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 3, 2010

GAUR, G. K.; KAUSHIK, S. N.; GARG, R. C. The Gir cattle breed of India-characteristics and present status. **Animal Genetic Resources Information**, v. 33, p. 21-29, 2003.

GENDLER, S. J. MUC1, the renaissance molecule. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, p. 339-353, 2001.

GOTTSCHALK, Alfred. **The chemistry and biology of sialic acids and related substances**. Cambridge University Press: Cambridge, 1960.

HANISCH, F-G; MÜLLER, S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. **Glycobiology**, v. 10, n. 5, p. 439-449, 2000.

HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts¹. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HENAO-VELÁSQUEZ, Andrés F.; MÚNERA-BEDOYA, O. D.; HERRERA, A. C.; AGUDELO-TRUJILLO, J. H.; CERÓN-MUÑOZ, M. F. Lactose and milk urea nitrogen: fluctuations during lactation in Holstein cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 9, p. 479-484, 2014

KIRCHER, M. KELSO, J. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. **Bioessays**, 32: 524–536. 2010.

LINN, J. G. Factors affecting the composition of milk from dairy cows. **Designing Foods–Animal Product Options in the Marketplace**, p. 224-241, 1988.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, 2000. capítulo 5, p.179-231.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Milk Salts: Technological Significance. In: FOX, P. F; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. New York: Springer, 3.ed.. 351-389, 2009.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MADOUASSE, A.; HUXLEY, J. H.; BROWNE, W. J.; BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Somatic cell count patterns in a large sample of UK dairy herds. In: LAM, T. J. G. M. **Proceedings of international conference Mastitis control: From science to practice**. The Hague, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 2008. p. 219

MATHER, I. H.; JACK, L. J. W.; MADARA, P. J.; JOHNSON, V. G. The distribution of MUC1, an apical membrane glycoprotein, in mammary epithelial cells at the resolution of the electron microscope: implications for the mechanism of milk secretion. **Cell and tissue research**, v. 304, n. 1, p. 91-101, 2001.

PALLENSSEN L.T.; ANDERSEN M.H.; NIELSEN R.L.; BERGLUND L.; PETERSEN T.E.; RASMUSSEN L.K.; RASMUSSEN J.T; Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. **Journal of Dairy Science**, v.12, p. 2591–2598. 2001.

PATTON, S. Practical implications of the milk mucins. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 6, p. 1115-1117. 1999.

PATTON, S. MUC1 e MUC-X, Epithelial mucins of breast and milk. In: **Bioactive Components of Human Milk**. New York, USA: Plenum Publishers. 2001. p. 35

PAULSON, J.; SALFER, J.; NEWELL, S.; SANTI, E.; SEYKORA, T. **Learning About Dairy**. 1 ed. Minnesota: University of Minnesota. 2015. 94 p.

PEREIRA, A. R.; PRADA e SILVA, L. F.; MOLON, L. K.; MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 121-124, 1999.

PERIPOLLI, E.; STAFUZZA, N.; MUNARI, D. P.; LIMA, A. L. F.; IRGANG, R.; MACHADO, A. M.; PANETTO, J.; VENTURA, R. V.; BALDI, F.; SILVA, M. Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *BMC Genomics*, v. 19, n. 1, p. 34, 2018.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary microbiology*, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, 2009.

PLOEGAERT, T. C.; TIJHAAR, E. J.; PARMENTIER, H. K.; VAN DER POEL, J. J.; VAN ARENDONK, J. A. M.; SAVELKOUL, H. F. J. Parameters for natural resistance in bovine milk. *Mastitis control*, p. 103, 2010.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RAPACCI, M. **Tecnologia de leite**. Apostila digitada. Curitiba: PUCPR/Departamento de Engenharia de Alimentos, 2000.

RAMALHO, M.; DOS SANTOS, J. B.; PINTO, C. B.; DE SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; DE SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. 5 ed. Minas Gerais: UFLA, 566 p. 2012.

RAMEL, C. Mini-and microsatellites. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, n. Suppl 4, p. 781, 1997.

