

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE *TLR4* E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA EM BÚFALAS LEITEIRAS**

Valentina Roldan Montes
Zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE *TLR4* E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA EM BÚFALAS LEITEIRAS**

Valentina Roldan Montes

Orientador: **Prof. Dr. Humberto Tonhati**

Co-orientadores: **Dr. Gregório Miguel Ferreira de Camargo**

Dr. Naudin Alejandro Hurtado Lugo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

R744e Roldan Montes, Valentina.
Estudo de polimorfismos do gene *TLR4* e suas associações com características de importância econômica em búfalas leiteiras / Valentina Roldan Montes. -- Jaboticabal, 2016
xii, 53 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Humberto Tonhati.
Banca examinadora: Henrique Nunes de Oliveira, Lenira El Faro Zadra.
Bibliografia

1. Marcadores moleculares. 2. Células somáticas. 3. Snp. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DO GENE TLR4 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA EM BUFALAS LEITEIRAS

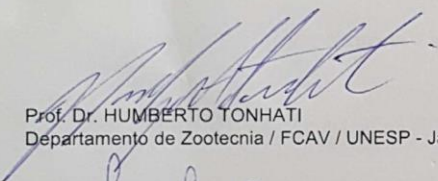
AUTORA: VALENTINA ROLDAN MONTES

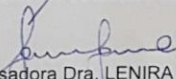
ORIENTADOR: HUMBERTO TONHATI

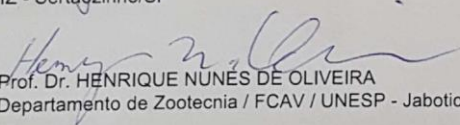
COORIENTADOR: GREGÓRIO MIGUEL FERREIRA DE CAMARGO

COORIENTADOR: NAUDIN ALEJANDRO HURTADO LUGO

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


Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA
IZ - Sertãozinho/SP


Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de outubro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VALENTINA ROLDAN MONTES - nascida em 23 de dezembro de 1988, na cidade de Cali – Colômbia, filha de Júlio Cesar Roldan Ch. e Gloria Amparo Montes T. Iniciou em fevereiro de 2008 o curso de Tecnologia em produção animal na Corporação Universitária Santa Rosa de Cabal – UNISARC obtendo o título em junho de 2013, iniciando em seguida a graduação em Zootecnia na mesma universidade e obtendo o título de Zootecnista em fevereiro de 2011. Em agosto de 2014, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação do Ministério da Educação (MEC), sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati.

“Não importa o tempo de tempestade, o sol sempre brilha novamente entre as nuvens”.

Khail Gibran

Aos meus pais Júlio César e Gloria Amparo; aos meus avos Jorge Enrique e Aura Nelly que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, vocês são minha base, meu incentivo em todas as coisas e meu grande apoio. Obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Humberto Tonhati, pela orientação, apoio e amizade em todos os momentos. Obrigada pela oportunidade.

Ao Gregório e Naudin pelos ensinamentos, sugestões, pela amizade e pela enorme disposição em sempre me ajudar.

Ao Diercles por todas as dicas, tempo, explicações, sua disposição e todo o apoio como amigo e companheiro de trabalho; para mim você foi um co-orientador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudos concedida.

Aos membros de minha banca de qualificação, Prof. Fernando e Prof. Henrique, muito obrigada pelas dicas e correções.

Às minhas amigas Ana Cristina e Alejandra pela companhia sempre que eu precisei, pelos conselhos, as ajudinhas, amizade e sobre tudo pela paciência e o amor que vocês sempre tiveram por mim. As quero muito.

Aos meus pais Júlio César e Gloria Amparo; aos meus avós Jorge Enrique e Aura Nelly Obrigada por tudo, pela compreensão, carinho, apoio, conselhos e sobre tudo o amor que vocês sempre têm por mim. Esta conquista também é de vocês!

Muito obrigada!

“Para ustedes y todos los demás que de alguna manera u otra hicieron parte de este gran logro... de corazón Muchísimas Gracias!!!”.

Sumário

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico da Bubalinocultura no Brasil	3
2.2 Mastite	3
2.3 Marcadores Moleculares	4
2.4 Família de receptores toll-Like (TLR) e suas funções no sistema imune	5
3. MATERIAL E METODOS	7
3.1 Animais	7
3.2 Análises laboratoriais	7
3.2.1 Extração de DNA.....	7
3.2.2 Desenhos dos Iniciadores.....	8
3.2.3 Reação de Amplificação de DNA por PCR	9
3.2.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	10
3.3 Análises estatísticas.....	11
3.3.1 Frequências alélicas e genotípicas.....	11
3.3.2 Desequilíbrio de ligação	12
3.3.3 Estudos de Associação	12
3.3.4 Construção de Haplótipos.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 PCR e sequenciamento.....	15
4.2 Frequências alélicas e genotípicas.....	21
4.2.2 Desequilíbrio de ligação.	22
4.2.3 Análises de associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite.	23
4.2.4 Construção de Haplótipos.....	27
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

Considerando a importância das doenças que afetam o desempenho produtivo dos animais na indústria leiteira em todo o mundo é necessário implementar ferramentas moleculares que auxiliem na identificação e controle destas doenças. Quando ocorre alguma infecção em um organismo superior, existe aumento do número de células de defesa e o sistema imune inato proporciona uma linha de defesa contra os patógenos. Os “Toll Like Receptors” (TLR) são proteínas da membrana que desempenham um papel chave na imunidade, reconhecendo patógenos e, posteriormente, ativando as respostas. O presente estudo foi realizado para identificar SNPs no gene *TLR4* bubalino e analisar suas associações com características de importância produtiva, incluindo a contagem de células somáticas (CCS). Foram utilizadas amostras de DNA de 130 búfalas da raça Murrah. A região codificante do gene *TLR4* foi amplificada através de reações de PCR e posteriormente sequenciada. Os polimorfismos encontrados tiveram suas frequências alélicas e genotípicas calculadas e verificadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, além de serem utilizados para os estudos de associação. Foram identificados 13 polimorfismos do tipo SNP para as regiões sequenciadas do gene *TLR4*, sendo que a maioria encontra-se em região codificante. Encontrou-se associação significativa, com porcentagem de gordura dos Snps g514>C/T ($P=0,0040$) e g536>A/T ($P=0,0035$). As associações para CCS demonstrou-se altamente significantes ($p<0,001$) para todos os Snps (g322>G/A, g514>C/T, g536>A/T, g8338>A/C, g8341>A/G, g8342>T/G, g8343>G/A, g8345>A/G, g8413>A/G, g8428>G/A, g8438>A/C, g8578>G/T e g8582>A/C). Sugere-se que os Snp do gene *TLR4* possam ser utilizados como marcadores moleculares em búfalos, já que foram verificadas suas associações com características como porcentagem de gordura e proteína, e contagem de células somáticas.

Palavras chave: Células Somáticas, Marcadores Moleculares, Snp.

ABSTRACT

Molecular markers might be developed to investigate genetic variants associated to the disease and assist selection process in order to identify resistant animals. When the mammary gland is infected, there is an increase in the defense cells, also called somatic cells. It is a defense line of the immune system against pathogens. The “tool like receptors” TLR are membrane proteins that have an important role in the immunity, recognizing pathogens and activating adequate responses. The present study aimed to investigate the association of TLR4 gene SNPs with productive characteristics and SCC in buffaloes. The DNA was extracted from hair follicles of 130 Murrah buffaloes. The fragments were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequenced. Thirteen SNPs were found. Allelic and genotypic frequencies were calculated as well as the adhesion to Hardy-Weinberg equilibrium and the linkage disequilibrium (r^2) and the association to the characteristic. For SCC was tested methodology linear generalized mixed model, assuming Poisson distribution. Bonferroni correction was applied for the number of SNPs. Thirteen SNP polymorphisms were identified in coding region of the TLR4 (g322>G/A, g514>C/T, g536>A/T, g8338>A/C, g8341>A/G, g8342>T/G, g8343>G/A, g8345>A/G, g8413>A/G, g8428>G/A, g8438>A/C, g8578>G/T, g8582>A/C). The SNPs g514>C/T and g536>A/T had significant association whit %G. All the SNPs were associated ($p=0.001$) whit the CCS. Other authors also reported the association of TRL4 SNPs to the trait. The results show that the SNPs of TLR4 gene can be used as molecular markers in buffaloes.

