

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO
ÚNICO (SNPs) NO GENE CODIFICADOR DO *TOLL-LIKE
RECEPTOR 4 (TLR4)* E CONTAGEM CELULAR SOMÁTICA**

Adriano Queiroz de Mesquita
Orientador: Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA
2010



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Adriano Queiroz de Mesquita** E-mail: **adriano@cpa.vet.ufg.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregaticio do autor: Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

País: **Brasil** UF: **GO** CNPJ: Sigla:

Título: ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) NO GENE CODIFICADOR DO TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) E CONTAGEM CELULAR SOMÁTICA Palavras-chave: **Genotipagem, Qualidade do leite, TLR4, PAMPs**

Título em outra língua: **Association between Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) gene and somatic cell count**

Palavras-chave em outra língua: **Genotyping, Milk quality, TLR4, PAMPs**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de alimentos** Data de defesa: (dd/mm/aaaa) **30/07/2010**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Orientador(a): **Profª. Drª. Cíntia Silva Minafra e Rezende** E-mail: **cintia@cpa.vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Profª. Drª. Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho** E-mail: **diasfilho@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 1 de setembro de 2010

Adriano Q. de Mesquita
Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ADRIANO QUEIROZ DE MESQUITA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO
ÚNICO (SNPs) NO GENE CODIFICADOR DO *TOLL-LIKE
RECEPTOR 4 (TLR4)* E CONTAGEM CELULAR SOMÁTICA**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende – EV/UFG

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade – EV/UFG

Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho – EV/UFG

GOIÂNIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

M582a Mesquita, Adriano Queiroz de.
Associação entre Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) no gene codificador do Toll-like receptor 4 (TLR4) e contagem celular somática [manuscrito] / Adriano Queiroz de Mesquita. - 2010.
72 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Silva Minafra e Rezende;
Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Maria Auxiliadora Andrade;
Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2010.

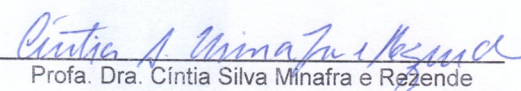
Bibliografia.

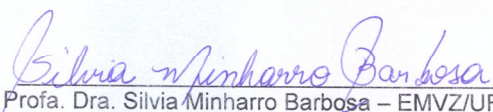
1. Mastite 2. Genotipagem. 5. Leite – qualidade. I.
Título.

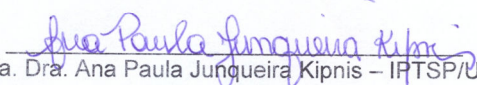
CDU: 636.2:618.19-002

ADRIANO QUEIROZ DE MESQUITA

Dissertação defendida e aprovada em **30/07/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende
(ORIENTADOR (A))


Profa. Dra. Sílvia Minharro Barbosa – EMVZ/UFT


Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis – IPTSP/UFG

A toda minha família, em especial ao meu pai e eterno professor: Albenones José de Mesquita, e minha mãe: Sandra Queiroz Porto de Mesquita, que dedicaram suas vidas a amar e orientar os filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos dons da vida, da paciência e da perseverança e por todas as oportunidades que Ele sempre proporcionou;

A toda minha família e minha namorada pelo apoio, paciência e amor dedicado;

A Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, em especial ao Centro de Pesquisa em Alimentos, pela disposição de infra-estrutura e todo apoio técnico-científico;

À minha amiga e orientadora, Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende, por sua paciência, dedicação e, acima de tudo, confiança durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Eurione A. G da Veiga Jardim, Rolando Mazzoni e Rodrigo Balduino pela convivência diária, apoio, discussões e considerações;

À Prof^a. Dr^a. Iolanda A. Nunes, que concedeu meu primeiro estágio na área de biologia molecular e sempre dedicou seu trabalho à produção científica;

Ao amigo e coordenador do Centro de Pesquisa em Alimentos Prof. Antonio Nonato de Oliveira;

A todos os amigos e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos: Gisely Prado, Nadielly Xavier, Thatyana Lacerda, Wesdras Martins dos Santos, Ariane Rolins de Santana, Bruno Moura Passos, Fernanda Luz, Rogério Zacarias, Marcus Vinícius Lobo Guerra (Galego), Ana Cristina e Thiago Souza. Muito Obrigado!

A todos os meus amigos e companheiros do Programa de Pós-graduação, em especial a Marília Cristina Sola, que dedicou grande parte de seu tempo para ajudar no desenvolvimento deste estudo.

A todos os funcionários e estagiários do CPA, que de alguma forma me ajudaram muito.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 MASTITE	4
2.2 MECANISMOS DE DEFESA INATOS OU INESPECÍFICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA	7
2.3 TLR4 E O RECONHECIMENTO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS....	14
2.4 SISTEMA TAQMAN DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA POR PCR EM TEMPO REAL	19
2.5 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Caracterização da propriedade e do mês de colheita das amostras	24
4.2. Colheita de amostras	26
4.2.1 Leite individual de vacas	26
4.2.2 Sangue	27
4.3 Princípios analíticos	27
4.3.1 Contagem Celular Somática em amostras de leite	27
4.3.2 Composição centesimal em amostras de leite	28
4.3.3 Técnica de PCR em Tempo Real para identificação dos principais agentes causadores de mastite	28
4.3.4 Técnica de Genotipagem de SNPs	30
4.4 Tratamentos estatísticos	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Quantificação relativa dos principais microrganismos causadores de mastite	34
5.2 Genótipos identificados para diferentes SNPs em animais da raça holandesa em Goiás.....	37
5.3 Associação entre genótipos identificados e escore de células somáticas para cada SNPs em animais da raça holandesa.....	40

5.4 Associação entre os genótipos combinados e escore de células somáticas em animais da raça holandesa	41
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fatores anatômicos da glândula mamária que atuam como barreiras físicas na defesa à mastite	8
FIGURA 2 – Reação de oxidação de tiocianato catalizada pela enzima LPO	11
FIGURA 3 – Representação da segunda linha de defesa da glândula mamária .	12
FIGURA 4 – Fatores solúveis associados à resposta imune em resposta à mastite	13
FIGURA 5 – Mecanismo de sinalização do <i>TLR4</i> em função do reconhecimento de LPS	17
FIGURA 6 – Representação esquemática do gene <i>TLR4</i>	18
FIGURA 7 – Esquema de representação da PCR em Tempo Real com sonda TaqMan®	20
FIGURA 8 – Mecanismo de discriminação alélica utilizando sondas TaqMan® ...	21
FIGURA 9 – Balanço hidroclimático médio anual.....	24
FIGURA 10 – Condições climáticas do mês de abril. A) Porcentagem de perda da produção leiteira; B) Temperatura mínima média mensal; C) Temperatura máxima média mensal; D) Umidade relativa do ar média.....	25
FIGURA 11 – Cama do sistema de criação “ <i>free-stall</i> ” com tamanho inadequado e acúmulo de fezes e sujidades.	36
FIGURA 12 – Representação das curvas de amplificação de animais homozigotos GG para o SNP 2.	37
FIGURA 13 – Discriminação alélica em amostras de sangue analisadas para o SNP 2 do gene <i>TLR4</i>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Frequência de ocorrência de microrganismos identificados em amostras de leite cru individual de vacas holandesas (n=12) e percentual relativo total de acordo com a coloração pelo método de Gram, Goiânia-GO, 2010.....	34
TABELA 2 – Frequências alélicas e genóticas para diferentes SNPs e teste X^2 para determinar o equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	39
TABELA 3 – Média de escore de células somática para diferentes genótipos em vacas holandesas Goiás, Brasil (n=72).....	40
TABELA 4 – Efeito da combinação de genótipos no SCS de vacas holandesas de uma propriedade do Estado de Goiás, ao teste de Duncan (n=69)	41
TABELA 5 – Efeito da combinação de genótipos no SCS de vacas de uma propriedade do Estado de Goiás, ao teste de Scott & Knott (n=69).....	42
TABELA 6 – Estimativas médias de herdabilidade e variâncias fenotípica, ambiental e genotípica para os genótipos identificados de vacas de uma propriedade do Estado de Goiás.....	42

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Citocinas e fatores solúveis no leite que atuam na resposta imune inata da glândula mamária	13
QUADRO 2 – Condições de amplificação para as reações de multiplex PCR em tempo real do <i>kit Pathoproof</i> [®]	29
QUADRO 3 – SNPs selecionados para discriminação alélica.....	31
QUADRO 4 – <i>Primers</i> e sondas utilizadas para genotipagem. As bases marcadas indicam os alelos para genotipagem	32
QUADRO 5 – Condições de amplificação para cada reação	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCS – Contagem celular somática
- PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos
- PRR – Receptores de reconhecimento padrão
- TLR – *Toll-like receptor*
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- IN 51 – Instrução Normativa de nº 51
- NK – *Natural killer*
- Ig – Imunoglobulina
- MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
- LPO – Lactoperoxidase
- SCN⁻ – Tiocianato
- OSCN⁻ – Hipotiocianato
- HOSCN – Ácido hipotiociânico
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
- IL – Interleucina
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular
- VCAM-1 – Molécula de adesão vascular
- LPS – Lipopolissacarídeo
- PGN – Peptidoglicano
- LTA – Ácido lipoteicóico
- LRR – Sequências ricas em leucina
- Hsp60 – Proteínas de choque térmico de peso molecular 60
- NF- κ B – Fator nuclear κ B
- MyD88 – Fator 88 de diferenciação mielóide
- TIRAP – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
- TRAM – Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
- SARM – Proteína contendo SAM e ARM
- IRAK-4 – Quinase associada ao receptor de Interleucina 4
- IRAK-1 – Quinase associada ao receptor de Interleucina 1
- TRAF6 – Fator de necrose tumoral associado ao fator 6
- TAK1 – Quinase ativada por TGF- β

TAB1 – Proteína 1 ligadora da Quinase ativada por TGF- β

TAB2 – Proteína 2 ligadora da Quinase ativada por TGF- β

IKK – Quinase kappa B

JNK – Quinase c-jun n-terminal

TRIF – Domínio TIR contendo adaptador do indutor de interferon β

TBK1 – Quinase ligadora de TANK 1

RIP 1 – Proteína quinase de interação com receptor 1

IRF3 – Fator de Regulação 3 de Interferon

5'UTR – Região 5' não traduzida

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RBQL – Rede brasileira de qualidade do leite

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico

Ct – *Cycle threshold*

FRET – Transferência de energia de ressonância por fluorescência

SCS – Escore de células somáticas

RESUMO

A mastite tem sido considerada, mundialmente, a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, devido à elevada prevalência e aos prejuízos econômicos que determina. As desordens decorrentes da mastite por agente etiológico de origem bacteriana são complexas, dependentes do microrganismo envolvido, e desencadeiam inúmeros processos de reconhecimento. As estruturas moleculares dos microrganismos são conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) e os receptores nas células do hospedeiro como receptores de reconhecimento de padrões (PRR). O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único no gene codificador do *TLR4* em vacas leiteiras da raça holandesa em uma propriedade leiteira em Goiás, avaliando a relação dos alelos identificados, com a ocorrência de mastite subclínica e contagem celular somática. Foram coletadas 150 amostras de leite individual de vacas para identificação de microrganismos, contagem celular somática e composição centesimal, e 150 amostras de sangue para genotipagem em uma propriedade rural do Estado de Goiás. A discriminação alélica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real, baseada em 4 SNPs de referência no gene codificador do *TLR4* depositados no NCBI (rs8193046, rs8193047, rs8193060 e rs29017188). Os resultados obtidos revelam maior frequência de microrganismos Gram negativos na propriedade de estudo (52,47%) e que, animais identificados com os genótipos AACCCC, GGTCGG e GACCGC são os mais indicados para seleção assistida por marcadores moleculares.

Palavras-chave: Genotipagem, Qualidade do leite, *TLR4*, PAMPS.

ABSTRACT

Mastitis has been considered, worldwide, the disease of greatest impact in dairy herds because of the high prevalence and the economic losses that determines. The disorders caused by mastitis causative agent of bacterial origin are complex, depending on the microorganism involved, and trigger numerous processes of recognition. The molecular structures of microorganisms are known as Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) and the receptors on host cells as pattern recognition receptors (PRR). This study was developed with the aim of identifying the presence of single nucleotide polymorphisms in TLR4 in Holstein dairy cows on a dairy farm in Goiás, evaluating the relationship between identified alleles, occurrence of subclinical mastitis and somatic cell count. 150 milk samples from individual cows were collected for identification of microorganisms, somatic cell count and composition, and 150 blood samples for genotyping on a farm in the State of Goiás. The allelic discrimination was performed by Real-time PCR, based on four reference SNPs in TLR4 gene from NCBI (rs8193046, rs8193047, rs8193060 and rs29017188). The results showed higher frequency of Gram negative microorganisms (52.47%) and that animals with the genotypes AACCCC, GGTCGG GACCGC are best suited for marker-assisted selection.

Key-words: Genotyping, Milk quality, *TLR4*, PAMPs.

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil tem refletido alteração do paradigma de propriedades rurais para empresas rurais, na última década. Certamente são os primeiros frutos da busca por investimento nos rebanhos; da participação enfática dos órgãos governamentais fiscalizadores; da interação entre produtores, cooperativas, agroindústrias, universidades e institutos de pesquisa e, não menos importante, dos preceitos da produção de alimentos de origem animal inócuos, capaz de atender aos anseios da população e exigências para comercialização.

No ano de 2009, o Brasil ocupou o sexto lugar entre os países com maior produção de leite fluido, totalizando 28.795 mil litros, com uma expectativa de produção para o ano de 2010 de 30.235 mil litros (USDA, 2009). Em termos reais, isto significa aumento de aproximadamente 25% nos últimos cinco anos, demonstrando a evolução do sistema de produção de leite nacional.

Em consonância com esta realidade, o estado de Goiás ocupou em 2009 o terceiro lugar na produção nacional de leite cru refrigerado ou não, adquirido por estabelecimentos beneficiadores, com 2.415.025 mil litros, reforçando a evolução goiana frente à expectativa nacional (IBGE, 2009).

Apesar deste cenário, é importante considerar que existem obstáculos para a excelência produtiva do leite, aos quais se enumeram o manejo inadequado dos animais, as doenças que acometem o rebanho comprometendo a produção em qualidade e quantidade, o manejo de ordenha inadequado, a nutrição e a genética.

Quanto ao perfil sanitário dos animais, a inflamação da glândula mamária ou mastite pode ser considerada a doença de maior impacto produtivo e econômico aos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Sua ocorrência relaciona-se a duas formas, clínica e subclínica, sendo a última a mais comum e apresentando correlação positiva com a contagem celular somática (CCS). Este tipo de células epiteliais e leucócitos constituem um dos parâmetros para determinação da sanidade da glândula mamária e, por consequência, da qualidade do leite cru.

As mastites bovinas podem ser causadas por diversos fatores, como trauma mecânico ou agentes infecciosos. Em sua maioria, são de caráter

infeccioso, sendo as bactérias classificadas como agentes etiológicos mais comuns e frequentes desencadeando processos inflamatórios intensos, com respostas imunológicas específicas e inespecíficas.