RASERO, R.; SACCHI, P.; ROSATI, S.; CAUVIN, E.; MAIONE, S.; Molecular analysis of the length polymorphic *MUC1* gene in cattle. *Journal of animal breeding and genetics*, v.119, n. 5, p. 342-349, 2002.

RASERO, R.; BIANCHI, L.; CAUVIN, E.; MAIONE, S.; SARTORE, S.; SOGLIA, D.; SACCHI, P. Analysis of the sheep *MUC1* gene: structure of the repetitive region and polymorphism. *Journal of dairy science*, v. 90, n. 2, p. 1024-1028, 2007.

RICHARD, G. F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 4, p. 686-727, 2008.

ROMAN, R. M.; WILCOX, C. J.; MARTIN, F. G. Estimates of repeatability and heritability of productive and reproductive traits in a herd of Jersey cattle. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 1, p. 113-119, 2000.

ROUSSET, F., Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, v.8: 103-106. 2008.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary research*, v. 34, n. 5, p. 671-688, 2003.

SACCHI, P.; CAROLI, A.; CAUVIN, E.; MAIONE, S.; SARTORE, S.; SOGLIA, D.; RASERO, R. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 9, p. 3017-3021, 2004.

SANDO, L.; PEARSON, R.; GRAY, C.; PARKER, P.; HAWKEN, R.; THOMSON, P. C. Bovine MUC1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5276-5291, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTANA JR., M. L.; PEREIRA, R. J.; BIGNARDI, A. B.; EL FARO, L.; TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L. G. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. **Livestock Science**, v. 163, p. 26-33, 2014.

SANTOS, M. V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e derivados lácteos. **2º Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, Ribeirão Preto**, Anais, p.179-188, 2002.

SANTOS, M. V. O uso da CCS em diferentes países IN: **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006, p. 181-197.

SANTOS, R. dos. **Os cruzamentos na pecuária tropical**. 2ed. Uberaba, Agropecuária Tropical, 1999. 672 p.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 8, n. 6, p. 552, 1923.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. **Simpósio Internacional sobre qualidade do leite**, v. 2, p. 21-26, 2000.

SCHWARZ, G. Estimating the dimensional of a model. **Annals of Statistics**, Hayward, v. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.

SHOOK, G.E. Selection for diseases resistance. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 1349- 1362, 1989.

SHOOK, G. E.; SCHUTZ, M. M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 648-658, 1994.

SOUZA, F. R. P.; DENTILLO, D. B.; MEOLA, J.; BIASE, F. H.; ANDRÉA, M. V.; VOZZI, P. A.; MARTELLI, L. R. The polymorphism in MUC1 gene in Nelore cattle. **Journal of animal breeding and genetics**, v. 124, n. 1, p. 42-46, 2007.

SOUZA, F. R. P.; VOZZI, P. A.; VILA, R. A.; BOLIGON, A. A.; GALERANI, M. A. V.; LÔBO, R. B.; MARTELLI, L. R. Association between MUC1 gene polymorphism and

expected progeny differences in Nelore cattle (*Bos primigenius indicus*). **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 1, p. 68-70, 2011.

SJSA – STATES OF JERSEY STATES ASSEMBLY. Review into the proposed importation of bovine semen. **Corporate Services Scrutiny Panel**, p. 68, 2008.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Fluid Milk - Cow Numbers: Summary For Selected Countries. Disponível em <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Fluid+Milk++Cow+Numbers%3a+Summary+For+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2543&hidReportRetrievalTemplateID=7>> Acesso em: 15 jun. 2016.

WIGGANS, G. R.; SHOOK, G. E. A Lactation Measure of Somatic Cell Count. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2666-2672, 1987.

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 36(8), p. 807-844, 1996.

YOUATT, W.; MARTIN. W. C. L. **Cattle: Breeds, management and diseases**. 1 ed. New York: C. M. Saxton, Agricultural Book Publisher, 1853. 469 p.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 631-634, 1990.