Key words: Molecular Markers, Snp, Somatic cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
CCS	Contagem de Células Somáticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
GOR%	Porcentagem de Gordura
MAP	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)
PGT	Produção de Gordura Total
PLT	Produção de Leite Total
PMOZ	Produção de Mozzarella
PPT	Produção de Proteína Total
PROT%	Porcentagem de Proteína
PRR	Pattern recognition receptor
QTL	Locus de características quantitativas (“Quantitative Trait Locus”)
R²	Desequilíbrio de ligação
SAS	Statistical Analysis Software
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TLR	Toll Like Receptors
TLR4	Gene Toll Like Receptor 4
VEE	Encefalite equina venezuelana

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.	9
Tabela 2. Estatísticas descritivas dos dados das características de produção de leite (PLT), Gordura (PGT), Proteína (PPT) e Mozzarella (PMOZZ), contagem de células somáticas (CCS), porcentagens de Gordura (%G) e Proteína (%P).	13
Tabela 3. Fragmento do gene, divergências de bases e mudança do aminoácido nas regiões específicas amplificadas do gene <i>TLR4</i> em bubalinos, quando comparada à sequência correspondente em bovino.	16
Tabela 4. Fragmento do gene, SNPs e mudanças do aminoácido identificadas nas regiões amplificadas do gene <i>TLR4</i>	19
Tabela 5. Fragmento do gene, SNPs, Número de animais analisados, frequência alélica, frequência genotípica esperada segundo o equilíbrio de H-W e valores do Qui-quadrado (χ^2) para os polimorfismos encontrados no gene <i>TLR4</i>	21
Tabela 6. Desequilíbrio de ligação (r^2) dos SNPs do gene <i>TLR4</i>	22
Tabela 7. Médias das características de produção de leite, gordura e proteína, porcentagens de gordura e proteína e contagem de células somáticas no leite, e valores nominais de P, para os SNPs (Teste de Tukey, 5%).	24
Tabela 8. Médias dos Snps associados com a característica de Porcentagem de Gordura.	25
Tabela 9. Médias dos Snps associados à característica Contagem de Células Somáticas.	26
Tabela 10. Associação das características com os haplótipos.	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Eletroforese em gel de agarose evidenciando os fragmentos amplificados por PCR. Canaleta 1= DNA marcador Ladder 100Pb. Canaletas 2 e 3= Amplicon do fragmento 1 (728Pb), Canaletas 5 e 6= Amplicon do fragmento 2 (535Pb), Canaletas 8 e 9= Amplicon do fragmento 3A (894Pb), Canaletas 11 e 12= Amplicon do fragmento 3B (758Pb) e Canaletas 14 e 15= Amplicon do fragmento 3C (877Pb) do gene *TLR4* em bubalinos.15
- Figura 2. Análise da sequência de três animais no programa CodonCode Aligner com exemplo de um SNP identificado. *A primeira sequência refere-se a um animal homozigoto CC (um pico azul), a segunda refere-se a um animal homozigoto AA (um pico verde) e a última a um animal heterozigoto CA (dois picos).20
- Figura 3. Blocos de haplótipos, correlação e frequências estimadas. *SNPs=Single Nucleotide Polymorphism. Freq= Frequências Estimadas para cada Haplótipo.27

1. INTRODUÇÃO

A maior parte da população bubalina localiza-se na Índia, no entanto, esta espécie também está presente em diferentes partes do mundo, como o Brasil, Itália, Egito, entre outros, sendo utilizada para trabalho, produção de leite e carne. Nos países ocidentais observa-se maior interesse na sua exploração para a produção de leite, especialmente queijos especiais como a “mozzarella”. A composição físico-química do leite bubalino permite uma produção mais eficiente de produtos lácteos com qualidade excepcional, devido aos níveis mais elevados de proteína, gordura e minerais (VALLE, 1990; DUBEY et al., 1996; TONHATI et al., 1996 e PATEL e MISTRY, 1997).

De acordo com estimativas da Federação Internacional do Leite (IDF “International Dairy Federation”, 2002) a produção mundial de leite de búfala aumentou 48,52% no período entre 1992 e 2002, bem acima da taxa de crescimento observado na produção de leite de vacas, que foi cerca de 8,83%, para o mesmo período. No Brasil, a produção de leite por lactação em búfalos aumentou significativamente nas últimas décadas. Sesana et al. (2014) observaram médias de produção de leite por lactação de 1789 ± 686 kg, nos rebanhos participantes no controle leiteiro do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP- Jaboticabal, SP.

A mastite é uma doença comum em gado leiteiro em todo o mundo (BEDOLLA, 2004), caracterizada por várias alterações na integridade física ou química da glândula mamária, devido à invasão de agentes patogênicos ou eventos traumáticos (BEDOLLA, 2012), que resulta em redução do desempenho produtivo dos rebanhos. Na ocorrência da mastite, agentes patogênicos invasores disparam o sistema de defesa imunológica no úbere, que levam ao aumento do número de células somáticas no leite. Desta forma, a contagem de células somáticas (CCS) é utilizada como uma ferramenta para monitorar o *status* da mastite no rebanho (EMANUELSON, 1989). Na espécie bubalina são descritos valores entre 11000 e 25000 células/ml (CERON-MUÑOZ et al., 2002) em animais sadios, que é um valor relativamente baixo em relação ao bovino.

Os receptores *toll-like* (TLR) são uma família de proteínas da membrana que desempenham um papel fundamental na imunidade inata, reconhecendo patógenos e, posteriormente, ativando as respostas imunes adequadas (RUIZ et al., 2011). O

TLR4 foi o primeiro membro da família toll identificado e caracterizado em mamíferos (BEUTLER, 2000). Este gene reconhece principalmente lipopolissacarídeos e estruturas similares como os ácidos lipoteicóicos, que são componentes das paredes celulares de bactérias gram positivas e gram negativas. Desta forma o *TLR4* identifica endotoxinas de infecções causadas por bactérias gram negativas e induz a produção de citocinas inflamatórias da resposta imune inata, que contribuem com a destruição tecidual (MIYASAKI, 1991; TAKEDA, et al., 2003).

Queiroz de Mesquita et al. (2012), encontraram associação significativa entre CCS e haplótipos formados por SNPs detectados no gene *TLR4* em população de bovinos da raça Holandesa, sugerindo que este gene seja um potencial candidato para melhorar a qualidade do leite através de seleção assistida por marcadores.

Diferentes doenças em bovinos tem demonstrado associação com o gene *TLR4* e sua relação com o sistema imune. A utilização de ferramentas moleculares pode auxiliar na identificação de doenças como a mastite, além de identificar animais superiores geneticamente. Diante do exposto, o presente estudo teve o objetivo de verificar a existência de polimorfismos no gene *TLR4* em uma população bubalina e posteriormente, avaliar suas associações com a contagem de células somáticas no leite de bubalinos e outras características de importância econômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Bubalinocultura no Brasil

Há pouco mais de cem anos os búfalos foram introduzidos no Brasil, provenientes do continente europeu (Itália) e asiático (Índia). As importações italianas foram responsáveis pela introdução da raça Mediterrânea, que forma a base da população de búfalos no Brasil. Posteriormente, já no início da década de 60, foram introduzidos animais das raças Murrah e Jafarabadi, tendo como foco, além da região Norte, a região Sudeste (MARQUEZ, 2000).

A expansão da exploração de bubalinos com aptidão leiteira no Brasil teve início a partir da década de 90, tendo um crescimento estimado de 15% em 2009 (ABCB, 2011). Nas regiões onde existem laticínios especializados na captação do leite de búfalas, é cada vez maior o número de produtores, que passam a se dedicar à exploração leiteira bubalina, com a qual tem obtido produção individual de queijos superior, comparado com a produção obtida com bovinos, mesmo com rebanhos ainda pouco selecionados (BERNARDES, 2007). No Brasil o maior produtor de leite de búfala é o estado de São Paulo (27%), sendo a região sudeste o maior mercado de derivados de leite de búfalo, principalmente do queijo mozzarella, devido às proximidades com os maiores centros urbanos do país (TONHATI et al., 2012).

2.2 Mastite

A produtividade leiteira de um rebanho depende de diversos fatores, dentre eles, que os animais sejam saudáveis e produzam leite em quantidade e qualidade adequadas. No entanto, tanto a produção quanto a qualidade do leite podem ser afetadas de forma significativa pela mastite. A mastite é uma doença que se caracteriza por várias alterações na integridade física ou química da glândula mamária, tendo origem bacteriana, fúngica, podendo ainda ser causada por algas ou leveduras. Esta é uma das doenças mais comuns afetando a indústria leiteira em todo o mundo e que pode ser classificada como clínica ou subclínica. Quando ocorre mastite clínica é observada vermelhidão no úbere, o leite pode apresentar sangue com pus coagulado e em alguns casos os animais apresentam um aumento da temperatura retal e perda de apetite (BEDOLLA, 2004). Por outro lado, a mastite subclínica é identificada pela presença de microrganismos, em combinação com

uma alta contagem de células somáticas no leite (TOLLERSRUD et al., 2000; BEDOLLA, 2004). Os casos de mastite clínica nos rebanhos geralmente são constantes, no entanto as maiores perdas de leite são ocasionadas pela mastite subclínica já que esta persiste por mais tempo e afeta a produção.

Os patógenos causadores da mastite podem ser classificados como agentes infecciosos ou ambientais, com base na sua associação epidemiológica e sua facilidade para causar a infecção persistente ou transitória, respectivamente (BRADLEY e GREEN, 2001; RIFFON et al., 2001; ROSSITTO et al., 2002; BEDOLLA CASTAÑEDA, 2003). Os principais patógenos são, geralmente, causadores de mastite clínica ou fortes respostas inflamatórias e compreendem a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (uberis, agalactiae, dysgalactiae)* e coliformes (ARIZNABARRETA et al., 2002). Tais microrganismos invadem a glândula mamária e iniciam o processo inflamatório podendo provocar o aumento do número de células de defesa do organismo entre elas as células somáticas (CS), tais como os leucócitos (glóbulos brancos do sangue) e células epiteliais provenientes da esfoliação do úbere, cisterna mamária e cisterna do teto e são eliminadas no leite durante o curso normal da lactação (GALIERO & MORENA, 2000).