O sistema imunológico é dinâmico, proativo e reativo, o que significa dizer que sua ação consiste em manter as condições normais do organismo e também responder a situações ameaçadoras à homeostasia. As desordens decorrentes da mastite, por agente etiológico de origem bacteriana, são complexas, dependentes do microrganismo envolvido e desencadeiam inúmeros processos de reconhecimento.

Quanto aos microrganismos, em sua superfície celular há estruturas moleculares denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e, nas células do hospedeiro, receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Alguns desses são denominados *Toll-like receptors* (TLR) apresentando particularidades, como o *TLR4*, capaz de reconhecer o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (endotoxina) e de outros microrganismos Gram negativos.

Estudos genômicos sugerem que polimorfismos genéticos dos PRR podem ou não levar à expressão de proteínas diferentes em uma sequência de DNA e, conseqüentemente, o desenvolvimento ou não de mastite. O gene que codifica o *TLR4* é polimórfico em bovinos e sua expressão está associada à seleção assistida por marcadores moleculares com a finalidade de verificar a resistência à mastite em gado leiteiro. Pelo exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único no gene codificador do *TLR4* em vacas leiteiras da raça holandesa em uma propriedade leiteira em Goiás, avaliando a relação dos alelos identificados, com a ocorrência de mastite subclínica e contagem celular somática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A melhoria da qualidade do leite é tema de relevância para o agronegócio brasileiro exercendo forte e estreita relação entre os segmentos, produtivo, beneficiamento e industrialização e, por consequência, as esferas de comercialização interna e externa. Assim sendo, há que considerar como ponto de partida a qualidade da matéria prima e de seus derivados, especialmente estes, como alimentos destinados a uma população heterogênea e reconhecidamente subordinada a questões atinentes à saúde pública.

Sob o ponto de vista governamental e como parte do Programa Nacional para a Melhoria da Qualidade do Leite, no ano de 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em 18 de setembro, a Instrução Normativa 51 (IN 51), regulamentando a produção, identidade, qualidade, coleta e transporte dos leites tipos A, B, Pasteurizado e Cru refrigerado. Esta IN determina que a partir de 01 de julho de 2008 até 01 de julho de 2011, os estabelecimentos localizados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, devem apresentar uma contagem celular somática máxima de $7,5 \times 10^5$ cs/mL no leite cru do tanque de refrigeração por expansão direta, comunitário, ou da propriedade rural (BRASIL, 2002).

Deste modo, produtores e indústrias necessitam atentar para a sanidade da glândula mamária do rebanho para fortalecerem-se com o pagamento pela qualidade do leite e rendimento industrial, respectivamente. Por outro lado, os consumidores são os maiores beneficiados em função da melhoria da qualidade microbiológica e nutritiva do alimento colocado à sua disposição no mercado varejista. Não restam dúvidas que dentre os entraves à melhoria da qualidade do leite, os perigos microbiológicos e químicos e consequentemente a potencialização do risco, desempenham papel importante devido a presença de contaminantes indesejáveis à saúde do consumidor e o descumprimento dos requisitos fixados pela legislação nacional (BRASIL, 2002) e exigências internacionais quanto à segurança dos alimentos (FAO & WHO, 2009).

Considerando esta matriz alimentar, estes perigos podem estar associados à inflamação da glândula mamária. ZHAO & LACASSE (2007) em sua revisão sobre as causas e controle de mastites bovinas, descreveram que tais

processos inflamatórios podem ser deflagrados por fatores como infecção por agentes bacterianos, traumas mecânicos ou agressão química.

2.1 MASTITE

A mastite tem sido considerada, mundialmente, a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, devido à elevada prevalência e aos prejuízos econômicos que determina (HALASA et al., 2007).

KOSSAIBATI & ESSLEMONT (2000) ressaltou a dificuldade de estimar as perdas associadas com mastite clínica, que surgem a partir dos custos de tratamento, descarte, morte e diminuição da produção de leite. Naquele ano, o autor estimou o custo médio de um caso de mastite clínica em £175 (cento e setenta e cinco libras esterlinas), o equivalente a aproximadamente R\$ 470,00. Assumindo uma ocorrência média de 40 casos para cada 100 vacas por ano e um tamanho do rebanho de 2,4 milhões vacas leiteiras, no reino unido, a mastite clínica custa às indústrias de produtos lácteos um adicional de £ 168.000.000 anualmente, o correspondente a R\$ 451.920.000.

BRADLEY (2002) salientou que é mais difícil ainda quantificar as perdas associadas à mastite subclínica, decorrentes do tratamento dos animais, diminuição da produção de leite, alterações nos seus constituintes e aumento do risco de descarte. PHILPOTT (1984) demonstrou uma relação linear inversa entre a contagem de células somáticas (CCS) acima 200.000 cs/mL e produtividade, evidenciando que há uma redução de 2,5% no rendimento para cada aumento de 100.000 cs/mL.

Em paralelo a mastite exerce um efeito extremamente negativo sobre a produtividade da indústria de laticínios devido ao comprometimento da qualidade do leite (SCHUKKEN et al., 1992; HARDING, 1995; BRAMLEY et al., 1996) e seu rendimento industrial. Caracteriza-se por determinar queda na produção e alterações na composição do leite, sendo que mais de 140 tipos de microrganismos podem causá-la, entre os quais, as bactérias, micoplasmas, leveduras, algas, fungos e, em raras ocasiões, vírus (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Segundo estes autores, a mastite é o resultado de diferentes fatores, que incluem: resistência natural de cada indivíduo; higiene do ambiente condicionando

a concentração de microrganismos aos quais os animais estão expostos; o estresse ao qual a vaca está submetida; as diferentes cepas e espécies de microrganismos com suas diferentes virulências; as estratégias de manejo, incluindo alimentação e funcionamento do equipamento de ordenha; procedimentos de ordenha com ênfase na questão da higiene e conscientização dos funcionários.

AMARAL (1999) relacionou outros fatores, que independem da atuação do homem e interferem no aparecimento da mastite bovina. Dentre os relacionados ao ambiente, citou o clima (temperatura, chuvas e o binômio temperatura *versus* umidade), os aspectos socioeconômicos do ambiente, necessidade de produção e pagamento do leite pela CCS e, finalmente, o manejo inadequado de pastagens levando a lesões nos tetos dos animais. Com relação aos fatores ligados ao hospedeiro, citou a idade do animal, conformação do úbere, tamanho e diâmetro do teto, formato do teto, facilidade de ordenha, raça, alimentação e higidez. Já em relação aos agentes etiológicos, mencionou a infectividade, patogenicidade, viabilidade e poder imunogênico.

Epidemiologicamente, a mastite bovina divide-se em contagiosa e ambiental. Os patógenos causadores da mastite contagiosa se disseminam de quartos infectados para quartos não infectados, sendo o leite de quartos infectados a principal fonte de microrganismos. SANTOS & FONSECA (2007) classificaram as bactérias causadoras de mastite contagiosa em dois grandes grupos: patógenos principais e patógenos secundários. Dentre os patógenos principais destacam-se, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus aureus*, sendo este, um microrganismo Gram positivo, geralmente encontrado colonizando o canal do teto, o interior da glândula mamária ou a pele do teto, especialmente quando essa se encontra lesada. Entre os secundários, o *Corynebacterium bovis* pode ser apontado.

A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, com manifestação aguda e maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato. Os patógenos encontram-se no ambiente e contaminam o úbere no intervalo entre ordenhas, quando os tetos ficam expostos à lama, fezes e sujidades das camas (HOE & SORIANO, 2006). Existem dois grandes grupos de bactérias causadoras de mastite ambiental que possuem

características próprias: coliformes e estreptococos ambientais (SANTOS & FONSECA, 2007). O grupo dos coliformes é formado por bactérias Gram negativas que incluem: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.* O grupo dos estreptococos é formado principalmente por *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. MARGATHO et al. (1998), descreveram que os microrganismos mais frequentes para este tipo de mastite são as bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Proteus sp.* Segundo SANTOS & FONSECA (2007) em decorrência da disseminação destes microrganismos por todo o ambiente, seria impossível erradicar a mastite ambiental, ao contrário da contagiosa, passível de erradicação.

A ocorrência de mastite pode afetar a qualidade microbiológica dos atributos desejáveis para a matéria prima, elevando a contagem padrão em placas de microrganismos (GERMANO & GERMANO, 1995). Ainda, algumas bactérias causadoras de mastite tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podem produzir toxinas termoresistentes, o que representa um perigo à saúde humana (BRAMLEY et al., 1996), seja tanto pelo perigo microbiológico quanto perigo químico.

De acordo com a manifestação da infecção, as mastites ainda são classificadas como clínica ou subclínica, sendo a última, a forma mais prevalente e causadora da maioria das perdas econômicas, que podem variar de 5 a 25% da produção leiteira (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

ANDRADE et al (1998) determinaram a prevalência e etiologia da mastite subclínica no Estado de Goiás. Neste estudo, os autores observaram uma prevalência de 19 a 90% de mastite subclínica nas propriedades estudadas, sendo que os microrganismos mais frequentes foram *Staphylococcus sp.* (41,8%), *Corynebacterium spp.* (14,9%), *Streptococcus spp.* (13,3%) e *Enterobacter, Klebsiella e E. coli* (10,1%).

2.2 MECANISMOS DE DEFESA INATOS OU INESPECÍFICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O tecido da glândula mamária é protegido por dois mecanismos de defesa do sistema imune: a imunidade inata ou inespecífica, relacionada ao tema de estudo do presente trabalho, e a adquirida ou específica. Os sistemas imunes, inato e adquirido, interagem em uma tentativa de fornecer proteção contra microrganismos causadores de mastite (BURVENICH et al., 2003; RIVAS et al., 2002)

A resposta imune inata é caracterizada pela rápida ativação dos mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro que são capazes de responder a uma ampla variedade de patógenos (SUFFREDINI et al., 1999). Predomina nos estágios iniciais da infecção e é constituída pela barreira física do esfíncter do teto, macrófagos, neutrófilos, células NK (*natural killer*) e fatores solúveis inespecíficos (SANTOS & FONSECA, 2007).

2.2.1 Mecanismos anatômicos de resistência

A mastite ocorre quando microrganismos ganham o interior da glândula mamária por meio do canal do teto. Por esta razão, o esfíncter é considerado a primeira linha de defesa contra agentes invasores. O mesmo contém músculos que mantêm o canal fechado entre as ordenhas. Seu interior possui uma camada de queratina, que atua como barreira física na oclusão do orifício dificultando a interiorização de microrganismos (Figura 1). O aumento da elasticidade destes músculos e a remoção da camada de queratina estão diretamente relacionados ao aumento dos casos de mastite (SORDILLO et al., 1997).

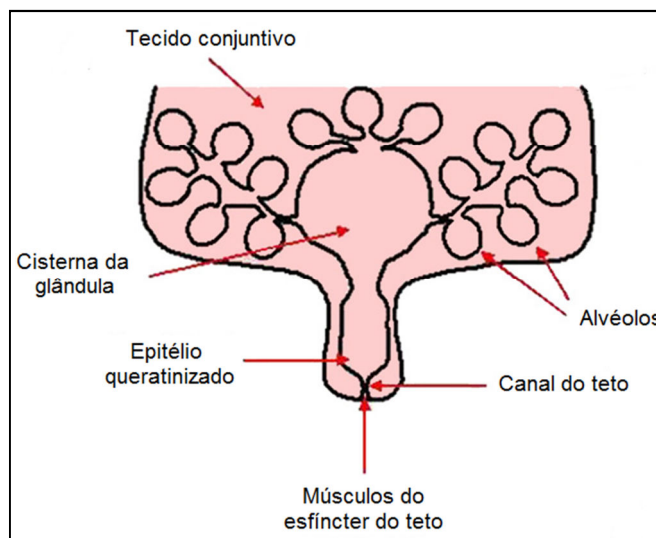


FIGURA 1 – Fatores anatômicos da glândula mamária que atuam como barreiras físicas na defesa à mastite

Fonte: OVIEDO-BOYSO et al. (2007), adaptado

A queratina encontrada no canal do teto contém agentes bacteriostáticos como ácidos graxos esterificados e não esterificados (ácido mirístico, ácido palmitoléico, e ácido linoléico) e agentes bactericidas, como as proteínas catiônicas. Estas podem ligar eletrostaticamente aos microrganismos invasores, alterando sua parede celular e tornando-os mais suscetíveis à pressão osmótica. Este mecanismo pode levar à incapacidade de agentes invasores em manter a osmolaridade causando lise da parede celular bacteriana e, conseqüentemente, morte celular. Estas estruturas primárias permitem a captura de agentes invasores, impedindo a sua migração para o interior da cisterna da glândula (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Um dos principais fatores que afetam a ocorrência de mastite é a exposição da extremidade do teto a agentes patogênicos. A máquina de ordenha em funcionamento inadequado pode causar lesões na extremidade do teto, as quais podem ser colonizadas por bactérias patogênicas e resultar em novas infecções. Sendo assim, o funcionamento do equipamento de ordenha desempenha um papel decisivo, pois é o único elemento com ação direta sobre a extremidade do teto, por meio do nível de vácuo, da taxa de pulsação e do tempo de ordenha (SANTOS & FONSECA, 2007).

2.2.2 Substâncias antimicrobianas solúveis no leite

Tanto os fatores solúveis no leite ligados à resposta imune específica quanto inata, representam uma importante linha de defesa da glândula mamária que pode obter respostas eficazes quanto à invasão de agentes patogênicos.

Lactoferrina

A lactoferrina é uma proteína da classe da transferrina secretada principalmente por leucócitos polimorfonucleares e células epiteliais da glândula mamária, com capacidade de transportar e se ligar a íons ferro não-heme. Está presente em uma ampla variedade de fluidos biológicos, como na saliva, bile, secreções mucosas e no leite de mamíferos (PAWLIK et al., 2009, LEGRAND et al., 2008). No leite humano, está presente em concentração que varia de 1 a 5 mg de lactoferrina / mL, enquanto que no leite bovino, sua concentração atinge no máximo 0,1 mg/mL (TENG, 2002; MOLENAAR et al., 1996).

Há um grande número de funções biológicas associadas à lactoferrina. Entre elas, uma atenção especial está voltada para suas atividades antibacteriana e antiviral, e suas propriedades anticancerígenas e imunomodulatórias (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009).

A multifuncionalidade da lactoferrina está relacionada com a sua capacidade de interagir com diversos alvos. Possui atividade quelante de ferro, sendo que sequestra o íon livre, controlando o crescimento de bactérias patogênicas, e limitando a produção de espécies de oxigênio reativo que poderiam danificar componentes celulares (PAESANO et al. 2009; LEGRAND et al. 2006;). Além disso, vários estudos revelaram que alguns dos efeitos fisiológicos da lactoferrina são mediados por sua interação com estruturas celulares de agentes infecciosos como o lipopolissacarídeo (ELASS-ROCHARD et al. 1995), peptidoglicanos (LEGRAND et al., 1997) e receptores celulares específicos (SUZUKI et al. 2005).