2.3 Marcadores Moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular procedente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA que atenda as probabilidades mendelianas de segregação em uma população (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). De acordo com Milach (1998), marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Desta forma, o uso dos marcadores moleculares busca identificar associação entre *loci* e fenótipos de interesse produtivo, de modo a auxiliar na seleção de indivíduos portadores de genótipos desejáveis e no direcionamento de acasalamentos, para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento. Na pecuária, a utilização de marcadores possibilita à seleção de progenitores com o método que recebe o nome de Seleção Assistida por Marcadores (MAS, "Marker assisted selection"), além da caracterização populacional, da identificação de regiões gênicas com variantes deletérias ou associadas a

enfermidades e teste de paternidade e rastreamento de produtos de origem animal. (CARDOSO, 2012).

Uma estratégia bastante utilizada para identificar marcadores moleculares relevantes para fenótipos de importância econômica e que possam ser utilizados na MAS, baseia-se em estudos de associação entre os fenótipos e polimorfismos em genes candidatos. Os genes considerados candidatos são aqueles que codificam um produto de ação biológica conhecida e relacionado ao desenvolvimento e desempenho da característica objeto de estudo. A aplicação desta estratégia em populações bubalinas, já revelou marcadores associados à porcentagem de gordura, proteína e CCS no leite no gene DGAT1 (CARDOSO et al., 2015, FREITAS et al., 2016); porcentagem de proteína no gene do receptor de melatonina MTRN1A (ZETOUNI et al., 2014).

2.4 Família de receptores toll-Like (TLR) e suas funções no sistema imune

Quando a infecção ocorre no mamífero o sistema imune inato proporciona uma linha de defesa contra os patógenos. Dentro desta linha de defesa, os receptores toll-like (TLR) desempenham um papel essencial, uma vez que são importantes componentes do sistema receptor de reconhecimento padrão (PRR, “Pattern recognition receptor”). Estes componentes detectam estruturas moleculares chamadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de organismos invasores (LEMAITRE et al., 1996), provocando a liberação de citosinas inflamatórias (MEDZHITOV, 2007).

O entendimento da estrutura básica e da organização dos TLR, assim como a constituição nucleotídica de seus genes é essencial para conhecer a base do sistema imune inato de uma espécie (DUBEY et al, 2012). Por enquanto, há um total de 13 TLRs descritos na literatura, sendo que existem 10 genes caracterizados na maioria dos mamíferos (ROCK et al., 1998; CHUANG et al, 2000; TEMPERLEY et al. 2008). O reconhecimento de TLRs nas espécies mamíferas é realizado de acordo com a sua localização e características únicas ao nível celular. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana celular, enquanto os TLR 3, 7, 8 e 9 podem ser encontrados no citoplasma. Os TLRs 3, 7, 8 e 9 são associados com o reconhecimento de constituintes microbiais e virais enquanto os TLRs 1, 2, 4, 5, e 6

são associados com reconhecimento de constituintes de bactérias (HASSAN et al., 2005).

Os genes *TLR2* e *TLR4* são fortemente expressos durante a mastite causada por *Staphylococcus aureus* (GOLDAMMER et al., 2004). O *TLR4* foi o primeiro membro da família toll que foi identificado e caracterizado em mamíferos (BEUTLER, 2000). Existem estudos do gene *TLR4* e suas associações com doenças infecciosas em diferentes animais domésticos como *cobaias* (KUMO et al., 2009) e coelhos (ASTAKHOVA et al., 2009). Pesquisas envolvendo a família TLR e suas funções fundamentais nos sistemas imunológicos de mamíferos demonstraram associações com doenças como encefalite equina Venezuelana (SHARMA et al., 2009), susceptibilidade à mastite clínica em gado leiteiro (JANN et al., 2009).

Dois polimorfismos detectados no gene *TLR4*, sendo um deles uma mutação na região 5'UTR e o segundo uma mutação não sinônimo no éxon 3, foram associados à contagem de células somáticas, persistência da lactação e à susceptibilidade à infecções por *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) em vacas da raça Holandesa criadas no Canadá (SHARMA et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

As informações fenotípicas e o material biológico utilizados nesse estudo são referentes a animais da raça Murrah, pertencentes à Fazenda Tapuio, na cidade de Taipú – RN. Esta fazenda faz parte do programa de controle leiteiro de bubalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da UNESP/Jaboticabal, SP e mantém um Sistema de Pastoreio Rotacional Voisin. O rebanho atual conta com aproximadamente 688 matrizes, com média de produção de leite em torno de $2042,11 \pm 681,76$ Kg em até 270 dias da lactação. Periodicamente há realização do controle leiteiro e colheita de amostras para determinação do conteúdo de gordura e proteína e contagem de células somáticas, assim como, do material biológico para extração de DNA.

3.2 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP / Jaboticabal – SP.

3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos animais foi extraído a partir de pêlos da vassoura da cauda de 120 búfalas da raça Murrah. A extração de DNA foi realizada a partir da metodologia adaptada de Lima (2003). Aproximadamente 40 folículos de cada animal foram depositados em tubos de microcentrífuga (um tubo para cada animal), nos quais foram adicionados 500µL de solução TE-TWEEN (Tris 50 mm, EDTA 1 mm, 0,5% Tween 20), seguido de incubação em banho a 65°C por uma hora e meia, com agitações periódicas. Após esse período, foram acrescentados 2µL de proteinase K em cada tubo (600µg/µL), e as amostras foram incubadas a 55°C, por 6 horas, com agitação periódica, e incubação novamente a 37°C por uma noite.

Após esses procedimentos, foi adicionado 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio- Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra, seguido de agitação vigorosa dos tubos por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, foi realizada nova centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 23°C e o sobrenadante

foi transferido para novo tubo. Foi então realizada a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 µL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1ml). Logo, as amostras foram homogeneizadas por inversão, os tubos foram colocados no freezer -20°C por uma hora e em sequência, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 25 minutos, a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA restante foi seco a temperatura ambiente e armazenado em 100µL de TE (10:1).

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas através de espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Termo Cientific, EUA, 2008) para verificação da quantidade e qualidade do material obtido. Foram esperadas concentrações mínimas de 100 ng/µL e valores entre 1,8 e 2,0 para relação da absorbância A260/A280. Relações inferiores a estes valores sugerem contaminação com proteínas, fenol ou outros contaminantes que tenham pico de absorbância de 280 nm (LEHNINGER et al., 2004). Quando as amostras atenderam aos parâmetros de qualidade e quantidade, a solução estoque foi diluída à 70 ng/µL para solução uso. Ambas foram congeladas em freezer a -20°C.

3.2.2 Desenhos dos Iniciadores

Os iniciadores (“primers”) utilizados neste estudo foram desenhados com base na sequência relativa ao *Bos taurus* depositada no GenBank, sob código de acesso AC_000165.1. A qualidade dos pares de primers foi verificada, antes de sua solicitação, com auxílio da ferramenta oligoanalyzer da Idt Technology (disponível em: <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>>), sendo que se atentou pela escolha de primers com baixa probabilidade de emparelhamento entre os pares de bases de sua própria sequência (harpin), entre sequências de primers homólogos (self-dimer) ou entre os pares de bases das sequências do primer forward e reverse (hetero-dimer).

O gene *TLR4* é constituído de 3 éxons, sendo que os éxons 1 e 3 incluem as regiões 5'UTR e 3'UTR, respectivamente, além de regiões codificantes. Desta forma foi necessária a confecção de iniciadores (“primers”) que abrangessem todos os éxons para o sequenciamento de toda a região codificante deste gene. Pares de primers foram desenhados sobre regiões gênicas não codificantes, adjacentes aos éxons 1 e 2 para que estes pudessem ser amplificados através de reações de PCR.

Devido à longa extensão do éxon 3 (2986pb), foram necessários mais de um par de primers, para que fosse amplificado todo o seu segmento codificante. Vale ressaltar, que a região 3'UTR que faz parte do éxon 3 não foi incluída nas regiões cobertas pelos primers, logo não será analisada neste estudo. A Tabela 1 apresenta os primers utilizados neste estudo, juntamente com as suas respectivas temperaturas de anelamento, as quais foram definidas através de reações de PCR do tipo gradiente, incluindo oito diferentes temperaturas próximas às especificações de T-melting de cada primer.

Tabela 1. Pares de iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.

Indicadores	Iniciadores	Tem (°C)	Tam. (Pb)
1	5' ACAGGGAGAAGACAGCCAT 3' 3' CAAATGAACCTAACCAG 5'	54,4°C	728
2	5' AAATGAAGGGATAAGTG 3' 3' CTGAAGAAGGGAGAT 5'	43,3°C	535
3^a	5' TTTCATTTTGGTTTCCTAT 3' 3' TTATATCTTTGTTGTCTG 5'	49°C	894
3B	5' CAAGGGTTGCTGTTCTCACA 3' 3' GGAAACTCTGATGTTC 5'	48,9°C	758
3C	5' AAGGAGCAAGAACTACA 3' 3' AAAGAAGCACATCAGGGGA 5'	52,5°C	877

Temp.= temperatura ideal de anelamento do par de primers; Tam. = Tamanho do fragmento amplificado; *O éxon 3 teve três pares de primers para que fosse possível a cobertura total de sua região codificante.

3.2.3 Reação de Amplificação de DNA por PCR

As reações de PCR, foram realizadas para volume final de 25µL, contendo 2µL de DNA genômico (140ng), 1,1µL de cada um dos iniciadores (15pM), 13µL de GoTaq Colorless Master Mix (Promega) e 7,8µL de água (nucleasse free). Os ciclos

de amplificação de segmentos genômicos através de reações de PCR seguiram a seguinte programação em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad):

- Primeiro passo: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos;
- Segundo passo: desnaturação a 95°C por 45 segundos;
- Terceiro passo: Anelamento dos pares primers de acordo com suas respectivas temperaturas de anelamento (Tabela 1) por 45 segundos;
- Quarto passo: extensão a 72°C por 1 minuto;
- Quinto passo: extensão final a 72°C por 5 minutos.

O ciclo repetiu-se do segundo ao quarto passo por 30 vezes. Após o quinto passo, as amostras foram mantidas a 4° C até a retirada do termociclador.

Para constatar o sucesso da reação de PCR, uma alíquota de 2 µl de cada produto de PCR foi diluída com 2 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) com gelred (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 90V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização dos produtos de PCR (amplicons) foi realizada em luz ultravioleta (UV), e o gel foi foto documentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analysis da Kodak.

Inicialmente, uma amostra constituída por 20 animais menos aparentados entre si, em relação ao restante da população, foi utilizada para nas reações de PCR para cada fragmento. Os amplicons dessa amostra foram então submetidos a sequenciamento para a busca por polimorfismos. Quando foram identificadas mutações não sinônimas em algum dos fragmentos analisados nesse estudo, os procedimentos de PCR e sequenciamento foram realizados para toda a população (120 animas) para que pudessem ser efetuados estudos de associação.

3.2.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os amplicons foram submetidos à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Logo após, foram sequenciados a partir de ambos iniciadores (Forward e Reverse) por meio da técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger et al. (1977) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) em serviço terceirizado pelo

laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV. Para a identificação dos polimorfismos, as sequências de DNA obtidas foram analisadas com o programa CodonCode Aligner.

3.3 Análises estatísticas

3.3.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (x_{ii}) para os polimorfismos detectados no gene *TLR4* foram estimadas para a população, através das equações 1 e 2, respectivamente:

$$[\text{Eq.1}] \quad x_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n}$$

$$[\text{Eq.2}] \quad x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo i , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para cada sítio polimórfico através do teste de Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5% ($P < 0,05$), sendo que as frequências genotípicas esperadas sob equilíbrio foram estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i , $2x_i x_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

3.3.2 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação foi estimado a partir da estatística r^2 (HILL; ROBERTSON, 1966) com uso do programa computacional Plink (PURCELL, 2007) com o objetivo de verificar quais SNPs segregavam juntos.

Considerando-se dois *loci* com dois alelos para cada *locus* (A_1/A_2 e B_1/B_2), tem-se que:

$$r^2 = \frac{D^2}{[freq(A_1) * freq(A_2) * freq(B_1) * freq(B_2)]}$$

em que:

$$D = freq(A_1 B_1) * freq(A_2 B_2) - freq(A_1 B_2) * freq(A_2 B_1)$$

3.3.3 Estudos de Associação

As características utilizadas no estudo de associação referem-se a registros de primeira lactação obtidos entre os anos 2010 e 2016 para contagem de células somáticas (CCS), produções diárias média de leite (PL), produção total de leite (PLT), produção total de gordura (PGT), proteína (PPT) e Mozzarella (PMOZZ), além das porcentagens de Gordura (%G) e Proteína (%P). A produção de mozzarella foi estimada de acordo com a fórmula proposta por Altiero et al.(1989):

$$PM(kg) = PL(Kg) \times \left[\frac{3,5(\%P) + 1,23(\%G) - 0,88}{100} \right]$$

Onde:

PM= produção de mozzarella (massa)

PL = quantidade de leite

%P = porcentagem de proteína

%G = porcentagem de gordura.

Os registros para PLT, PGT, PPT e PMOZZ foram calculados com produções truncadas aos 270 dias da lactação (TONHATI et al., 2004). A estrutura descritiva dos dados avaliados pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Estatísticas descritivas dos dados das características de produção de leite (PLT), Gordura (PGT), Proteína (PPT) e Mozzarella (PMOZZ), contagem de células somáticas (CCS), porcentagens de Gordura (%G) e Proteína (%P).

Características	Nº Observações	Média	DP	Min	Max
PLT (Kg)	116	2237,64	537,50	519,10	3670,50
PGT (Kg)	111	143,71	37,89	41,26	212,69
PPT (Kg)	112	98,93	20,88	36,52	154,03
PMOZ (Kg)	111	504,07	109,00	171,80	744,33
PL (Kg)	116	7,97	1,82	2,72	13,11
CCS (x 1000 cels/ml)	112	361	586	10	3258
%G	111	6,18	1,11	3,08	9,13
%P	112	4,27	0,27	3,67	5,18

*DP= Desvio Padrão, PLT= Produção de Leite Total, PGT= Produção de Gordura Total, PPT= Produção de Proteína Total, PMOZ= Produção de Mozzarella, PL= Produção de Leite, CCS= Contagem de Células Somáticas, %G=Porcentagem de Gordura, %P= Porcentagem de Proteína.

As medidas fenotípicas das características de importância econômica foram avaliadas por meio de um modelo misto. No caso, de se apresentar variáveis aleatórias contínuas com distribuição normal foi utilizado o procedimento MIXED do SAS. Para verificar a associação entre polimorfismos no gene *TLR4* com PL, PLT, PGT, PPT, PMOZZ, %G e %P, foram realizados análises uni-variadas com o

procedimento Proc Mixed do programa estatístico SAS/STAT 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). O seguinte modelo estatístico foi aplicado:

$$y_{ijkl} = \mu + GC_i + b_1 IV_j + b_2 IV_j^2 + M_l + T_k + e_{ijkl}$$

Em que,

Y_{ijkl} corresponde aos valores de PL, PLT, PGT, PPT, PMOZZ, %G, %P e CCS, medidos no $ijkl^{\text{ésimo}}$ animal; μ é a média de cada característica na população; GC_i é o efeito fixo do $i^{\text{ésimo}}$ grupo de contemporâneos (Ano e estação do parto); IV_j é a idade da $j^{\text{ésima}}$ vaca ao parto considerada no modelo como (co)variável linear e quadrática; M_l é o efeito fixo do $l^{\text{ésimo}}$ genótipo para cada polimorfismo detectado no gene *TLR4*; T_k é o efeito aleatório de touro e e_{ijkl} é o efeito aleatório residual associado a observação Y_{ijkl} .

No caso das medidas de CCS, que não apresentam distribuição normal, foi testado um modelo linear generalizado misto assumindo distribuição Poisson para verificar sua associação com os polimorfismos do gene *TLR4*.

Para avaliar a associação do marcador com cada característica envolvida nesse estudo foram realizadas 9 análises independentes. O limiar de significância para o valor P das análises de associação foi baseado na correção de Bonferroni ($\alpha = 0,05/N_{\text{características}}$).

3.3.4 Construção de Haplótipos

As probabilidades de haplótipos se construíram utilizando o software Haploview que é usado para analisar e visualizar padrões do desequilíbrio de ligação (BARRETT et al., 2005), utilizando o bloco por defeito reportado por (GABRIEL et al., 2002) onde a região se divide em segmentos de acordo a o LD. As associações com CCS e %G foram estimadas usando o programa estatístico SAS/STAT 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR e sequenciamento

Todos os primers confeccionados para este estudo, funcionaram satisfatoriamente na amplificação dos fragmentos específicos (Figura 1). Os comprimentos dos amplicons observados nos géis de agarose mostraram-se em conformidade com o esperado, de acordo com a contagem de pares de base tomada na sequência de referência bovina AC_000165.1.