Sistema Complemento

O sistema complemento de bovinos está presente no soro e no leite, e tem um papel importante nos mecanismos de defesa da glândula mamária contra agentes causadores de mastite. As proteínas do complemento são predominantemente produzidas por hepatócitos, embora também sejam produzidas por alguns monócitos e macrófagos em tecidos diferentes. São necessárias para o recrutamento dos neutrófilos à glândula mamária e atuam diretamente na opsonização e eliminação de microrganismos invasores (OVIÉDO-BOYSO et al., 2007).

O sistema complemento é fundamental para a imunidade inata, pois está intimamente envolvido no processo de inflamação. O revestimento de microrganismos invasores por partículas com fragmentos dos componentes C3 e C4 os torna propensos à ingestão pelas células fagocíticas que possuem receptores para essas opsoninas. A regulação da resposta inflamatória pelos componentes C3a e C5a induz a liberação de histamina dos mastócitos e basófilos, a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de fagócitos para locais de inflamação (DAMEREAU, 1987).

Lisozima

A lisozima, também chamada muramidase, é uma enzima lisossômica presente no leite de diversas espécies, que lisa certas bactérias por hidrólise das ligações glicosídicas β 1-4, entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico e N-Acetil-D-glucosamina de mucopolissacarídeos presentes na parede de células bacterianas (FOX & KELLY, 2006). No leite de bovinos, possui uma estrutura ligeiramente maior que em outras espécies, com 154 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 18.000 (EITENMILLER et al., 1976). Por estar presente em pequenas concentrações no leite de ruminantes, acredita-se que ofereça pouca proteção à glândula mamária (SANTOS & FONSECA, 2007).

Sistema lactoperoxidase

A lactoperoxidase (LPO) é a enzima mais abundante que está naturalmente presente no leite, e representa aproximadamente 1% das proteínas do soro (REITER, 1985). Possui a característica de oxidar moléculas na presença de H_2O_2 gerando compostos antimicrobianos. Seus efeitos antimicrobianos também exigem a presença de tiocianato (SCN^-), ou um halogênio como segundo substrato para formar o sistema lactoperoxidase (Figura 2). O iodeto é o íon halogênio mais potencialmente oxidável de todos, enquanto os cloretos exigem um oxidante mais poderoso (DE WIT & VAN HOOYDONK, 1996). No sistema lactoperoxidase, a enzima catalisa a oxidação do SCN^- para formar hipotiocianato ($OSCN^-$) e ácido hipotiocianico ($HOSCN$). Estes compostos reagem com grupos sulfidrílicos de agentes microbianos para inibir várias funções celulares (SHIN & LO'NNERDAL, 2001).

A concentração de LPO necessária para ativar o sistema é de apenas 1-2 mg /L, muito menos do que os níveis normalmente presentes no leite bovino (cerca de 30 mg / L). Como a atividade do sistema lactoperoxidase não depende da presença da enzima, o efeito antimicrobiano depende então, das concentrações de SCN^- , que têm origem da dieta, e H_2O_2 , que tem origem no metabolismo celular e ocorrem naturalmente em níveis sub-ótimos (SANTOS & FONSECA, 2007; REITER & HARNULV, 1984).

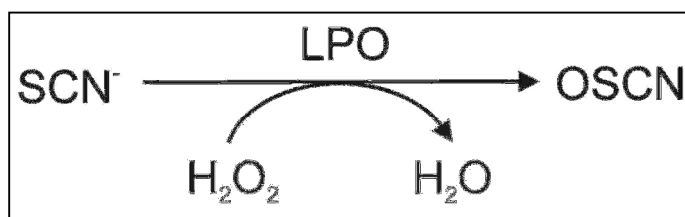


FIGURA 2 – Reação de oxidação de tiocianato catalisada pela enzima LPO

Fonte: DE WIT & VAN HOOYDONK, 1996

2.2.3 Fatores celulares de defesa da glândula mamária

Quando microrganismos invasores penetram o esfíncter do teto e ganham o canal, a segunda linha de defesa do sistema imune consiste em células de defesa como neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Estas regulam tanto a resposta imune inata quanto adquirida (SORDILLO & STREICHER, 2002).

Macrófagos presentes no tecido epitelial ou no leite iniciam a resposta inflamatória reconhecendo os patógenos invasores, secretando citocinas pró-inflamatórias imunomoduladoras como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) e IL-1- β (Interleucina 1 β) que induzem o recrutamento de neutrófilos para o interior da glândula mamária, e estimulando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a reação inflamatória local (Figura 3) (BOULANGER & BUREAU, 2003; STEIN et al., 2003; ZHANG & ISSEKUTZ, 2002).

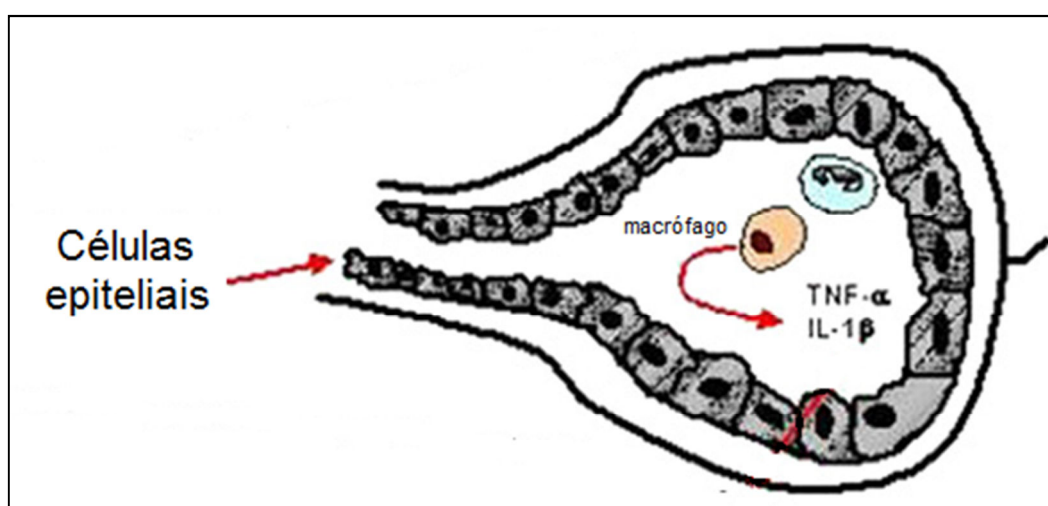


FIGURA 3 – Representação da segunda linha de defesa da glândula mamária

Fonte: OVIEDO-BOYSO et al. (2007), adaptado

A atividade das células do sistema imune na fisiopatologia da mastite bovina é regulada por citocinas pró-inflamatórias (Quadro 1) que aumentam a capacidade bactericida de macrófagos e neutrófilos, promovem o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, induzem a maturação das células dendríticas e controlam a resposta imune adquirida (Figura 4). As células endoteliais dos vasos sanguíneos adjacentes a alvéolos expressam moléculas de adesão em resposta a citocinas pró-inflamatórias, o que, por sua vez, facilita o recrutamento

de neutrófilos da corrente sanguínea para o local da infecção, a fim de eliminar as bactérias invasoras (ALLUWAIMI & CULLOR, 2002).

QUADRO 1 – Citocinas e fatores solúveis no leite que atuam na resposta imune inata da glândula mamária

Fator	Função biológica
IL-1 β	Recrutamento de neutrófilos ao interior da glândula mamária
IL-2	Induz diferenciação de linfócitos B, ativa células NK e linfócitos CD8 ⁺
IL-6	Regula a fase aguda de síntese proteica e favorece o fluxo de monócitos para o interior da glândula mamária
IL-8	Quimiocina importante no recrutamento de neutrófilos para o interior da glândula mamária
IL-12	Regula a diferenciação de linfócitos T
IFN- γ	Ativa linfócitos T, induz a produção de IL-12 e auxilia a ativação de neutrófilos
TNF- α	Induz a expressão de moléculas de adesina às células endoteliais
Sistema complemento	Bacteriolítico / Facilita fagocitose
Lisozima	Cliva ligações de carbono e lisa a parede celular de bactérias
Lactoferrina	Sequestra o ferro para impedir a absorção de microrganismos invasores, cliva a parede celular bacteriana e regula a atividade dos leucócitos na glândula mamária.

Fonte: OVIEDO-BOYSO et al (2007); SORDILLO & STREICHER (2002)

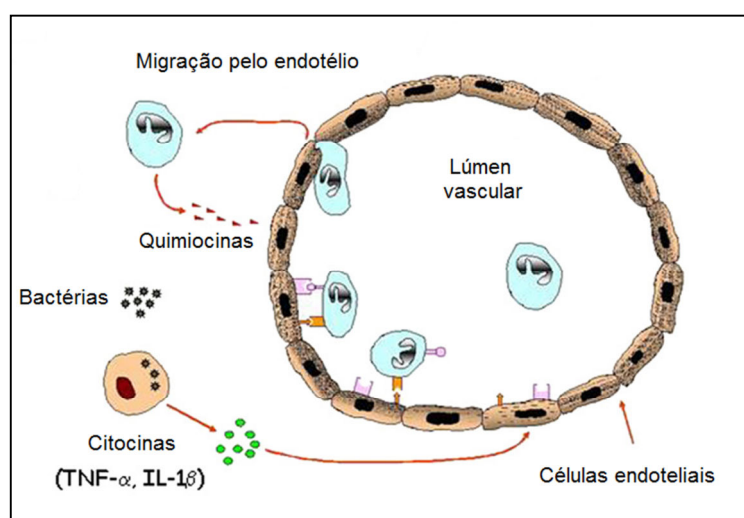


FIGURA 4 – Fatores solúveis associados à resposta imune em resposta à mastite

Fonte: OVIEDO-BOYSO et al. (2007), adaptado

Citocinas pró-inflamatória, quimiocinas secretadas por macrófagos e células epiteliais, por sua vez, ativam a expressão de moléculas de adesão celular (E-selectina), adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) por células endoteliais. Estas moléculas facilitam a ligação de neutrófilos ao endotélio vascular e estimulam sua migração através da matriz epitelial e subepitelial levando-os ao local de infecção e para o leite. No entanto, para o recrutamento de neutrófilos, é essencial a participação de moléculas quimioatrativas como componentes do sistema complemento (C3a e C5a), citocinas (IL-8, IL-12) e até mesmo LPS (lipopolissacarídeos) (STRINDHALL et al., 2005). O aumento da CCS ($> 2 \times 10^5$ células / ml de leite) observado durante a mastite tem a sua origem nesta migração transendotelial e demonstra a importância das células endoteliais na fisiopatologia da mastite (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Os neutrófilos recrutados para o local de infecção por bactérias realizam fagocitose, produzem espécies reativas de oxigênio, peptídeos antibacterianos de baixo peso molecular e defensinas, que eliminam grande parte dos patógenos causadores de mastite (PAAPE et al., 2003). Se o microrganismo invasor sobreviver, a infiltração de neutrófilos é substituída após um curto período com linfócitos T, B e monócitos. No entanto, os neutrófilos continuam sendo as células mais abundantes encontradas em mastites crônicas (RAINARD & RIOLLET, 2003).

2.3 TOLL-LIKE RECEPTOR 4 E O RECONHECIMENTO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

O reconhecimento dos patógenos e o início da resposta imune inata induzida depende do reconhecimento dos microrganismos pelas células do hospedeiro. Tanto os macrófagos quanto as células epiteliais apresentam receptores que distinguem grupos de microrganismos através de receptores para estruturas moleculares conservadas evolutivamente. As estruturas moleculares dos microrganismos são conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e os receptores nas células do hospedeiro são os receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Este grupo de moléculas é necessário

para a sobrevivência e classificação de determinada espécie, por exemplo: lipopolissacarídeo (LPS), bactérias Gram negativas; e ácido lipoteicóico (LTA), bactérias Gram positivas. Os PRRs induzem a transcrição e secreção de citocinas e quimiocinas que realizam o primeiro recrutamento de neutrófilos e monócitos do sangue para o sítio de infecção, na segunda linha de defesa do sistema imune. (SHARMA et al., 2006; BANNERMAN et al., 2004; HAN et al., 2003).

Alguns desses receptores de reconhecimento, os *Toll-like receptors* (*TLR*), foram descritos pela primeira vez em 1988 em *Drosophila melanogaster*, e formam junto aos receptores de Interleucina-1 uma superfamília de receptores evolutivamente conservados, conhecida como “superfamília receptor de interleucina-1”. Estes reconhecem uma grande variedade de PAMPs e, portanto, desempenham um papel central no início da resposta inflamatória e subsequente resposta imune adaptativa a patógenos (JANN, et al., 2009; SABROE et al., 2003; TAKEDA et al, 2003).

Um ano após o descobrimento dos *TLR*, uma proteína homóloga foi identificada em mamíferos (MEDZHITOV et al., 1997). Atualmente, pelo menos 13 membros da família *TLR* já foram identificados em mamíferos, e genes que codificam dez destes receptores foram recentemente mapeados para o genoma bovino (MCGUIRE et al., 2006).

A porção citoplasmática dos *TLR* mostra alta similaridade ao da família de receptores interleucina 1 (IL-1), e é denominada receptor de domínio *TIR* (Toll/IL-1 Receptor). Apesar da semelhança citoplasmática, as porções extracelulares de ambos os receptores são estruturalmente independentes. Os receptores de IL-1 possuem um domínio Ig-like, enquanto os *TLR* possuem sequências ricas em leucina (LRR), particular de cada TLR (TAKEDA & AKIRA, 2004).

Cada membro da família de *TLR* é capaz de reconhecer um conjunto de PAMPs. Como exemplo, o *TLR4* (*Toll-like receptor 4*) é capaz de reconhecer o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (endotoxina) e outros microrganismos Gram negativos, PAMPs associados ao *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* e componentes associados ao estresse celular, como proteínas de choque térmico (Hsp60),

fibrinogênio, fibronectina, e oligossacarídeos do ácido hialurônico (LIEN & INGALLS, 2002; NETEA et al., 2002).

A ativação do *TLR4* pelo LPS é dependente de duas glicoproteínas, a primeira, de 160 aminoácidos se liga tanto ao domínio extracelular do *TLR4* quanto ao LPS, e é denominada MD-2. A segunda, a CD14, serve como um receptor de alta afinidade por LPS, e após uma transferência catalítica de monômeros de LPS por uma proteína ligadora de LPS (LPS-binding protein -LBP) o complexo CD14/LPS interage com complexos *TLR4/MD-2* na superfície de células para iniciar a oligomerização do receptor e a sinalização (ALEXANDER & RIETSCHER, 2001)

Após o reconhecimento de estruturas capazes de estimular os *TLR*, a sinalização e ativação de NF- κ B (Fator nuclear κ B) pode ocorrer por duas vias diferentes (Figura 5): 1 – via dependente do Fator 88 de Diferenciação Mielóide (*MyD88*) e 2 – via independente do *MyD88*. Tanto o *TLR-4* quanto *TLR-2* podem ser ativados pelas duas vias sinalizadoras. Descoberto em 1986, o NF- κ B é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, pode modular a expressão de vários genes envolvidos em processos celulares e fisiológicos como recrutamento e migração de células de defesa para locais de infecção (O'SUILLLEABHAIN, et al., 2001).