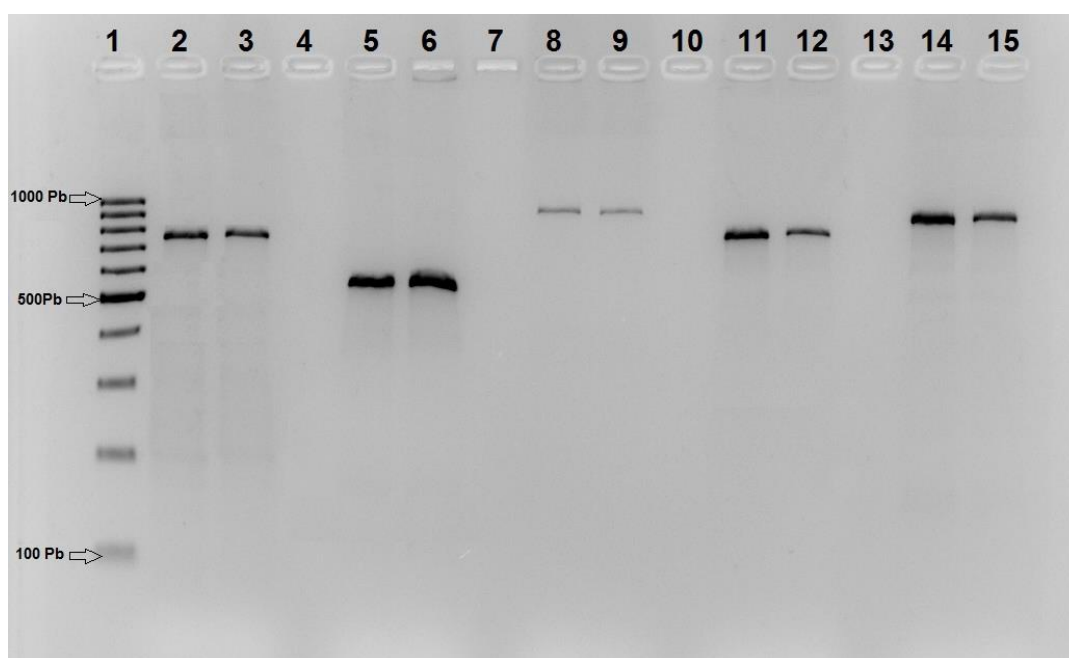


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose evidenciando os fragmentos amplificados por PCR. Canaleta 1= DNA marcador Ladder 100Pb. Canaletas 2 e 3= Amplicon do fragmento 1 (728Pb), Canaletas 5 e 6= Amplicon do fragmento 2 (535Pb), Canaletas 8 e 9= Amplicon do fragmento 3A (894Pb), Canaletas 11 e 12= Amplicon do fragmento 3B (758Pb) e Canaletas 14 e 15= Amplicon do fragmento 3C (877Pb) do gene *TLR4* em bubalinos.

O sequenciamento dos amplicons revelou que o número de pares de bases em cada fragmento era compatível com a sequência de referência bovina, de modo que não foram observadas inserções ou deleções nesta população. O alinhamento das sequências referentes às búfalas Murrah menos aparentadas contra a referência

bovina com o software CodonCode Aligner, permitiu a identificação de inúmeras divergências posicionais entre o genoma bovino e bubalino, além de polimorfismos segregando na população utilizada. A Tabela 3 apresenta as 65 divergências identificadas na amostra utilizada em relação a sequência de referência bovina. Algumas dessas divergências resultam em variações de aminoácidos para posições homólogas entre as duas espécies. Outros estudos feitos em búfalos para identificação de SNPs também descreveram divergências entre a sequência bovina e bubalina, como para o gene *DGAT1* (FREITAS, 2014).

Tabela 3. Fragmento do gene, divergências de bases e mudança do aminoácido nas regiões específicas amplificadas do gene *TLR4* em bubalinos, quando comparada à sequência correspondente em bovino.

Fragmento	Localização	Pb [#]	Divergência		Mudança do Aminoácido
	Região		Bovino	Búfalo	
1	Exon1-5'UTR	49	G	C	-
1	Exon1-5'UTR	88	G	A	-
1	Exon1-5'UTR	230	C	T	-
1	Exon1-5'UTR	245	G	C	-
1	Exon1-5'UTR	246	G	A	-
1	Exon1-5'UTR	276	G	A	-
1	Exon1-5'UTR	301	C	A	-
1	Exon1-5'UTR	370	C	A	-
1	Éxon 1 – CDS	545	T	C	Ser/arg *
1	Intron 1	571	G	T	-
2	Intron 1	4955	C	T	-
2	Intron 1	5007	C	T	-
2	Intron 1	5048	T	C	-
2	Intron 1	5053	T	G	-
2	Intron 1	5086	C	T	-
2	Intron 1	5087	A	G	-
2	Éxon 2 – CDS	5134	G	A	Gln/Gln
2	Éxon 2 – CDS	5164	C	T	Pro/Pro
2	Intron 2	5310	A	C	-
2	Intron 2	5327	T	C	-
2	Intron 2	5328	C	T	-

Fragmento	Localização	Pb [#]	Divergência		Mudança do Aminoácido
	Região		Bovino	Búfalo	
3A	Éxon 3 – CDS	8126	A	C	Gly/Gly
3A	Éxon 3 – CDS	8141	A	C	Leu/Leu
3A	Éxon 3 – CDS	8152	A	G	Gln/Arg *
3A	Éxon 3 – CDS	8183	C	A	Val/Val
3A	Éxon 3 – CDS	8192	T	C	Asn/Asn
3A	Éxon 3 – CDS	8215	A	G	Lys/Arg
3A	Éxon 3 – CDS	8217	A	G	Asn/Ala *
3A	Éxon 3 – CDS	8218	A	C	Asn/Ala *
3A	Éxon 3 – CDS	8340	T	C	Tyr/His *
3A	Éxon 3 – CDS	8485	C	T	Ser/Leu *
3A	Éxon 3 – CDS	8530	C	T	Thr/Ile *
3A	Éxon 3 – CDS	8574	C	A	Gln/Lys *
3A	Éxon 3 – CDS	8630	C	T	Phe/Phe
3A	Éxon 3 – CDS	8649	A	G	Lys/Glu *
3A	Éxon 3 – CDS	8778	A	G	Ile/val
3A	Éxon 3 – CDS	8791	T	G	Phe/Cys *
3A	Éxon 3 – CDS	8795	C	A	Asp/Glu
3B	Éxon 3 – CDS	8972	G	A	Lys/Lys
3B	Éxon 3 – CDS	9021	A	G	Met/Val *
3B	Éxon 3 – CDS	9047	G	A	Leu/Leu
3B	Éxon 3 – CDS	9146	C	G	Arg/Arg
3B	Éxon 3 – CDS	9203	A	C	Ala/Ala
3B	Éxon 3 – CDS	9248	A	G	Glu/Glu
3B	Éxon 3 – CDS	9257	C	T	Asn/Asn
3B	Éxon 3 – CDS	9300	G	T	Ala/Ser *
3B	Éxon 3 – CDS	9369	C	T	Leu/Leu
3B	Éxon 3 – CDS	9422	C	T	Ser/Ser
3B	Éxon 3 – CDS	9475	G	A	Ser/Asn *
3C	Éxon 3 – CDS	9612	G	A	Glu/Lys *
3C	Éxon 3 – CDS	9641	C	T	Asn/Asn
3C	Éxon 3 – CDS	9654	C	A	Leu/Met *
3C	Éxon 3 – CDS	9664	C	T	Thr/Met *
3C	Éxon 3 – CDS	9680	G	A	Ser/Ser
3C	Éxon 3 – CDS	9683	G	T	Val/Val
3C	Éxon 3 – CDS	9692	G	A	Val/Val
3C	Éxon 3 – CDS	9701	G	A	Val/Val
3C	Éxon 3 – CDS	9713	G	A	Gly/Gly

Fragmento	Localização	Pb [#]	Divergência		Mudança do Aminoácido
	Região		Bovino	Búfalo	
3C	Éxon 3 – CDS	9725	C	T	Tyr/Tyr
3C	Éxon 3 – CDS	9779	C	T	Gly/Gly
3C	Éxon 3 – CDS	9803	C	A	Val/Val
3C	Éxon 3 – CDS	9812	G	A	Ser/Ser
3C	Éxon 3 – CDS	9873	C	G	Pro/Ala *
3C	Éxon 3 – CDS	9890	T	C	Leu/Leu
3C	Éxon 3 – CDS	10103	C	T	Leu/Leu

[#]Posição em relação a sequência de referência bovina AC_000165.1.

*Alteração do aminoácido não conservativa. 5'UTR= Região de éxon não traduzida. CDS= Região codificante.

As substituições de nucleotídeos podem provocar mudanças nos aminoácidos classificados como conservativo (quando os dois aminoácidos pertencem ao mesmo grupo bioquímico) ou não conservativo (quando pertencem a grupos diferentes), sendo que a segunda classe de substituição pode alterar a estrutura da proteína a um maior nível (NOVO, 2012). Foram identificadas dezessete divergências entre bovinos e bubalinos resultando em substituições de aminoácidos não conservativas neste estudo, sugerindo elevada diferenciação entre a estrutura proteica entre as duas espécies. A divergência observada na posição 9422, havia sido previamente descrita como SNP (C>T) segregando em bovinos da raça Holandês por Sharma et al. (2006), nesse estudo observou-se a fixação do alelo T para este locus.

Foram identificados um total de 13 SNPs identificados nos éxons 1 e 3 do gene *TLR4* segregando na população utilizada no presente estudo (Tabela 4), sendo apenas um deles (g.322G>A) posicionado em região não codificante 5'UTR, enquanto todos os demais corresponderam a mutações não sinônimo.

Tabela 4. Fragmento do gene, SNPs e mudanças do aminoácido identificadas nas regiões amplificadas do gene *TLR4*.

Fragmento	Localização no gene		SNP	Mudança do aminoácido
	Região	Pb [#]		
1	EXON 1 - 5'UTR	322	g.322G>A	-
1	Éxon 1 – CDS	514	g.514C>T	Thr/Met *
1	Éxon 1 – CDS	536	g.536A>T	Arg/Ser *
3A	Éxon 3 – CDS	8338	g.8338A>C	Tyr/Ser *
3A	Éxon 3 – CDS	8341	g.8341A>G	Tyr/Arg *
3A	Éxon 3 – CDS	8342	g.8342T>G	Tyr/Gln *
3A	Éxon 3 – CDS	8343	g.8343G>A	Glu/Lys *
3A	Éxon 3 – CDS	8345	g.8345A>G	Glu/Lys *
3A	Éxon 3 – CDS	8413	g.8413A>G	Asp/Gly *
3A	Éxon 3 – CDS	8428	g.8428G>A	Gly/Asp *
3A	Éxon 3 – CDS	8438	g.8438A>C	Lys/Asn *
3A	Éxon 3 – CDS	8578	g.8578G>T	Arg/Ile *
3A	Éxon 3 – CDS	8582	g.8582T>C/A	Phe/Leu *

[#]Posição em relação a sequência de referência bovina AC_000165.1.