Na via dependente do *MyD88*, uma mudança conformacional na estrutura dos *TLR* permite o recrutamento de moléculas adaptadoras como o *MyD88*, *TIRAP* (Proteína adaptadora contendo domínio TIR), *TRAM* (Molécula adaptadora relacionada ao TRIF) e *SARM* (Proteína contendo SAM e ARM) (O'NEIL & BOWIE, 2007). Este recrutamento de moléculas adaptadoras, é iniciado com a associação do *MyD88* com IRAK-4 (Quinase associada ao receptor de interleucina-4). Isto favorece a fosforilação de IRAK-1 (Quinase associada ao receptor de interleucina-4), que permite a ligação de TRAF6 (Fator de necrose tumoral associado ao fator 6) ao complexo. Este complexo formado, fosforila TAK1 (Quinase ativada por TGF- β) que expõe um domínio de ligação para TAB1 (Proteína 1 ligadora da quinase ativada por TGF- β) que se associa a TAB2 (Proteína 2 ligadora da Quinase ativada por TGF- β) formando um complexo. Após a formação deste complexo, TAK1 fosforila IKK (Quinase kappa B) que se dissocia do NF- κ B, permitindo que esta molécula migre para o núcleo celular e

atue como fator de transcrição para citocinas e quimiocinas. Simultaneamente, TAK1 ativa dois membros da família MAP quinases que ativam outras famílias de quinases, tais como a JNK (Quinase c-jun n-terminal) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias (Figura 5) (TAKEDA & AKIRA, 2004).

A via de sinalização independente do MyD88 é dependente da molécula TRIF (Domínio TIR contendo adaptador do indutor de interferon- β), que possui em sua estrutura regiões de interação com as moléculas TBK1 (Quinase ligadora de TANK 1), TRAF 6 e RIP 1 (Proteína quinase de interação com o receptor 1). Esta interação, faz com que *TRAF6* ative NF- κ B, além de promover a fosforilação de IRF3 (Fator de regulação 3 de interferon) levando à produção de interferon do tipo I (O'NEIL & BOWIE, 2007).

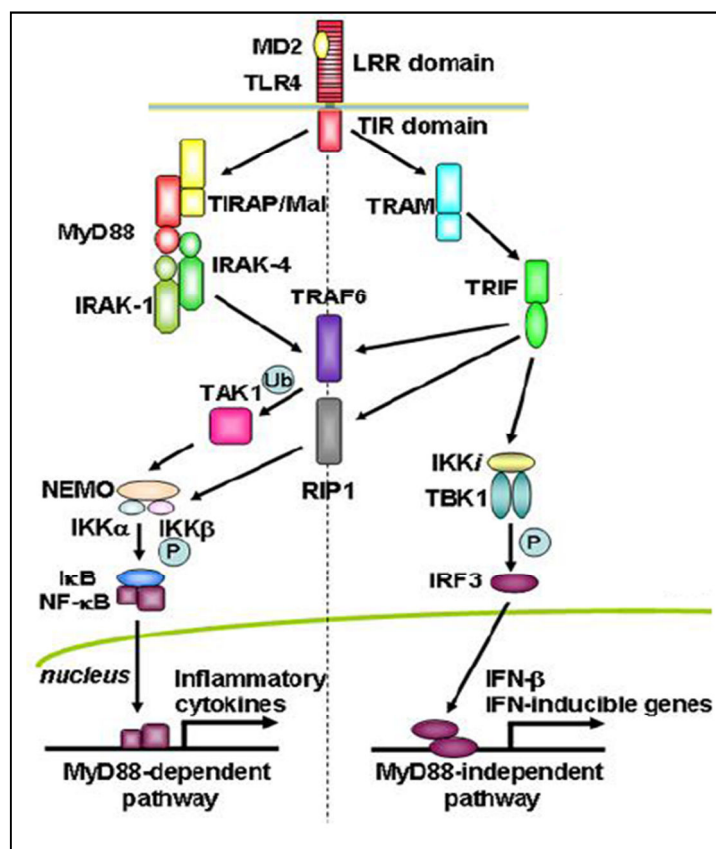


FIGURA 5 – Mecanismo de sinalização do *TLR4* em função do reconhecimento de LPS

Fonte: BORTOLATTO, 2008

Polimorfismos em genes codificadores de receptores associados ao sistema imunológico inato contribuem alterando a resistência ou suscetibilidade a mastite em bovinos leiteiros. Uma vez que o *TLR4* está envolvido no reconhecimento de PAMPs, mutações no gene codificador do *TLR4* podem comprometer a resposta imune do hospedeiro a certos microrganismos invasores. Considerando que o gene codificador do *TLR4* é altamente polimórfico em espécies bovinas e sua expressão gênica está associada à infecção intramamária, este gene pode ser um candidato potencial para uso em seleção assistida por marcadores moleculares para aumentar a resistência à mastite em gado leiteiro (SHARMA et al., 2006; WHITE et al., 2003).

No entanto, a estrutura do gene *TLR4* bovino é muito complexa. O gene *TLR4* é composto por 11013 bases, sendo que, no sentido 5'-3' estão: *Exon* 1 – composto por uma região 5'UTR (*Região 5' não traduzida* - bases 1 a 470) e *Exon* 1 (sequência codificadora - bases 471 a 563); *Exon* 2 (sequência codificadora - bases 5112 a 5278); *Exon* 3 (sequência codificadora - bases 8028 a 10293) e 3'UTR (bases 10294 a 11013) (Figura 6).

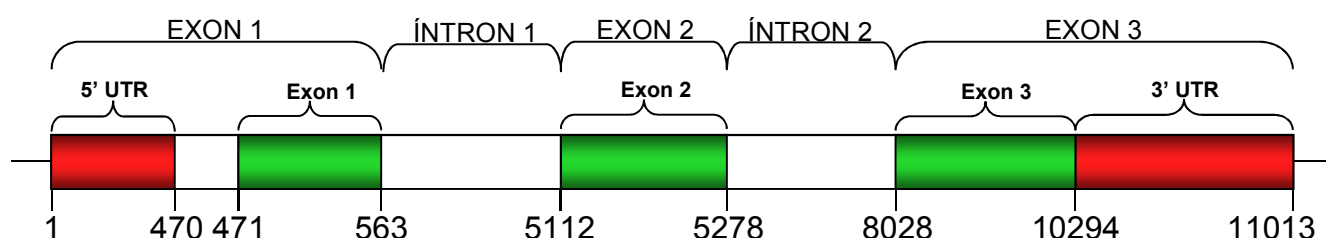


FIGURA 6 – Representação esquemática do gene *TLR4*

O gene *TLR4* codifica uma proteína madura com 841 aminoácidos. Os domínios de proteínas incluem (5' para 3'): sequência de sinal (resíduo 1-23), suposto co-receptor de ligação 1 (24-273), suposta região de ligação (274-368), suposto co-receptor de ligação 2 (369-632), região transmembrânica (633-653), região proximal citoplasmática (654-672), receptor TIR de domínio (673-819) e região citoplasmática distal (820-841) (WHITE et al., 2003). Entre essas regiões, o suposto co-receptor de ligação 1 tem sido associado ao reconhecimento de patógenos, conforme as descrições de WANG et al. (2007).

A capacidade de identificar vacas que estão suscetíveis à mastite, em maior ou menor grau, tem sido o objetivo de vários estudos em genética de populações. A identificação de um ou mais marcadores genéticos associados com suscetibilidade à mastite, resistência, ou ambos, permite aos produtores diminuir custos associados à mastite pela melhoria da sanidade do rebanho e, conseqüentemente, aumento dos lucros pela melhoria da qualidade do leite. Devido ao fato de a mastite e outras doenças infecciosas serem complexas, e a resposta imune às mesmas estar associada a vários genes, é provável que vários marcadores genéticos sejam futuramente utilizados em conjunto para realizar seleção assistida por marcadores genéticos. Sendo assim, genes associados com a resposta imune da glândula mamária são considerados potenciais marcadores genéticos devido à sua importância em resposta à mastite (YOUNGERMAN et al., 2004).

2.4 SISTEMA TAQMAN DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA POR PCR EM TEMPO REAL

A possibilidade de monitorar a PCR, a cada momento, revolucionou os processos de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. Com isso, nos últimos anos, a PCR em Tempo Real tem sido utilizada em larga escala no campo do diagnóstico molecular, pois supera as limitações do tempo relacionadas aos métodos tradicionais de cultura de microrganismos (NICLAS et al., 2008).

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica de PCR criada por MULLIS (1986) com a descoberta de fluoróforos, e utilização de tecnologia óptica em associação à informática. Em uma PCR tradicional, o produto da reação, ou seja, o fragmento alvo é detectado após o término da reação (*end-point*) por eletroforese em gel, coloração deste produto com um ligante de DNA e obtenção de imagem. A tecnologia de PCR em Tempo Real prevê a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original, acrescentando além dos iniciadores utilizados na PCR tradicional, um terceiro oligonucleotídeo (sonda TaqMan[®]), com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher*, capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET (Transferência de

energia de ressonância por fluorescência), absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo.

Este fenômeno é uma interação baseada na distância (10-100 Å) entre os estados eletrônicos excitados das duas moléculas de corante em que a excitação é transferida de uma molécula doadora para uma molécula receptora, sem emissão de fótons. Devido à propriedade 5'-3' exonucleásica da enzima Taq DNA polimerase na reação de PCR, ocorre, durante a fase de extensão dos iniciadores, a separação do fluoróforo com o *quencher*, o que abole o FRET. Neste caso, a fluorescência é captada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em Tempo Real (FIGURA 7). À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, aumenta o número de fluoróforos livres do fenômeno FRET e consequentemente a fluorescência gerada (DUARTE, 2006).

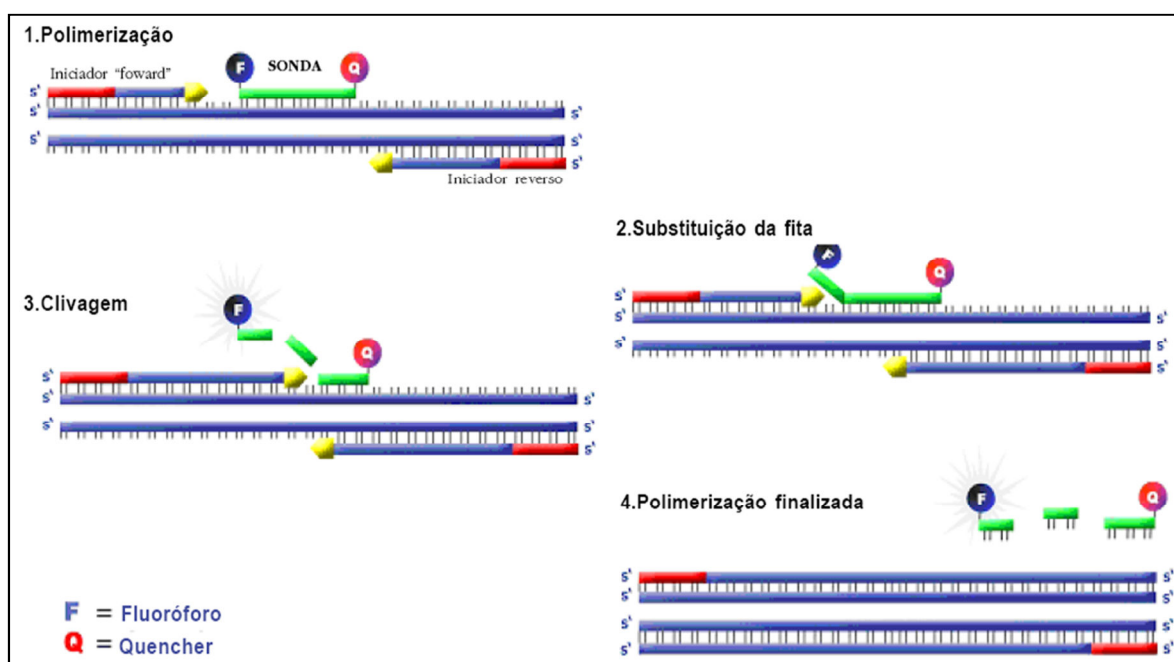


FIGURA 7 – Esquema de representação da PCR em Tempo Real com sonda TaqMan®

Fonte: ALVES & NOVAIS, 2004

Atualmente, os métodos mais utilizados de hibridização de oligonucleotídeos para alelos específicos são capazes de diferenciar alelos em um mesmo *locus* em tempo real utilizando detecção por fluorescência. Os sistemas de sondas TaqMan (Applied Biosystems®) e Molecular Beacons, os

quais foram inicialmente desenvolvidos para PCR quantitativo, também podem ser aplicados para genotipagem de SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo único). Duas sondas são utilizadas em um sistema bi-alélico, ou seja, cada sonda é específica a uma variante alélica e marcada com um fluoróforo repórter diferente. A sonda, consiste de um oligonucleotídeo complementar à sequência de interesse, localizada diretamente sobre o SNP, marcada na extremidade 5' com o fluoróforo *repórter* e na 3' com o *quencher* (Figura 8) (SYVÄNEN, 2001).

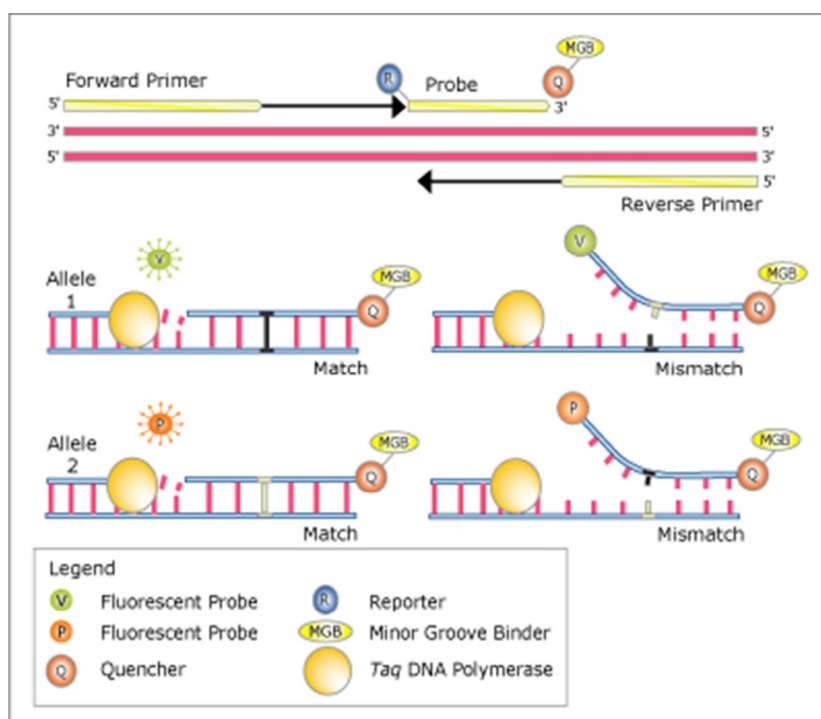


FIGURA 8 – Mecanismo de discriminação alélica utilizando sondas TaqMan®

Fonte: CAETANO, 2009

Quando a sonda está intacta, a proximidade da molécula *quencher* com o *repórter* reduz o sinal de fluorescência emitida. Esse arranjo garante que a extremidade 3' da sonda permaneça bloqueada e não atue como um *primer*. O *primer forward* é amplificado e a sonda é clivada pela atividade 5'-3' exonucleásica da enzima taq DNA polimerase.

2.5 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO

A comparação das sequências de DNA genômico de indivíduos diferentes pode apresentar algumas posições em que pode ocorrer mais do que uma base. Estas variabilidades são denominadas *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ou polimorfismos de nucleotídeo único. Os SNPs são abundantes no genoma e é estimado que ocorra um a cada 1000 bases. Além disso, é provável que *SNPs* em regiões reguladoras de genes possam influenciar na ocorrência de doenças (SACHIDANANDAM et al., 2001; VENTER et al., 2001).

O método padrão para a detecção de polimorfismos é por PCR-RFLP, onde são utilizadas enzimas de restrição que reconhecem uma sequência de bases específica na dupla-hélice de DNA e clivam ambas as fitas em sítios determinados. Há, no entanto, algumas desvantagens com esta abordagem como a necessidade de dedicar tempo e trabalho intensivo. A utilização de ensaios de genotipagem de SNPs utilizando o sistema TaqMan[®] de discriminação alélica por PCR em tempo real (Applied Biosystems) inovou as análises laboratoriais, sendo confiável para detectar uma mutação de mudança de base única. É considerada apropriada por seu baixo custo, praticidade e precisão para a realização de análises de associação (MCGUIGAN & RALSTON, 2002).

Assumindo que aproximadamente 40% dos casos clínicos de mastite que ocorrem anualmente são causados por bactérias Gram negativas e que as mastites são responsáveis por prejuízos consideráveis, culminando em menor qualidade do leite cru e menor rendimento industrial, o emprego de técnicas moleculares de discriminação alélica favorecem análises previstas para o leite cru permitindo aplicação de marcadores moleculares para seleção de rebanho e para produção de leite de melhor qualidade, em concordância às exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Verificar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único no gene codificador do *TLR4* em vacas da raça holandesa, em uma propriedade de Goiás, bem como a relação entre os genótipos identificados e a contagem celular somática.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar o DNA de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Peptoniphilus indolicus*, *Klebsiella* sp. e *Serratia marcescens* em amostras de leite cru individual de vacas;
- Realizar a contagem celular somática em amostras de leite cru individual de vacas, com vistas à sanidade da glândula mamária e consequente qualidade do leite;
- Verificar a presença de polimorfismo de nucleotídeo único no gene codificador do TLR4 em amostras de sangue de vacas leiteiras;
- Avaliar a relação entre os genótipos identificados e a CCS individual de vacas leiteiras;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da propriedade e do mês de colheita das amostras

Na seleção da propriedade rural foram adotados os seguintes critérios:

a) produção de leite utilizando animais puros da raça holandesa; b) possuir sistema de controle de dados zootécnicos dos animais (data de parto, ordem de parto e dias de lactação) e c) possuir histórico de análises para CCS do leite individual de vacas.

A propriedade rural selecionada localiza-se na zona rural de Anápolis-Go, possui sistema de criação intensivo do tipo “*Free-stall*” e sala de ordenha com sistema de contenção em espinha de peixe duplo-5. Atualmente, são realizadas duas ordenhas diárias com intervalo fixo de 12 horas, sendo a primeira realizada às 4 horas e a segunda às 16 horas.

O mês de abril foi selecionado para colheita de amostras, devido a algumas características peculiares que proporcionam um grande desafio aos animais, tais como, o acúmulo máximo de água no solo, aproximadamente 100 mm (Figura 9), perda da produção leiteira de aproximadamente 3% em função do clima, temperatura média mensal variando de 15 a 31°C e umidade relativa do ar variando de 60 a 70% (Figura 10 – A, B, C, D) (INMET, 2010).

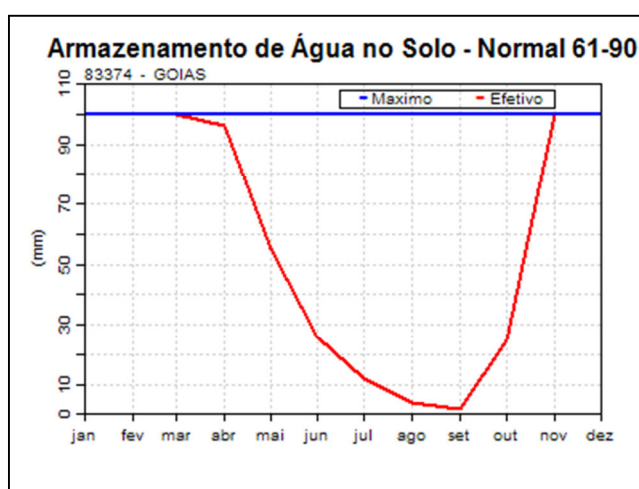


FIGURA 9 – Balanço hidroclimático médio anual
FONTE: INMET, 2010

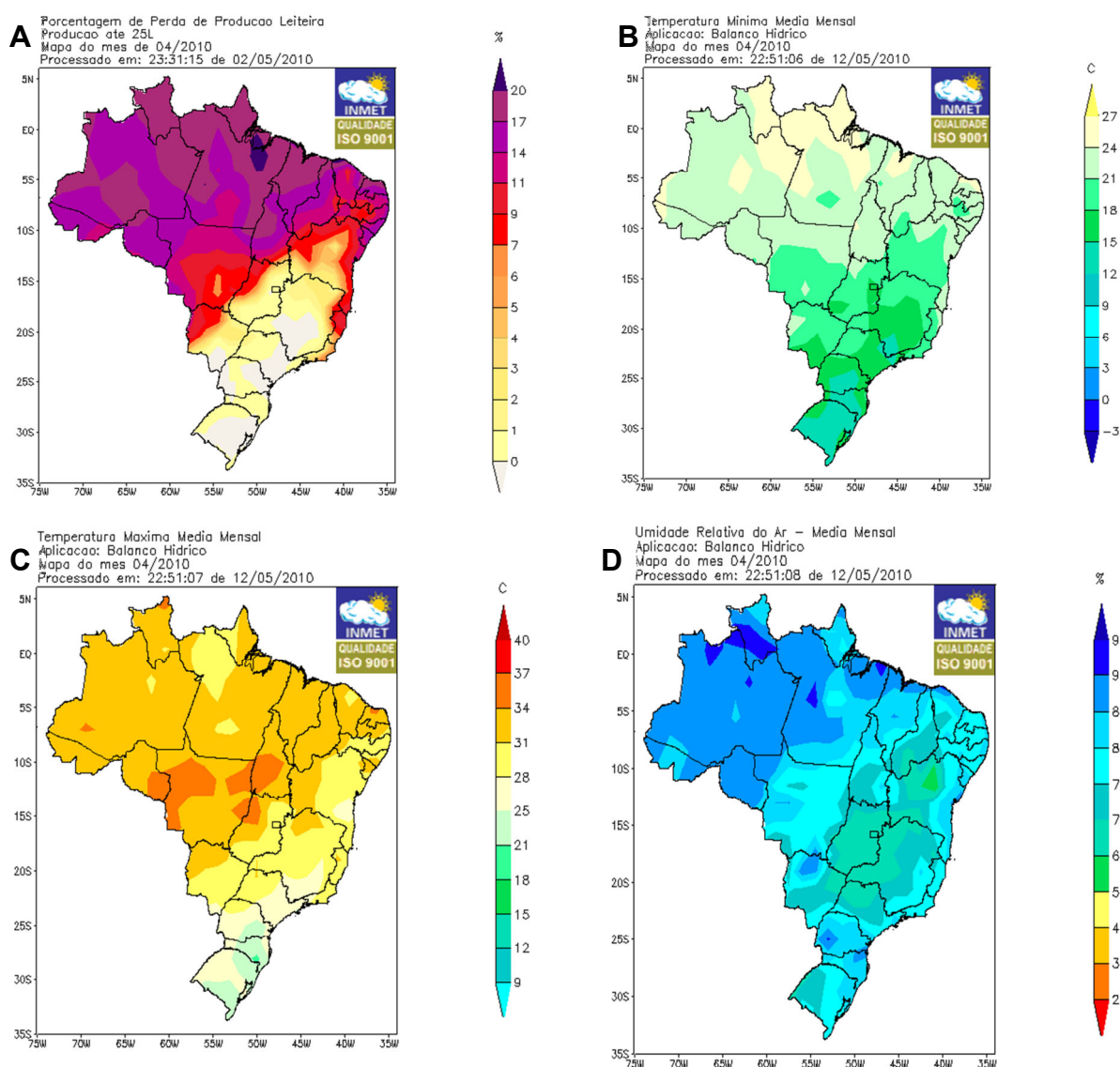


FIGURA 10 – Condições climáticas do mês de abril. A) Porcentagem de perda da produção leiteira; B) Temperatura mínima média mensal; C) Temperatura máxima média mensal; D) Umidade relativa do ar média

FONTE: INMET, 2010

4.2. Colheita de amostras

No mês de abril do ano de 2010, foram coletadas 150 amostras de leite individual de vacas e 150 amostras de sangue em uma propriedade rural do Estado de Goiás.

Os dados zootécnicos dos animais serviram como parâmetro para excluir das análises estatísticas, animais que apresentavam menos de sete e mais de 305 dias de lactação no momento da colheita, pelo aumento natural da contagem celular somática no leite de animais até o oitavo dia após o parto e no final de lactação (SANTOS & FONSECA, 2007).

A composição centesimal das amostras de leite cru individual de vacas foi utilizada como parâmetro para excluir das análises estatísticas, animais que apresentavam valores fora do padrão para leite de vacas holandesas. Sendo assim, utilizando dados da Federação Mundial de Gado Holandês (WHFF, 2010), o percentual médio e o desvio padrão para o percentual de gordura do leite foi calculado. Os percentuais de gordura no leite acima de $3,96 \pm 0,24$ foram considerados “*outliers*”.

4.2.1 Leite individual de vacas

As amostras de leite individual de vacas foram representativas de uma ordenha completa em um período de 24 horas. Estas foram submetidas às análises de contagem celular somática e composição centesimal por citometria de fluxo, sendo conservadas com Bronopol[®] (Chemicaland21, Republic of Korea), um produto químico de ação bactericida que retrata o momento da colheita e não interfere na reação de PCR em tempo real (TODHUNTER et al., 1985; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999).

A colheita de leite em ordenhadeira de circuito fechado foi realizada com auxílio de medidores, posicionando a válvula corretamente no momento da ordenha, visando o enchimento dos mesmos. Após a ordenha completa e a respectiva coleta, foi procedida a agitação do leite por meio da permissão da entrada de ar no medidor. Em seguida, a válvula foi posicionada no sentido da colheita de leite sendo o volume de 40 mL vertido no frasco de amostragem.

4.2.2 Sangue

A colheita de amostras de sangue destinadas à genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único foi realizada por meio de punção na artéria coccígea utilizando agulhas descartáveis 40x16mm e dispositivo para colheita a vácuo, em tubo descartável de 13x75mm (Vacuette[®] Greiner, Bio One – São Paulo, Brasil) contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico) a 10%.

Logo após a colheita de 5 mL de sangue, os tubos foram identificados com o número do brinco dos animais, homogeneizados para evitar a coagulação do sangue e imediatamente estocados sob refrigeração utilizando caixas de isopor e gelo reciclável, sendo posteriormente encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (LBM/CPA/EV/UFG).

4.3 Princípios analíticos

4.3.1 Contagem Celular Somática em amostras de leite

As amostras destinadas à CCS foram inicialmente aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C/15min. Para a análise foi utilizado o equipamento Fossomatic 500 Basic (Foss Electric[®] A/S. Hillerod, Denmark), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo. Uma alíquota da amostra foi automaticamente pipetada e homogeneizada aos reagentes de lise das membranas celulares. As membranas das células somáticas uma vez rompidas liberam o DNA que por sua vez é corado por brometo de etídio. O equipamento possui uma lâmpada halógena que emite raios de luz azul que, ao incidirem sobre o DNA corado, provocam a emissão de pulsos de luz vermelha. Esses pulsos são ampliados e contados por um foto-multiplicador. Aplica-se um fator de correção e, então, o equipamento expressa o resultado em células/mL.

4.3.2 Composição centesimal em amostras de leite

Os teores de componentes do leite foram determinados utilizando o Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark), cujo princípio analítico baseia-se na absorção diferencial de ondas infravermelhas pelos componentes do leite. Após ser automaticamente pipetada para o interior do equipamento, uma alíquota da amostra foi exposta a uma radiação infravermelha possibilitando a determinação da concentração de cada componente. A alíquota percorreu um sistema óptico que mede a energia absorvida em comprimentos de onda específicos dentro da região infravermelha. Moléculas de gordura, proteína, lactose, e demais componentes dos sólidos totais absorvem a luz infravermelha por diferenças estruturais específicas desses componentes, que vibram em comprimentos de onda característicos. O processo para quantificar o componente requer a medida e o uso de dois comprimentos de onda: referência e leitura. Para cada componente, as amostras foram irradiadas no comprimento de onda de referência e no comprimento de onda de leitura. O equipamento emite um feixe de luz de radiação infravermelha, que é colhido por um detector. Os sinais de pulso são detectados e, por meio de uma placa do equipamento, ocorre a conversão da concentração do componente específico para percentuais. Assim, o resultado final é automaticamente calculado, por meio da comparação entre as medidas de referência e as medidas da amostra (IDF 141C, 2000).

4.3.3 Técnica de PCR em Tempo Real para identificação dos principais agentes causadores de mastite

Para identificação dos microrganismos presentes no leite cru individual de vacas, foram selecionadas 12 amostras, ou seja, 20% do total de espécimes que apresentaram contagem celular somática acima de 200.000 cs/mL. Para tanto, empregou-se o *kit Pathoproof™ Mastitis PCR Assay* (Finnzymes Diagnostics®) F-870-L, compatível com o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Os procedimentos para a realização deste ensaio analítico serviram para a detecção e quantificação relativa de 11 microrganismos mais comumente encontrados no leite, obtendo um perfil microbiológico a nível

molecular da propriedade de estudo, justificando a análise do *TLR4* em função da contagem celular somática individual de vacas. O kit empregado conta com quatro reações separadas de multiplex PCR em tempo real, todas contendo controle interno de amplificação. O *master mix* para a reação um é composto por *primers* e sondas para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. e *C. bovis*. O *master mix* dois, de *primers* e sondas para detecção de *E. coli* e *Streptococcus dysgalactiae*. Já o *master mix* três, detecta *Staphylococcus* sp. (inclui todos os estafilococos coagulase negativa relevantes), *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*. E por fim, o *master mix* quatro é capaz de detectar *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens*, *Arcanobacterium pyogenes* e/ou *Peptoniphilus indolicus*.

a) Protocolo para extração de DNA de amostras de leite cru

A extração de DNA das amostras de leite cru foi realizada em conformidade com o protocolo do *Pathoproof Mastitis PCR Assay* (Finnzymes Diagnostics[®], 2009).

b) Protocolo de amplificação do DNA dos agentes causadores de mastite

De acordo com o manual de utilização do *kit*, as reações totalizam um volume final de 20 µl, e as condições de amplificação utilizadas no modo de amplificação Fast 7500 estão relacionadas no Quadro 2.