*Alteração do aminoácido não conservativa. 5'UTR= Região de éxon não traduzida. CDS= Região codificante.

A Figura 2 exemplifica o polimorfismo g.8338A>C que se refere a uma substituição A por C. Quando houve a presença de dois picos de cores diferentes no cromatograma, os indivíduos foram classificados como heterozigotos e quando os picos continham uma só cor, os indivíduos foram classificados como homozigotos.

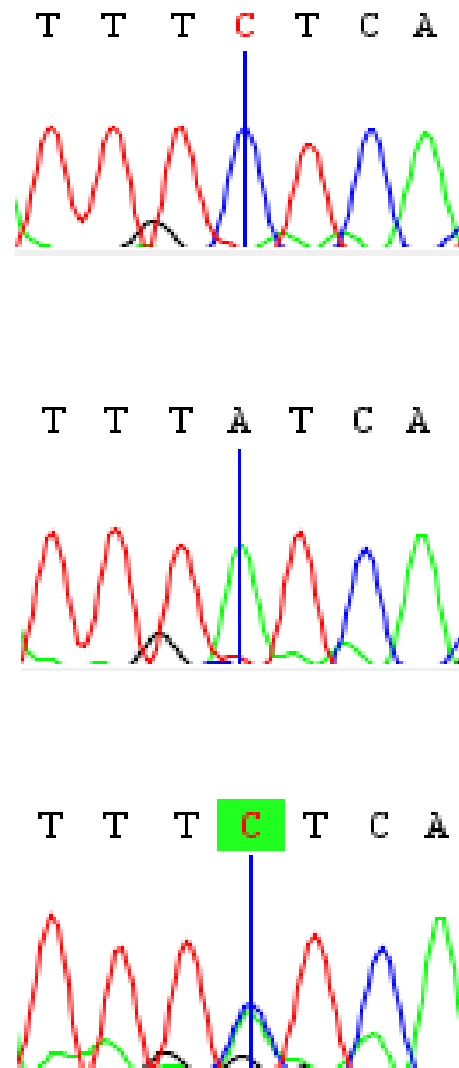


Figura 2. Análise da sequência de três animais no programa CodonCode Aligner com exemplo de um SNP identificado. *A primeira sequência refere-se a um animal homozigoto CC (um pico azul), a segunda refere-se a um animal homozigoto AA (um pico verde) e a última a um animal heterozigoto CA (dois picos).

O gene *TLR4* faz parte do complexo imune de histocompatibilidade (MHC) que permite ativação dos processos de geração da resposta imune. Segundo Pareja, (1999), em cada espécie de mamífero os diferentes loci do MHC são muito polimórficos, e possuem a maior variabilidade genética intraespecífica detectada em genética de populações. O locus possui múltiplas variáveis alélicas, o indivíduo herda um conjunto de MHC do pai e um da mãe, cada um com diferentes alelos. Assim sendo, os descendentes podem ser heterozigotos em múltiplos loci do MHC,

expressando em suas células os dois tipos de variantes alélicas nos loci. O que pode explicar a quantidade de SNPs achados dentro deste gene.

4.2 Frequências alélicas e genotípicas

Como os fragmentos do éxon 1 e 3A apresentaram mutações não sinônimas, outros 100 animais pertencentes a mesma fazenda foram genotipados para estes loci, para que fossem realizados estudos de associação. As frequências alélicas e genotípicas de cada SNP estão apresentadas na Tabela 5. A maioria dos SNPs apresentou frequência do alelo menos comum (MAF), maiores que 0,10, o que é favorável à realização das análises de associação, já que estas não serão prejudicadas pela discrepância acentuada da distribuição das frequências. A maioria dos SNPs apresentou frequências que aderem ao valor esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg verificado através do teste de Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5% ($P < 3,84$), entretanto um deles não se encontrava em equilíbrio, o que pode ser indicativo de que a população teve pressão de seleção para estes loci.

Tabela 5. Fragmento do gene, SNPs, Número de animais analisados, frequência alélica, frequência genotípica esperada segundo o equilíbrio de H-W e valores do Qui-quadrado (χ^2) para os polimorfismos encontrados no gene *TLR4*.

Fragmento	SNP	Numero de animais analisados	Frequência Alélica	Frequência Genotípica Observada	χ^2
1	g322>G/A	206	G=0,2864 A=0,7146	GG=0,0971 AG=0,3786 AA=0,5243	0,4715
1	g514>C/T	210	C=0,7048 T=0,2952	TT=0,5192 CT=0,3846 CC=0,1058	0,3585
1	g536>A/T	194	A=0,7165 T=0,2835	AA=0,1134 AT=0,3402 TT=0,5464	0,1316
3A	g8338>A/C	220	A=0,5818 C=0,4182	CC=0,3727 AC=0,4182 AA=0,2091	0,1692

Fragmento	SNP	Numero de animais analisados	Frequência Alélica	Frequência Genotípica Observada	χ^2
3A	g8341>A/G	226	A=0,9204 G=0,0797	AA=0,8496 AG=0,1416 GG=0,0088	0,5203
3A	g8342>T/G	190	T=0,4789 G=0,5211	TT=0,3474 TG=0,2632 GG=0,3895	<u>4,067</u>
3A	g8343>G/A	220	A=0,35 G=0,65	AA=0,20 AG=0,30 GG=0,50	0.0006
3A	g8345>A/G	214	A=0,3785 G=0,6215	AA=0,4299 AG=0,3832 GG=0,1869	0,0639
3A	g8413>A/G	226	A=0,5841 G=0,4159	AA=0,3540 AG=0,4602 GG=0,1858	0,5656
3A	g8428>G/A	216	A=0,5694 G=0,4306	AA=0,3611 AG=0,4167 GG=0,2222	0,1195
3A	g8438>A/C	222	A=0,6712 C=0,3288	AA=0,26 AC=0,37 CC=0,37	<u>3,382</u>
3A	g8578>G/T	188	T=0,4415 G=0,5585	TT=0,2553 TG=0,3723 GG=0,3723	0,0209
3A	g8582>A/C	202	A=0,5693 C=0,4307	AA=0,3663 AC=0,4059 CC=0,2277	0,1034

SNPs= Single nucleotide polymorphism. χ^2 = Qui-quadrado. (*) SNPs fora do Equilíbrio.

4.2.2 Desequilíbrio de ligação.

Na Tabela 6 encontram-se os valores de LD medidos através da estatística r^2 . O LD correspondente dos Snp g.322G>A, g.514C>T e g.536A>T sugere valores muito altos, o que poderia indicar ligação entre esses Snps, sendo que eles encontram-se dentro do mesmo éxon. No entanto, os LD dos outros Snps são

relativamente baixos entre eles, sugerindo que eles podem ser segregados de maneira independente.

A média obtida do LD para o SNPs g.8413A>G em ligação com os demais SNPs foi de 0,522, valor alto devido à pouca distância entre eles, mostrando que houve pouca recombinação entre eles. O SNP g.536A>T em ligação com os demais SNPs teve um LD de 0,018, indicando possível recombinação dos alelos entre os SNPs.

Na literatura vários autores apresentam LD diferentes em distâncias curtas no cromossomo 8 onde se encontra o gene *TLR4*. Zhu et al. (2013) encontrou um r^2 de 0,291 na distância de 0-25kb na raça Simental. Na raça Holandesa r^2 foi de 0,35 na distância de 10kb e na raça Nelore com r^2 de 0,20 na distância de 0-5kb (ESPIGOLAN et al., 2013, ROOS et al., 2008). O LD é importante na fixação de haplótipos que serão transmitidos para a descendência, sendo o LD indispensável na implementação da seleção genômica que contribui para melhorar as características produtivas de maior interesse econômico.

Tabela 6. Desequilíbrio de ligação (r^2) dos SNPs do gene *TLR4*.

SNPs	g514>C/T	g536>A/T	g8338>A/C	g8341>A/G	g8342>T/G	g8343>G/A	g8345>A/G	g8413>A/G	g8428>G/A	g8438>A/C	g8578>G/T	g8582>A/C	$\bar{x}$
g322>G/A	<u>0,929</u>	<u>0,946</u>	0,008	0,011	0,002	0,012	0,255	0,014	0,023	0,032	0,003	0,008	0,187
g514>C/T		<u>0,982</u>	0,017	0,022	0,004	0,016	0,030	0,021	0,031	0,026	0,010	0,010	0,176
g536>A/T			0,017	0,023	0,004	0,019	0,028	0,020	0,030	0,027	0,009	0,009	0,018
g8338>A/C				0,155	0,726	0,737	0,648	0,800	0,852	0,246	0,774	0,678	0,473
g8341>A/G					0,071	0,171	0,197	0,165	0,144	0,089	0,142	0,176	0,158
g8342>T/G						0,594	0,588	0,763	0,758	0,311	0,671	0,713	0,446
g8343>G/A							0,789	0,748	0,764	0,243	0,706	0,651	0,471
g8345>A/G								0,759	0,770	0,277	0,648	0,708	0,474
g8413>A/G									0,916	0,305	0,828	0,849	0,522
g8428>G/A										0,302	0,806	0,828	0,291
g8438>A/C											0,251	0,322	0,431
g8578>G/T												0,796	0,479

SNPs= Single Nucleotide Polymorphism. $\bar{x}$ = Média obtida do LD entre os SPNs.