QUADRO 2 – Condições de amplificação para as reações de multiplex PCR em tempo real do *kit Pathoproof*[®]

Etapa		Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial		95°C	10 minutos
40 Ciclos	Desnaturação	95°C	5 segundos
	Anelamento	60°C	1 minuto
Extensão		25°C	5 segundos

c) Interpretação dos resultados – *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa

O *Pathoproof Mastitis PCR Assay*[®] (Finnzymes Diagnostics[®]) detecta a presença de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa. Se uma amostra for positiva para *S. aureus* e *Staphylococcus* sp., significa que *S. aureus* está presente na amostra. Por outro lado, se a amostra for negativa para *S. aureus* e positiva para *Staphylococcus* sp., o resultado deve ser interpretado como positivo para *Staphylococcus* coagulase negativa. No entanto, se uma amostra for positiva para *S. aureus*, não é possível realizar a identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa.

d) Interpretação dos resultados – Resultados relativos

Nos relatórios, a cada alvo bacteriano foi atribuído um percentual relativo dependendo do valor Ct (*cycle threshold* – número do ciclo que a curva exponencial cruza a linha do *threshold*, ou seja, o nível de fluorescência no início do crescimento exponencial).

4.3.4 Técnica de Genotipagem de SNPs

a) Protocolo para extração de DNA do creme leucocitário das amostras de sangue

Inicialmente, os tubos contendo as amostras de sangue foram homogeneizados em agitador de tubos. De cada amostra, uma alíquota de 400µL de sangue foi transferida para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e, a esta alíquota, foram adicionados 500µL de tampão TE (10 mM Tris HCl, pH = 8 e 1 mM EDTA). Novamente, as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos e centrifugadas a 10.000 rpm/10min. O sobrenadante foi descartado por inversão e ao *pellet* formado o procedimento foi repetido até que fosse obtido o creme leucocitário (VIDAL et al., 2005). Em seguida, a extração de DNA foi

realizada em conformidade com o protocolo de extração para o *High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics®)*.

b) Discriminação alélica

A discriminação alélica foi realizada baseada em quatro SNPs de referência depositados no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (Quadro 3). Para animais *Bos taurus taurus*, o *locus 1* (Nº de acesso GenBank rs8193046) possui variação alélica (A/G) e está localizado no íntron 1 do gene codificador do *TLR4*. O *locus 2* (Nº de acesso GenBank rs8193047) não possui variação em animais *bos taurus taurus* (G), codifica o aminoácido Glutamina (posição 39) e serviu como parâmetro de identificação da espécie dos animais. O *locus 3* (Nº de acesso GenBank rs8193060) possui variação alélica (C/T), está localizada no éxon 3, na região codificadora do aminoácido Serina (aminoácido na posição 552 – co-receptor putativo de ligação 2, localizado na porção extracelular do *TLR4* -sequências ricas em leucina). O *locus 4* (Nº de acesso GenBank rs29017188) possui variação alélica (C/G) e está localizado na região 5'UTR.

QUADRO 3 – SNPs selecionados para discriminação alélica

Locus	Número de acesso GenBank	Alelos para <i>Bos taurus</i> raça Holandesa	Região	Aminoácido	Posição do aminoácido na proteína	Posição no gene <i>TLR4</i>
1	rs8193046	A/G	Intron 1	-	-	5088
2	rs8193047	G	Exon 2	Glutamina [Gln]	39	5135
3	rs8193060	C/T	Exon 3	Serina [S]	552	9423
4	rs29017188	C/G	5' UTR	-	-	245

Os *primers* e sondas utilizados para genotipagem foram desenhados com o *software Primer Express (Applied Biosystems®)* utilizando a sequência de referência do gene *TLR4* de *Bos taurus* (número de acesso no GenBank DQ839567.1) e estão relacionados no Quadro 4. Para testar a especificidade dos

iniciadores foi realizada uma avaliação *in silico* por meio dos softwares *Nucleotide BLAST* e *Primer BLAST* disponíveis no site do NCBI.

QUADRO 4 – *Primers* e sondas utilizadas para genotipagem. As bases marcadas indicam os alelos para genotipagem

Locus	Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Tamanho de fragmento	Posição no gene <i>TLR4</i>
1	TLR4 F1	GAGAGGAGAGTTGCTTGAAGTCT	107pb	5039-5062
	TLR4 R1	GCTCCATGCACTGGTAACTAATGT		5145-5122
	TLR4 S1	FAM-CAGGAAGACACC G CA-MGB	X	5076-5090
	TLR4 S1.1	VIC-AAGACACC A CATCTAA-MGB		5080-5095
2	TLR4 F2	CTAAGGTGCATGCAGGAAGACA	138 pb	5064-5085
	TLR4 R2	CAGGTCCAGCATCTTGGTTGA		5201-5181
	TLR4 S2	FAM-TTCCTAACATTAGTTACCA A TG-MGB	X	5116-5137
	TLR4 S2.1	VIC-TCCTAACATTAGTTACCA G TG-MGB		5117-5137
3	TLR4 F4	CCACTCGCTCCGGATCCT	79 pb	9396-9413
	TLR4 R4	CCTTGGCAAATTCTGTAGTTCTTG		9474-9451
	TLR4 S4	FAM-ACTGCAG T TTCAACCGTATC-MGB	X	9416-9435
	TLR4 S4.1	VIC-ACTGCAG C TTCAACCGTA-MGB		9416-9433
4	TLR4 F5	CCAGCTTCTCTTGTGTTACTTCA	150 pb	173-197
	TLR4 R5	CGGGAGGAGAGGAAGTGAGA		322-303
	TLR4 S5	FAM-TATTTATCTCTCTGCCACC G GA-MGB	X	265-243
	TLR4 S5.1	VIC-TTATCTCTCTGCCACC G GAG-MGB		262-242

Para a amplificação dos fragmentos desejados, foram utilizadas as seguintes condições de reação: 5 µL de *template*, 5,35 µL de água mili-Q esterilizada, 12,5 µL de TaqMan[®] Genotyping Master Mix, 0,45 µL de cada primer (concentração final 0,9 µmols) e 0,625 µL de cada sonda (concentração final 0,25 µmols), totalizando um volume final de 25 µL. As condições de amplificação estão relacionadas no Quadro 5.

QUADRO 5 – Condições de amplificação para cada reação

ETAPA		Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4	
		T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo	T°C	Tempo
Pré-PCR / Pós-PCR		60	30 s	60	30 s	60	30 s	60	30 s
Desnaturação inicial		95	10 min	95	10 min	95	10 min	95	10 min
40 ciclos	Desnaturação	95	15 s	95	15 s	95	15 s	95	15 s
	Anelamento	59	1 min	60	1 min	59	1 min	59	1 min

4.4 Tratamentos estatísticos

O aumento na disponibilidade de dados genéticos de populações resultou em um número crescente de estudos que tentam associar a suscetibilidade genética a doenças complexas. No entanto, poucas associações relatadas como significativas são aplicadas em novos estudos. Resultados de testes de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* no controle de populações podem indicar erros de genotipagem que podem ser resultado da ausência de repetibilidade. Portanto, este tem sido recomendado como um teste crucial em qualquer estudo de associação genética populacional (TRIKALINOS et al., 2006). Sendo assim, as frequências alélicas e genotípicas foram calculadas utilizando o *software* POPGENE versão 1.32 (YEH, 1999) e o teste do χ^2 foi realizado para detectar o equilíbrio *Hardy-Weinberg* da mutação.

A CCS não possui como característica uma distribuição normal. Para aproximá-la, com homogeneidade de variâncias e ajustando a amostragem do dia para um período de lactação, foi transformada em escore de células somáticas, aplicando a seguinte fórmula: $SCS = \log_2[CCS/100000] + 3$; onde o valor de CCS está na unidade de células somáticas por microlitro (cs/ μ L) (GANS & SHOOK, 1987)

Posteriormente, foi realizada análise de variância entre os genótipos combinados e os testes de Duncan e Scott & Knott utilizando os softwares R (R-DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) e SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

A herdabilidade do escore de células somáticas e as variâncias fenotípica, genotípica e ambiental em relação aos genótipos estudados foram determinadas por meio do *software* Genes (CRUZ, 2006)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação relativa dos principais microrganismos causadores de mastite

Na Tabela 1 pode ser verificada a distribuição dos microrganismos identificados e quantificados em amostras de leite cru individual de vacas. Das 150 amostras de leite cru analisadas para CCS, 60 apresentaram contagem acima de 200.000 cs/mL, sendo que 12 (20%) foram submetidas à extração de DNA e detecção dos principais microrganismos causadores de mastite.

Observa-se que há uma maior frequência de microrganismos Gram negativos (52,47%). Dentre estes, destaca-se a presença do DNA de *Klebsiella oxytoca* (36,96%), *Serratia Marcescens* (12,58%) e *Escherichia coli* (2,93%). Entre os Gram positivos encontrados (47,53%) predominam *Staphylococcus* sp. (15,42%), *Streptococcus uberis* (9,30%), *Streptococcus dysgalactiae* (7,44%), *Streptococcus agalactiae* (6,51%) e *Staphylococcus aureus*.

TABELA 1 – Frequência de ocorrência de microrganismos identificados em amostras de leite cru individual de vacas holandesas (n=12) e percentual relativo total de acordo com a coloração pelo método de Gram, Goiânia-GO, 2010

Microrganismo identificado	Frequência observada (%)	Microrganismo identificado	Frequência observada (%)
<i>Corynebacterium bovis</i>	1,3	<i>Streptococcus uberis</i>	9,30
<i>Enterococcus</i> sp.	0,0	<i>Staphylococcus</i> sp.	15,42
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,24	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	4,32
<i>Escherichia coli</i>	2,93	<i>Klebsiella oxytoca</i>	36,96
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7,44	<i>Serratia marcescens</i>	12,58
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6,51		
Classificação dos microrganismos		Percentual Relativo total (%)	
Gram positivos		47,53	
Gram negativos		52,47	

Estes resultados revelam risco para a saúde pública, uma vez que os patógenos são destruídos no processo de pasteurização, no entanto, toxinas termorresistentes como algumas produzidas por cepas de *Staphylococcus aureus* (3,24%) não são destruídas, permanecendo nos produtos lácteos, diminuindo sua vida de prateleira e qualidade físico-química.

Além disso, apesar da baixa frequência observada para *Staphylococcus aureus*, observou-se alta frequência para *Staphylococcus* sp. (15,42%). Estes patógenos classificam-se entre aqueles de maior associação à mastite contagiosa e subclínica, dados preocupantes quanto à sanidade da glândula mamária das vacas analisadas e, por consequência, da qualidade do leite cru produzido.

Apesar de condições experimentais divergentes, cabe comparar estes resultados com os achados de BRADLEY et al. (2007), nos quais foram isolados *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* em amostras de leite provenientes de animais com mastite clínica em 23,5% e 19,8% respectivamente. Outros estudos, envolvendo isolamento de agentes em animais com mastite subclínica, relacionam ainda a ausência de crescimento microbiano em 47% das amostras analisadas, presença de *Staphylococcus* coagulase negativa (22,6%), *Staphylococcus aureus* (20,6%), outros *Streptococcus* sp. (11,1%), *Streptococcus agalactiae* (2,3%), Coliformes (2,9%) e outros microrganismos (5,8%) (FERGUSON et al., 2007).

ARCURI et al. (2008) avaliando contaminantes de leite cru refrigerado, identificaram que as bactérias psicrotróficas Gram negativas estiveram relacionadas a 81,2% dos casos e o agente patogênico *Klebsiella oxytoca* foi identificado em 4% dos isolamentos. No presente estudo, este agente relacionou-se a 36,96% de frequência, denotando grande perigo microbiológico e potencialização de alterações físico-químicas do leite cru, causando instabilidade, tendo em vista a viscosidade aumentada devido à sua presença.

Apesar da baixa frequência de *Escherichia coli* identificada neste estudo, é possível afirmar que este patógeno contribui para a mastite ambiental de difícil controle e erradicação, estando relacionada às práticas higiênico-sanitárias deficitárias e fracassos nos tratamentos preconizados, como pode ser visto na Figura 11, propriedade dotada de sistema de criação intensivo do tipo

“free-stall”, com tamanho de cama inadequado para o porte dos animais de produção e grande acúmulo de sujidades, urina e fezes no ambiente.



FIGURA 11 – Cama do sistema de criação “free-stall” com tamanho inadequado e acúmulo de fezes e sujidades.

Provavelmente, as divergências quanto à frequência encontrada estão relacionadas à sensibilidade e especificidade da técnica utilizada para identificação dos microrganismos associadas às variáveis do ambiente de estudo. TAPONEN et al (2009) ressaltaram que mais de 30% de amostras de leite de vacas com mastite clínica e/ou subclínica enviadas para identificação de microrganismos por cultura bacteriológica, não apresentam crescimento bacteriológico em um período de 48 horas de incubação. KOIVULA et al. (2007), afirmam que é ainda mais comum a ausência de crescimento microbiano quando as amostras de leite são provenientes de animais com mastite subclínica, com um percentual de amostras negativas que pode variar de 28,7% a 38,6%.

5.2 Genótipos identificados para diferentes SNPs em animais da raça holandesa em Goiás.

O gene *TLR4* relaciona-se à resposta imunológica da glândula mamária, quando há exposição e ação aos microrganismos Gram negativos, que no caso do presente estudo, referem-se ao maior percentual de bactérias identificadas. Este gene exerce a função de potencial marcador genético devido à sua importância à mastite.

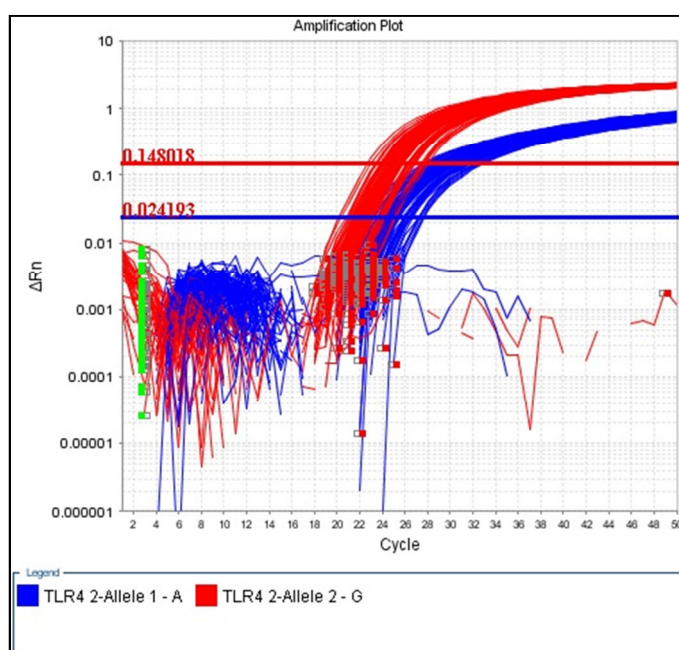


FIGURA 12 – Representação das curvas de amplificação de animais homocigotos GG para o SNP 2.