4.2.3 Análises de associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite.

Foram estudadas as associações dos SNPs com características de produção de gordura e proteína, porcentagens de gordura e proteína e contagem de células somáticas. (A Tabela 7 apresenta os valores nominais de P das características em estudo para os SNPs do gene *TLR4*).

Para avaliar a associação do marcador com cada característica envolvida nesse estudo, foram realizadas 8 análises independentes. O limiar de significância para o valor P das análises de associação foi baseado na correção de Bonferroni ($\alpha = 0,05/N_{\text{características}}$).

No caso das medidas de CCS, que não apresentam distribuição normal, foi testado um modelo linear generalizado misto assumindo distribuição Poisson para verificar sua associação com os polimorfismos do gene *TLR4*.

Tabela 7. Médias das características de produção de leite, gordura e proteína, porcentagens de gordura e proteína e contagem de células somáticas no leite, e valores nominais de P, para os SNPs (Teste de Tukey, 5%).

SnP	PL	PLT	PG	PP	PM	%G	%P	CCS II
g322>G/A	p=0,5238	p=0,5094	p=0,0775	p=0,3342	p=0,5138	p=0,0091	p=0,7196	p=<.0001 *
g514>C/T	p=0,5860	p=0,6755	p=0,0757	p=0,2999	p=0,4792	p=0,0040 *	p=0,6388	p=<.0001 *
g536>A/T	p=0,5642	p=0,7155	p=0,0683	p=0,3142	p=0,4326	p=0,0035 *	p=0,7211	p=<.0001 *
g8338>A/C	p=0,6945	p=0,7022	p=0,7106	p=0,9993	p=0,9659	p=0,4892	p=0,1219	p=<.0001 *
g8341>A/G	p=0,8405	p=0,7567	p=0,9944	p=0,9227	p=0,9274	p=0,8328	p=0,5335	p=<.0001 *
g8342>T/G	p=0,6457	p=0,3192	p=0,3213	p=0,8997	p=0,8026	p=0,5519	p=0,1300	p=<.0001 *
g8343>G/A	p=0,5510	p=0,7387	p=0,7053	p=0,5250	p=0,5437	p=0,5039	p=0,3988	p=<.0001 *
g8345>A/G	p=0,7969	p=0,7927	p=0,7865	p=0,9687	p=0,9588	p=0,5783	p=0,7097	p=<.0001 *
g8413>A/G	p=0,5918	p=0,4223	p=0,2864	p=0,6994	p=0,5831	p=0,6437	p=0,7309	p=<.0001 *
g8428>G/A	p=0,4594	p=0,3052	p=0,4580	p=0,9112	p=0,8874	p=0,6689	p=0,7939	p=<.0001 *
g8438>A/C	p=0,5215	p=0,8982	p=0,6526	p=0,8049	p=0,9785	p=0,4204	p=0,0256	p=<.0001 *
g8578>G/T	p=0,7063	p=0,5019	p=0,4081	p=0,9744	p=0,9975	p=0,4738	p=0,2737	p=<.0001 *
g8582>A/C	p=0,5865	p=0,3954	p=0,4415	p=0,9031	p=0,8100	p=0,3837	p=0,1476	p=<.0001 *

*SNP: Single Nucleotide Polymorphism. PL= Produção de Leite; PLT= Produção de Leite Total; PG = Produção de Gordura; PP = Produção de Proteína; PMOZZ= Produção de Mozzarella; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína; CCS = Contagem de Células Somáticas. *indicam diferenças estatisticamente significativas ($P<0,006$), pelo teste de Bonferroni.

Tabela 8. Médias dos Snps associados com a característica de Porcentagem de Gordura.

Snp g.514C>T		SNP g.536A>T	
GENÓTIPO	%G	GENÓTIPO	%G
CC	6,05 a	AA	6,06 a
CT	6,72 b	AT	6,82 b
TT	6,89 b	TT	6,88 b

*SNP: Single Nucleotide Polymorphism. %G = porcentagem de gordura. *a, b, c letras diferentes na mesma coluna, indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), pelo teste de Bonferroni.

De acordo com as Tabelas 7 e 8, os polimorfismos g.514C>T e g.536A>T apresentaram associação significativa com a porcentagem de gordura, sendo observada superioridade dos homozigotos TT para esta característica. Algumas diferenças com este estudo foram reportadas por Nori et al. (2013) que relataram três genótipos no gene *TLR4* que apresentaram associação significativa ($P < 0,05$) em produções a 305 dias em vacas holandesa, onde os genótipos heterozigotos apresentavam maior nível de significância que os genótipos homozigotos.

Para a análise de associação de CCS foi testado um modelo linear generalizado misto assumindo distribuição Poisson, que foi verificado mediante a correção de Bonferroni. Encontrou-se diferenças significativas para todos os Snps como indica a Tabela 7. Alguns autores reportaram diferenças estatísticas significativas com alguns Snps, por exemplo, Bagheri et al. 2013 reportaram dois Snps identificados como TRL41 e TLR42 com associação de ($p = 0,0477$) e ($p = 0,018$ e $p = 0,025$), respectivamente. Outro estudo feito em gado Holandês reporta associação significativa em 9 Snps localizados em regiões QTL conhecidas dos cromossomas 6, 15 e 20 ($q = 0,014$) (MEREDITH et al., 2012). Outros estudos realizados com o gene *TLR4* associado com CCS em gado de leite acharam diferença estatística significativa após a transformação dos dados originais ($p = 0,01$) (BEECHER et al., 2010).

O número de Snps associados significativamente com CCS neste estudo, sugere uma grande influência do gene *TLR4* na imunidade do animal, podendo-se

utilizar como marcador para identificação e seleção de animais num programa de melhoramento genético específico para a característica de CCS.

Tabela 9. Médias dos Snp's associados à característica Contagem de Células Somáticas.

SNP g322>G/A		SNP g514>C/T		SNP g536>A/T		SNP g8338>A/C		SNP g8341>A/G	
Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS
AA	4,81 a	CC	4,86 a	AA	4,76 a	AA	4,86 a	AA	5,27 a
AG	5,65 b	CT	5,47 b	AT	5,74 b	CA	5,48 b	AG	5,8 b
GG	5,56 c	TT	5,63 c	TT	5,73 c	CC	5,73 c	GG	6,13 c

SNP g8342>G/T		SNP g8343>G/A		SNP g8345>A/G		SNP g8413>A/G		SNP g8428>G/A	
Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS
GG	4,33 a	AA	5,7 a	AA	4,88 a	AA	4,76 a	AA	4,95 a
TG	4,61 b	AG	5,38 b	AG	5,43 b	AG	5,46 b	AG	5,39 b
TT	5,92 c	GG	5 c	GG	6,18 c	GG	5,87 c	GG	6,08 c

SNP g8438>A/C		SNP g8578>G/T		SNP 8582>T/A,C	
Genótipo	CCS	Genótipo	CCS	Genótipo	CCS
AA	5,79 a	GG	5,03 a	AA	4,73 a
CA	4,68 b	TG	4,84 b	CA	5,22 b
CC	4,59 b	TT	5,53 c	CC	5,87 c

*SNP: Single Nucleotide Polymorphism. CCS= Contagem de Células Somáticas. *a, b, c letras diferentes na mesma coluna, indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,006$), pelo teste de Bonferroni.

Alguns dos polimorfismos encontrados no gene *TLR4* nesse estudo foram reportados por Alfano et. al (2014), em uma população de búfalo de rio, onde foram identificados polimorfismos dos genes *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* nos cromossomos 17, 3 e 20, respectivamente. Segundo os autores o Snp *TLR4* (672 A > C) foi associado significativamente à susceptibilidade para a tuberculoses bovina, no presente estudo o mesmo SNP identificado como g8438>A/C tem associação com a CCS.

Também na mesma tabela pode-se observar que não houve associação dos polimorfismos (g.8338A>C, g.8341A>G, g.8342T>G, g.8343G>A, g.8345A>G, g.8413A>G, g.8428G>A, g.8578G>T, g.8582T>A,C) com a produção de gordura e de proteína, observada por Russell et al. (2013) trabalhando com vaca Holandesa.

Todos os SNPs encontrados no gene *TLR4* apresentam substituições não conservativas de aminoácidos na proteína, tendo cada um deles um potencial particular para serem mutações causais.

4.2.4 Construção de Haplótipos

Os 13 SNPs foram utilizados para a construção de haplótipos. No entanto, somente os SNPs com maior LD conformaram os blocos de haplótipos. A correlação entre os blocos (0,26) e as frequências estimadas para cada um dos haplótipos é apresentada na Figura 3. O haplótipo mais comum foi o ACA com uma frequência estimada de 0,75, seguido pelo haplótipo GAAAC com uma frequência de 0,34.