Analisando as Figuras 12 e 13 relativas à amplificação da PCR em tempo real e discriminação alélica para o *locus 2*, nota-se que todos os animais pertencem à espécie *bos taurus taurus*, não apresentando mudança de base A>G na posição 5135 do gene codificador do *TLR4*.

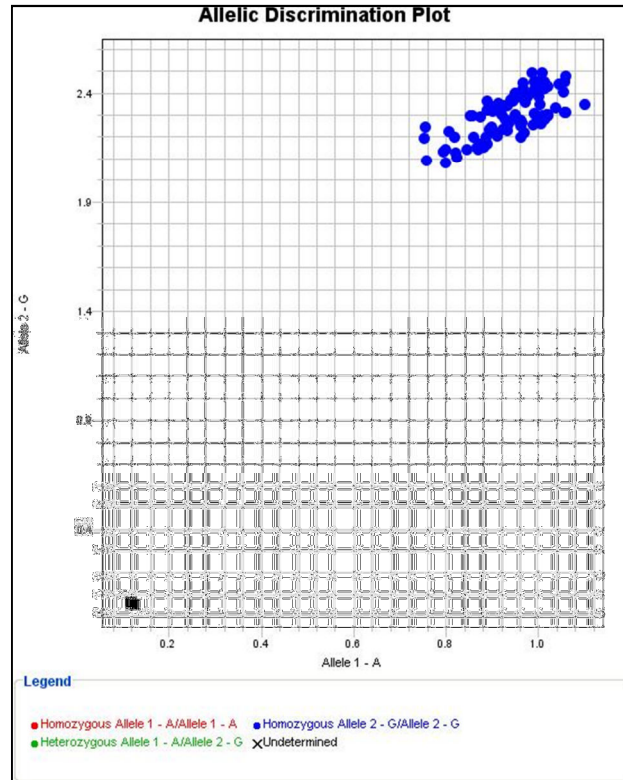


FIGURA 13 – Discriminação alélica em amostras de sangue analisadas para o SNP 2 do gene *TLR4*.

As frequências alélicas, genótípicas e o resultado do teste do Qui-quadrado para avaliar se a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* estão dispostos na Tabela 2. Pode ser observado, que para o *locus* 1, o genótipo heterozigoto GA apresentou maior frequência (45,9%), seguido pelos genótipos homozigoto AA (33,7%) e homozigoto GG (20,4%), com uma frequência alélica de 56,6% para o alelo A e 43,4% para o alelo G. Para o *locus* 3, o genótipo homozigoto CC apresentou maior frequência (43,8%), seguido pelos genótipos heterozigoto TC (42,8%) e homozigoto TT (13,4%), com uma frequência alélica de 65,3% para o alelo C e 34,7% para o alelo T. Já para o *locus* 4, o genótipo heterozigoto GC apresentou maior frequência (48,9%), seguido pelos genótipos homozigoto CC (32,6%) e homozigoto GG (18,5%), com uma frequência alélica de 57,1% para o alelo C e 42,9% para o alelo G.

Pode-se avaliar que o conjunto de dados deste estudo, permite obter estimativas de diferentes parâmetros genéticos seguindo os princípios da estatística e da biometria.

TABELA 2 – Frequências alélicas e genotípicas para diferentes SNPs e teste X^2 para determinar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

<i>Locus</i>	Genótipo	Nº de animais	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica	X^2 (P)
1	AA	33	33,7	A	56,6	0,48 (0,48)
	GA	45	45,9	G	43,4	
	GG	20	20,4			
2	GG	98	100,0	G	100,0	-
	AA	0	0	A	0,0	
	GA	0	0			
3	CC	43	43,8	C	65,3	0,34 (0,55)
	TC	42	42,8	T	34,7	
	TT	13	13,4			
4	CC	32	32,6	C	57,1	0,002 (0,95)
	GC	48	48,9	G	42,9	
	GG	18	18,5			

Os resultados obtidos de frequência alélica e genotípica para o SNP situado no *locus* 1 se assemelham aos de WANG et al (2007), os quais encontraram frequência alélica de 54% para o alelo A, 46% para o alelo G e frequência genotípica de 30% AA, 47% GA e 23% GG em vacas holandesas na China.

O resultado do teste não-paramétrico do Qui-quadrado, revelou que a população está em equilíbrio *Hardy-Weinberg* para todos os 3 *loci* selecionados ($P > 0,05$), indicando que as frequências alélicas e genotípicas permanecerão constantes no decorrer das gerações.

5.3 Associação entre genótipos identificados e escore de células somáticas para cada SNPs em animais da raça holandesa.

Ao analisar os resultados dispostos na Tabela 3 verifica-se que os genótipos com menor média de SCS foram *locus1-AA* (2,4), *locus4-CC* (2,4) e *locus3-CC* (2,6), sugerindo que os alelos A e C estão associados a genótipos de menor SCS. Por outro lado, animais com os genótipos *locus 1-GG* (3,6), *locus3-TT* (3,5) e *locus4-GG* (3,5), apresentaram maiores escores de células somáticas, podendo os alelos T e G estarem associados ao aumento do SCS e, conseqüentemente, uma maior suscetibilidade à mastite.

TABELA 3 – Média de escore de células somática para diferentes genótipos em vacas holandesas Goiás, Brasil (n=69)

SNP	Genótipo	Média de SCS
1	AA	2,4
	GA	2,7
	GG	3,6
3	CC	2,6
	TC	2,8
	TT	3,5
4	CC	2,4
	GC	2,8
	GG	3,5

WANG et al. (2007) utilizando a técnica de PCR e *Single-Strand Conformational Polymorphism* (SSCP) também identificaram a presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no *intron 1* do gene *TLR4* (A/G). Esses autores, ao analisarem o efeito do polimorfismo sobre o escore de células somáticas, observaram que vacas holandesas homozigotas para o alelo A apresentaram escore de célula somática inferior em relação aos animais homozigotos para alelo G. Esses resultados reforçam a ideia de que o alelo A pode desempenhar um papel importante na resistência à mastite.

5.4 Associação entre os genótipos combinados e escore de células somáticas em animais da raça holandesa

Os dados contidos nas Tabelas 4 e 5 analisados por meio do emprego dos testes de Duncan e Scott & Knott, respectivamente, revelam que os genótipos combinados representados pelos numerais 5 e 6, apresentam maiores médias de SCS que não apresentam diferença estatística significativa entre si ($P < 0,05$). Já os genótipos representados pelos numerais 2, 1 e 8, de menores médias, também não apresentam diferença estatística significativa entre si ($P < 0,05$). No entanto, os genótipos 2, 1 e 8 apresentam diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para SCS quando contrastados com os genótipos de maior SCS, 5 e 6, sugerindo um grande potencial na utilização em seleção assistida por marcadores moleculares visando produção de leite com menor escore de células somáticas e, conseqüentemente, de melhor qualidade.

TABELA 4 – Efeito da combinação de genótipos no SCS de vacas holandesas de uma propriedade do Estado de Goiás, ao teste de Duncan (n=69)

Nº de ordem da combinação de genótipos	Combinação de genótipos	Nº de animais	Média de SCS	Erro padrão das médias
5	GGCCGC	1	5,3 ^a	-
6	GGCCGG	1	5,0 ^{ab}	-
4	GATCGG	1	3,9 ^{abc}	-
7	GGTCGC	1	3,7 ^{abc}	-
9	GGTTGG	10	3,5 ^{abc}	0,51
3	GATCGC	25	2,72 ^{bc}	0,21
2	AACCCC	21	2,39 ^c	0,15
8	GACCGC	7	2,57 ^c	0,21
1	GGTCGG	2	2,5 ^c	0,70

* Escores médios seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

TABELA 5 – Efeito da combinação de genótipos no SCS de vacas de uma propriedade do Estado de Goiás, ao teste de Scott & Knott (n=69)

Nº de ordem da combinação de genótipos	Combinação de genótipos	Nº de animais	SCS médio
5	GGCCGC	1	5,3 ^a
6	GGCCGG	1	5,0 ^a
4	GATCGG	1	3,9 ^b
7	GGTCGC	1	3,7 ^b
9	GGTTGG	10	3,5 ^b
3	GATCGC	25	2,72 ^c
2	AACCCC	21	2,39 ^c
8	GACCGC	7	2,57 ^c
1	GGTCGG	2	2,5 ^c

* Escores médios seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (P < 0,05)

O conhecimento da variabilidade fenotípica, resultado da ação conjunta dos efeitos genéticos e ambientais, é de grande importância para as estimativas de herdabilidade.

Na Tabela 6 estão distribuídos os dados relativos às estimativas de herdabilidade média para SCS entre os genótipos combinados e as variâncias médias fenotípica, ambiental e genotípica. Observa-se, que SCS possui uma alta herdabilidade (62,34%) quando associado aos genótipos combinados selecionados, indicando que grande parte das variações observadas nesta população, é de origem genética ($V_g=0,27$).

TABELA 6 – Estimativas médias de herdabilidade e variâncias fenotípica, ambiental e genotípica para os genótipos identificados de vacas de uma propriedade do Estado de Goiás

Escore de células somáticas (SCS)				
	H ²	V _f	V _a	V _g
Genótipos	62,34%	0,44	0,17	0,27

* H² - Herdabilidade média; V_f – variância fenotípica média; V_a – variância ambiental média; V_g – variância genotípica média.

Estes dados diferem dos obtidos por ANDRADE et al. (2007) os quais encontraram valores para herdabilidade próximos de 20%. No entanto, os autores adotaram parâmetros zootécnicos em função da média do escore de células

somáticas, como a produção de leite aos 305 dias de lactação. Isto indica que na população alvo do presente estudo, os parâmetros genéticos são mais adequados do que parâmetros zootécnicos para seleção de animais com SCS inferiores mesmo considerando as interferências ambientais.

Diante da importância da mastite bovina para a cadeia produtiva do leite e, principalmente, das ações do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite - relativas aos requisitos de regulamentação, identidade e qualidade do leite cru - dos resultados obtidos frente à discriminação alélica, pode-se afirmar que os genótipos representados pelos numerais 2 (média de SCS=2,39), 1 (média de SCS=2,50) e 8 (média de SCS=2,57) são os mais indicados para uma seleção assistida por marcadores moleculares. Ainda assim, não é prudente dissociar as características fenotípicas, resultados da ação conjunta dos efeitos genéticos e ambientais determinando variabilidade no perfil zootécnico dos rebanhos.

6 CONCLUSÕES

- Na propriedade onde foi desenvolvido o estudo, há maior frequência do DNA de microrganismos Gram negativos em amostras de leite individual de vacas, destacando-se a presença de *Klebsiella oxytoca*;
- O gene codificador do *TLR4* é polimórfico em vacas da raça holandesa;
- Animais identificados com os genótipos AACCCC, GGTCGG e GACCGC são os mais indicados para seleção assistida por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

1. ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, Borstel, [online], v. 7: p. 167–202, 2001. Disponível em: <http://ini.sagepub.com/cgi/reprint/7/3/167> Acesso em 19 jul. 2010.
2. ALLUWAIMI, A. M.; CULLOR, J. S. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactating period. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, [online], v. 49, n. 2, p. 105-110, 2002. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118955270/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>. Acesso em: 12 mar. 2010.
3. ALVES, M. P.; NOVAIS, C. M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v. 33, p. 10-13, jul/dez, 2004. Disponível em: www.biotecnologia.com.br. Acesso em: 20 jun. 2009.
4. AMARAL, L. A. Aspectos Epidemiológicos da Mastite Bovina. In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ, UNESP, 1999. 186p.
5. ANDRADE, L. M.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; ALBUQUERQUE, L. G.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Efeitos genéticos e de ambiente sobre a produção de leite e a contagem de células somáticas em vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, [online], v. 36, n. 2, p. 343-349, mar./apr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36n2/10.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2010.
6. ANDRADE, M.; MESQUITA, A.; DIAS FILHO, F.; JAYME, V. S. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do Estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção do leite. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, [online], v. 28, n. 1, p. 29-42, 1998. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/2980/3026>. Acesso em: 11 out. 2009.
7. ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGER, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, [online], v.38, n.8, p. 2250-2255, 2008. Disponível em: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2757375>. Acesso em: 10 jun. 2010.

8. 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**, Washington, [online], v. 11, n. 3, p. 463-472, may. 2004. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 17 fev. 2010.
9. BORTOLATTO, J. **Toll-like receptor 4 (TLR4) na modulação da imunidade tipo 2** [online]. 2008. 113f. Tese (Doutorado em Imunologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-18112008-172851/>. Acesso em: 20 out. 2009.
10. BOULANGER, D.; BUREAU, F.; MELOTTE, D.; MAINIL, J.; LEKEUX, P. Increased nuclear factor kB activity in milk cells of mastitis-affected cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 86, p.1259-1267, 2003. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/86/4/1259>. Acesso em: 22 mai. 2010.
11. BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, [online], v. 164, n. 2, p. 116-128, sep. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359466>. Acesso em 12 set. 2009.
12. BRADLEY, A. J.; LEACH, K. A.; BREEN, J. E.; GREEN, L. E.; GREEN, M. J. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. **Veterinary Record**, London, [online], v. 160, n. 8, p. 253-257, feb. 2007. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 11 mai. 2010.
13. BRAMLEY, A. J.; CULLOR, L. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. S.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.
14. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set 2002. Seção 1, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção I.

15. BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; SOARES, N. E.; LIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, [online], v. 35, n. 4, p. 848-854, jul/ago. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a16v35n4.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2010.
16. BURCHILL, M. A.; GOETZ, C. A.; PRLIC, M.; O'NEIL, J. J.; HARMON, I. R.; BENSINGER, S. J.; TURKA, L. A.; BRENNAN, P.; JAMESON, S. C.; FARRAR, M. A. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, [online], v. 171, p. 5853-5864, 2003. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/171/11/5853>. Acesso em: 23 abr. 2010.
17. BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, Les Ulis, [online], v. 34, n. 5, p. 521-564. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556694>. Acesso em: 14 fev. 2010.
18. CAETANO, A. R. Marcadores SNP: Conceitos básicos, aplicações no manejo, melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, [online], v. 38, p. 64-71, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1516-35982009001300008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jan. 2010.
19. CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. rev. Viçosa: UFV, 2001. 390p.
20. CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.
21. DAMEREAU, B. Biological activities of complement-derived peptides. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, Berlin, v. 108, p.151-206, 1987.
22. DE WIT, J. N.; VAN HOOYDONK, A. C. M. Structure, functions, and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 50, p. 227-244, 1996.
23. DUARTE, C. A. B. **Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em tempo real**. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

24. EITENMILLER, R. R.; FRIEND, B. A.; SHAHANI, K. M. Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme 1. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 59, n. 5, p. 834-839, may. 1976. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.**. Acesso em: 11 jun. 2010.
25. ERB, H. N., SMITH, R. D., HILLMAN, R. B., POWERS, P. A., SMITH, M. C., WHITE, M. E., PEARSON, E. G. L. Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during 15- day, 21-day, and 30-day interval. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 333-335, 1984.
26. ERSKINE, R. J.; TYLER, J. W.; RIDDELL, M. G.; JR.; WILSON, R. C. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, [online], v. 198, p. 980-984, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032924>. Acesso em: 17 set. 2009.
27. FERGUSON, J. D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 90, p. 5798-5813, 2007. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/90/12/5798>. Acesso em: 23 jun. 2010.
28. FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 2. **International Dairy Journal**, Barking, [online], v. 16, n. 6, p. 517-532, jun. 2006. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleURL&_udi=B6T7C4J9X2TD2&_user=686368&_coverDate=06%2F30%2F2006&rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=199564538&_rerunOrigin=google&_acct=C000037519&_version=1&_urlVersion=0&userid=686368&md5=1e6002b100008aef98cc380311beb8b0. Acesso em: 10 jun. 2010.
29. GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 36, p.12-16, 1995.
30. GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *S. aureus*, *S. uberis* and *S. agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, [online], v. 88, p. 3510-3518, 2005. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/88/10/3510>. Acesso em: 20 jul. 2009.
31. HALASA, T., HUIJPS, K., OSTERAS, O., HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 29, n. 1, p.18-31, 2007.

32. HAN, S. H.; KIM, J. H.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M.; NAHM M. H. *Pneumococcal* lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as *Staphylococcal* LTA in stimulating Toll-like Receptor 2. **Infection Immunity**, Washington, [online], v. 71, p. 5541-5548, 2003. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/content/full/71/10/5541>. Acesso em: 20 fev. 2010.
33. International Dairy Federation (IDF) 141C – **Determination of milkfat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussels, Belgium, 2000. 15p.
34. INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/>. Acesso em: 01 mai. 2010.
35. JANN, O.C.; KING, A.; CORRALES, N. L.; ANDERSON, S. I.; JENSEN, K.; AIT-ALI, T.; TANG, H.; WU, C.; COCKETT, N. E.; ARCHIBALD, A. L.; GLASS, E. J. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. **BMC Genomics**, London, [online], v. 10, n. 1, p. 216, 2009. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 12 mar. 2010.
36. HARDING, F. **Compositional quality: milk quality**. Glasgow: Blackie Academic Professional, 1995. 165p.
37. HOE, F.G.H., SORIANO, S. O que um técnico deve conhecer sobre a prevenção de mastite. In: MESQUITA, A. J.; DURR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006, p. 107-118.
38. KOIVULA, M.; PITKALA, A.; PYORALA, S.; MANTYSAARI, E. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Copenhagen, [online], v. 57, n. 2, p. 89-96, 2007. Disponível em: <http://www.informaworld.com/smpp/34614035195411216/content~db=all~content=a787569634~frm=abslink>. Acesso em: 05 jun. 2010.
39. KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The costs of clinical mastitis in UK dairy herds. **Cattle Practice**, Gloucestershire, [online], v. 8, p. 323-327, 2000. Disponível em: <http://www.reading.ac.uk/AcaDepts/aa/DAISY/DAISY1/mastitiscost.htm>. Acesso em: 13 mai. 2010.
40. LEGRAND, D.; VANBERKEL, P. H. C.; SALMON, V.; VANVEEN, H. A.; SLOMIANNY, M. C.; NUIJENS, J. H.; SPIK, G. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic cells **Biochemical Journal**, Great Britain, [online] v. 327, p.841-846, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1218865/pdf/9581564.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2010.

41. LEGRAND, D.; ELASS, E.; CARPENTIER, M.; MAZURIER, J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, [online], v. 84, n. 3, p. 282-290, jun. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936798>. Acesso em: 02 jun. 2010.
42. LEGRAND, D.; PIERCE, A.; ELASS, E.; CARPENTIER, M.; MARILLER, C.; MAZURIER, J. Lactoferrin structure and functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, [online], v. 606, p. 163-194, 2008. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 04 jun. 2010.
43. LIEN, E.; INGALLS, R. R. Toll-like receptors. **Critical Care Medicine**, Baltimore, [online], v. 30, n. 1, p.1-11, 2002. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 12 ago. 2009.
44. MARGATHO, L. F. F.; HIPÓLITO, M.; KANETO, C.; Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, v. 9, p. 5-35, 1998.
45. MCGUIGAN, F. E. A.; RALSTON, S. H. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. **Psychiatric Genetics**, London, v. 12, n. 3, p. 133-136, sep. 2002.
46. MCGUIRE, K.; JONES, M.; WERLING, D.; WILLIAMS, J. L.; GLASS, E. J.; JANN, O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. **Animal Genetics**, Oxford, [online], v. 37, p. 47-50, 2006. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118596140/htmlstart>. Acesso em: 13 ago. 2009.
47. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, Hawthorne, [online], v. 388, n. 6640, p. 394-397, jul. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237759>. Acesso em: 11 fev. 2010.
48. MOLENAAR, A. J.; KUYS, Y. M.; DAVIS, S. R.; WILKINS, R. J.; MEAD, P. E.; TWEEDIE, J. W. Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 79, n. 7, p. 1198-1208, jul.1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872714>. Acesso em: 17 jun. 2010.
49. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 51, n. 1, p.263-273, 1986.

50. NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison: National Mastitis Council, Inc., 1999. 222p.
51. NETEA, M. G.; VAN DER GRAAF, C.; VONK, A.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULBERG, B. J. The role of Toll-like receptors (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, [online], v. 185, n. 10, p. 1483-1489, may. 2002. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 20 ago. 2009.
52. NICLAS, J.; MATS, K.; CHRISTIAN, G. G.; JONAS, H. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, [online], v. 60, p. 255-261, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036762>. Acesso em: 24 out. 2009.
53. O'NEIL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, London, [online], v. 7, n. 5, p. 353-364, may. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457343>. Acesso em: 13 mai. 2010.
54. O'SUILLEABHAIN, C. B.; KIM, S.; RODRICK, M. R.; MANNICK, J. A.; LEDERER, J. A. Injury induces alterations in T-cell NFkappaB and AP-1 activation. **Shock**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 432-437, 2001.
55. 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**, London, [online], v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/sciece/article/B6WJT4KJ5T391/2/fde44175fd74e54c73f9239e04c25129>. Acesso em: 04 abr. 10.
56. PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, Les Ulis, [online], v. 34, n. 5, p. 597-627, sep-oct. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556697>. Acesso em: 30 jan. 2010.
57. PAESANO, R.; PIETROPAOLI, M.; GESSANI, S.; VALENTI, P. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. **Biochimie**, Paris, [online], v. 91, n. 1, p. 44-51, jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601971>. Acesso em: 20 jun. 2010.

58. PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; PARK, J. Y.; MOON, J. S.; KIM, S. H.; KWON, N. H.; AHN, J. S.; DAVIS, W. C.; DAVIES, C. J. Characterization of lymphocytes subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, [online], v. 5, n.1, p. 29-39, mar. 2004. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 12 fev. 2010.
59. PAWLIK, A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. **Animal Science Papers and Reports**, Jastrzębiec, [online], v. 27, n. 4, p. 263-271, 2009. Disponível em: <http://www.ighz.edu.pl/files/objects/2805/64/str263-272.pdf>. Acesso em 15 jun. 2010.
60. PHILPOT, W.N. Economics of mastitis control. Symposium on mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 233-245, 1984.
61. PHILPOT, N. W.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.
62. RAINARD, P.; RIOLLET, C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, [online], v. 43, n. 5, p. 439-457, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005373>. Acesso em: 15 mar. 2010.
63. REITER, B. Lactoperoxidase system of bovine milk. In: PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. **The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance**. Immunology series. v. 27. New York: Dekker, 1985. p.123-141.
64. REITER, B.; HÄRNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 9, p. 724-732, 1984.
65. R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2007. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 15 Jun. 2010.
66. RIVAS, A.L.; TADEVOSYAN, R.; QUIMBY, F. W.; COKSAYGAN, T., LEIN, D. H. Identification of subpopulation of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, [online], v. 66, n. 3, p. 165-172, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227000/>. Acesso em: 27 jan. 2010.

67. RUPP, R.; 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**, Champaign, [online], v. 82, n. 10, p. 2198-2204, 1999. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/82/10/2198>. Acesso em: 17 mar. 2010.
68. SABROE, I.; READ, R. C.; WHYTE, M. K.; DOCKRELL, D. H.; VOGAL, S. N.; DOWER, S. K. Toll-like receptors in health and disease: Complex questions remain. **Journal of Immunology**, Baltimore, [online], v. 171, n. 4, p.1630-1635, aug. 2003. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/171/4/1630>. Acesso em: 07 jul. 2009.
69. SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J. C.; MORTIMORE, B. J.; WILLEY, D. L.; HUNT, S. E.; COLE, C. G.; COGGILL, P. C.; RICE, C. M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D. R.; KWOK, P. Y.; MARDIS, E. R.; YEH, R. T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R. H.; MCPHERSON, J. D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; VAN ETEN, W. J.; REICH, D.; HIGGINS, J.; DALY, M. J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGE-THOMANN, N.; ZODY, M. C.; LINTON, L.; LANDER, E. S.; ALTSHULER, D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, Hawthorne, [online], v. 409, n. 6822, p. 928–933, fev. 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v409/n6822/full/409928a0.html>. Acesso em: 08 jan. 2010.
70. SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.
71. SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. NC, USA, 2001.943p.
72. SCHUKKEN, Y. H.; LESLIE, K. E.; WEERSINK, A. J.; MARTIN, S. W. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program. 1 – Impact on somatic cell counts and milk quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 75, n.12, p. 3352-3358, 1992. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/75/12/3352.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2009.
73. SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, Cambridge, v. 46, n. 5, p. 705-716, aug.1986.
74. SHARMA, B. S.; LEYVA I.; SCHENKEL F.; KARROW, N. A. Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein Bulls. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 89, p. 3626-3635, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899698>. Acesso em: 12 set. 2009.

75. SHIN, K.; HAYASAWA, H.; LÖNNERDAL, B. Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by the lactoperoxidase - hydrogen peroxidethiocyanate antimicrobial system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, [online], v. 90, n. 4, p. 489-493, apr. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309058>. Acesso em: 15 mai. 2010.
76. SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: bovine immunology. Immunology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/80/8/1851.pdf>. Acesso em 08 ago. 2009.
77. SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, [online], v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/x011v66387275267/>. Acesso em: 13 fev. 2010.
78. STEIN, B. N.; GAMBLE, J. R.; PITSON, S. M.; VADAS, M. A.; KHEW-GOODALL, Y. Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil transmigration: potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation. **Journal of Immunology**, Baltimore, [online], v. 171, p. 6097-6104, 2003. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/171/11/6097>. Acesso em 15 abr. 2010.
79. STRINDHALL, J.; LINDGREN, P.E.; LÖFGREN, S.; KIHLESTRÖM, E. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human endothelial cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, [online], v. 67, n. 1, p. 57-62, 2005. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118697608/abstract>. Acesso em: 13 fev. 2010.
80. SUFFREDINI, A. F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J. J.; O'GRADY, N. P. New insights into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, New York, [online], v. 19, p. 203-214, 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/m22182w4051670t/>. Acesso em: 12 abr. 2010.
81. SUZUKI, Y. A.; LOPEZ, V.; LÖNNERDAL, B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, [online], v. 62, n. 22, p. 2560-2575, nov. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261254>. Acesso em: 08 jun. 2010.
82. SYVANEN, A. C. Assessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, [online], v. 2, p. 930-942, dez. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733746>. Acesso em: 28 jun. 2009.

83. TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, [online], v. 16, p. 3-9, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751757>. Acesso em: 17 mar. 2010.
84. TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, [online], v. 21, p. 335-376, apr. 2003. Disponível em: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>. Acesso em: 18 out. 2009.
85. TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M. T.; PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 92, p. 2610-2617, 2009. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/92/6/2610>. Acesso em: 09 jun. 2010.
86. TENG, C. T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, [online], v. 80, n. 1, p. 7-16, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908645>. Acesso em: 11 jun. 2010.
87. TODHUNTER D.A., SMITH K.L., SCHOENBERGER P.S. In vitro growth of mastitis-associated *streptococci* in bovine mammary secretions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 68, p. 2337-2346, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905891>. Acesso em: 12 ago. 2009.
88. VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR, M. G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.;

YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHAR, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, Philadelphia, [online], v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, fev. 2001. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/citmgr?gca=nsci291/5507/1304>. Acesso em: 12 jan. 2010.

89. VIDAL, O.; NOGUERA, J. L.; AMILLS, M.; VARONA, L.; GIL, M.; JIMENEZ, N.; DAVALOS, G.; FOLCH, J. M.; SANCHEZ, A. Identification of carcass and meat quality quantitative trait loci in a Landrace pig population selected for growth and leanness. **Journal of Animal Science**, Champaign, [online], v. 83, p. 293-300, 2005. Disponível em: <http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/83/2/293>. Acesso em: 20 jun. 2010.

90. WANG, X.; XU, S.; GAO, X.; REN, H.; CHEN, J. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. **Journal of Genetics and Genomics**, China, [online], v. 34, p. 406-412, 2007. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL &_udi= B8H15-4NX9CBV4&_user=686368&_coverDate=05%2F31%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1393963553&_rerunOrigin=google&_acct=C000037519&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686368&md5=a8327dd12695d55c73c25be8e8d968f4](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8H15-4NX9CBV4&_user=686368&_coverDate=05%2F31%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1393963553&_rerunOrigin=google&_acct=C000037519&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686368&md5=a8327dd12695d55c73c25be8e8d968f4)
Acesso em: 08 nov. 2009.
91. WHITE, S. K.; TAYLOR, K. H.; ABBEY, C. A.; GILL, C. A.; WOMACK, J. E. Halotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, [online], v. 100, n. 18, p.10364-10369, sep. 2003. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 24 jan. 2010.
92. WHFF. World Holstein Friesian Federation. Disponível em: <http://www.whff.info/>. Acesso em: 01 mai. 2010.
93. WIGGANS, G. R., SHOOK, G. E. A Lactation measure of somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 70, p. 2666-2672, 1987. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/70/12/2666>. Acesso em: 13 jun. 2010.
94. YEH, F.C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z-H. MAO, J. X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Molecular Biology and Biotechnology Centre**, University of Alberta, Canada, [online] 1997. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh>. Acesso em 25 ago. 2010.
95. YOUNGERMAN, S. M.; SAXTON, A. M.; OLIVER, S. P; PIGHETTI G. M. Association of CXCR2 Polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, [online], v. 87, p. 2442-2448, 2004. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/87/8/2442>. Acesso em: 25 fev. 2010.
96. ZHANG, H.; ISSEKUTZ, A.C. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. **American Journal of Pathology**, Bethesda, [online], v. 160, p. 2219-2230, 2002. Disponível em: <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/160/6/2219>. Acesso em: 21 jan. 2010.