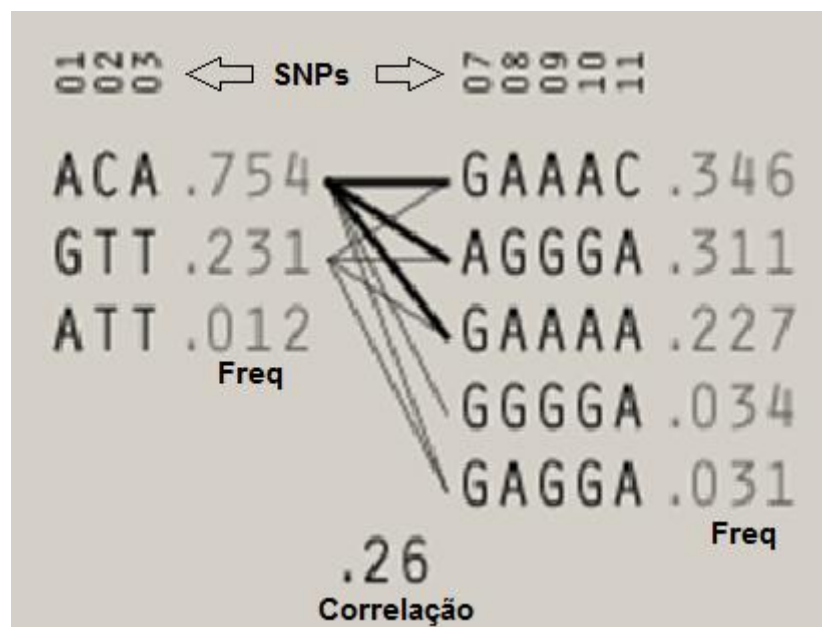


Figura 3. Blocos de haplótipos, correlação e frequências estimadas. *SNPs=Single Nucleotide Polymorphism. Freq= Frequências Estimadas para cada Haplótipo.

O LD dos SnpS foi relativamente baixo entre eles (Tabela 6) e podem ter segregação independente. Na Tabela 10 observa-se que os haplótipos definidos foram testados diretamente para cada característica, sendo a associação para CCS altamente significativa.

Tabela 10. Associação das características com os haplótipos.

HAPLÓTIPOS		Éxon	Características	
			%G	CCS
1	GTT	1	p=0,0715	p=<0,0001 *
2	ACA	1	p=0,0550	p=<0,0001 *
3	ATT	1	p=0,4664	p=<0,0001 *
4	GAAAC	3	p=0,1613	p=<0,0001 *
5	AGGGA	3	p=0,8934	p=0,2272
6	GAAAA	3	p=0,2413	p=<0,0001 *
7	GGGGA	3	p=0,5572	p=<0,0001 *
8	GAGGA	3	p=0,1516	p=<0,0001 *

%G=porcentagem de gordura; CCS=Contagem de Células Somáticas.
 (*)Apresentaram associação significativa.

Após serem feitas as associações, observou-se que nenhum dos haplótipos teve associação significativa com a porcentagem de gordura, incluindo o haplótipo ACA que era o haplótipo mais comum. Contrariamente, para a característica de CCS todos os haplótipos resultaram em associações altamente significativas, exceto o haplótipo AGGGA. Sharma et al. (2006) usando 8 haplótipos para estudos de associação, reportou associação significativa de CCS com 5 dos haplótipos construídos para o gene *TLR4*.

5. CONCLUSÕES

O gene *TLR4* bubalino demonstrou-se altamente polimórfico, especialmente para o éxon 3. Foram reveladas 13 mutações não sinônimas e não conservativas neste estudo, sendo que cada uma delas apresenta potencial particular para ser considerada como uma mutação causal. Os SNP do gene *TLR4* podem ser utilizados como marcadores moleculares em búfalos, tanto como marcadores individuais ou como haplótipos, uma vez foram verificadas suas associações com características como porcentagem de gordura e contagem de células somáticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. **Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**. Disponível em <http://www.bufalo.com.br/abcb.html>. Acessado em: 10 Ago 2011.

ALFANO F, PELETTO S, LUCIBELLI MARIA G, BORRIELLO G, URCIUOLO G, MANIACI MARIA G, DESIATO R, TARANTINO M, BARONE A, PASQUALI P, ACUTIS PIER L AND GALIERO G. Identification of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor candidate genes associated with tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **BMC Genetics**, 15:139.2014.

ARIZNABARRETA, A., GONZALO, C., SAN PRIMITIVO, F. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. **J. Dairy Sci.** 85:1370-1375. 2002.

ASTAKHOVA, NM., PERELYGIN, AA., ZHARIKK, AA., LEAR, TL., COLEMAN, SJ., MACLEOD, JN., BRINTON, MA. Characterization of equine and other vertebrate TLR3, TLR7, and TLR8 genes. **Immunogenetics** 61:529–539.2009.

ASPILCUETA-BORQUIS, R.R., ARAUJO NETO, F.R., BALDI, F., BIGNARDI, A.B., ALBUQUERQUE, L.G., AND TONHATI, H. Genetic parameters for buffalo milk yield and milk quality traits using Bayesian inference. **J. Dairy Sci.** 93:2195–2201. 2010.

BAGHERI M, MIRAIE-ASHTIANI R, MORADI-SHAHRBABA M, NEJATI-JAVAREMI A, PAKDEL A, VON BORSTEL U.U, PIMENTEL E.C.G, KONIG S. Selective genotyping and logistic regression analyses to identify favorable SNP-genotypes for clinical mastitis and production traits in Holstein dairy cattle. **Livestock Science** 151, 140–151. 2013.

BARRETT J.C.; FRY B.; MALLER J.; DALY M.J. "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps". **Bioinformatics**. 21 (2): 263–5. doi:10.1093/bioinformatics/bth457. PMID 15297300. 2005.

BEDOLLA, C.C. Mastitis Bovina. **Cuatro Vientos**. No 41. Febrero-Marzo. pp 24-26. 2004.

BEDOLLA, C.C. Y CASTAÑEDA V.H. Agentes Patógenos Causantes de Mastitis Bovina. **Cuatro Vientos**. No 38. UMSNH. pp. 27-29. 2003.

BEDOLLA, C.C Y PONCE DE LEÓN, MER. Economic causalties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**. 1695-7504. Volumen IX Número 4. 2008.

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

BEUTLER, B.A. **Tlrs and innate immunity. blood**, 113,1399. (2009)

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

BRADLEY, J. AND GREEN, M.J. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. **Journal of Clinical Microbiology**. 39:1845 -1849. 2001.

CARDOSO, D.F. **Análise de polimorfismo em genes do eixo somatotrópico em bovinos nelores selecionados para crescimento**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal 2012.

CERON-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M. AND JURADO-GAMEZ, H. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. **J. Dairy Sci.** 85:2885–2889. 2002.

CHUANG, T.H. & ULEVITCH, R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human Toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **Eur. Cytokine. Netw.** 11, 372-378. 2000.

CORREA, M.G.P., AND MARIN, J.M. O-serogroups, gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**. 85:125-132. 2002.

DE FREITAS, A.C. **Polimorfismos nos genes DGAT-1 e A2M e suas associações com produção e qualidade do leite de búfalas da raça Murrah**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal 2014.

DE FREITAS, AC; FERREIRA DE CAMARGO, G.M.; STAFUZZA, N.; ASPILCUETA-BORQUIS, R.R; VENTURINI, G.C.; DIAS, M.M.; CARDOSO, D.F.; TONHATI, H. **Genetic association between SNPs in the DGAT1 gene and milk production traits in Murrah buffaloes**. *Tropical Animal Health and Production*.48: 1421. doi:10.1007/s11250-016-1110-x. 2016.

DUBEY, P.C., SUMAN, C.L., SANYAL, M.K. et al. Factors affecting composition of milk of buffaloes. **Ind. J. Anim. Sci.** 67(9):802-804. 1997.

DUBEY, P.K., GOYAL, S., KATHIRAVAN, P., MISHRA, B.P., GAHLAWAT, S.K & KATARIA R.S. Sequence characterization of river buffalo Toll-like receptor genes 1–10 reveals distinct relationship with cattle and sheep. **International journal of immunogenetics**. 10.1111/j.1744-313X.01135. .2012.

EMANUELSON, U. Use of individual cow somatic cell counts in monitoring herd status. **Livestock Production Science**, v.48, n.3, p.240-241, 1989.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen**, 220 p. 1998.

DE ROOS, A.P.W., HAYES, B.J., SPELMAN, R.J., AND GODDARD, M.E. Linkage Disequilibrium and Persistence of Phase in Holstein–Friesian, Jersey and Angus Cattle. **The Genetics Society of America**, 1503–1512. 2008.

ESPIGOLAN, R., BALDI, F., BOLIGON, A. A., SOUZA, F. R., GORDO, D. G., TONUSSI, R., ALBUQUERQUE, L. G. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC Genomics**, 14, 305. 2013.

GOLDAMMER, T., ZERBE, H., MOLENAAR, A., SCHUBERTH, H.J., BRUNNER, R.M., KATA, S.R., AND SEYFERT, H.M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, Toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 11:174–185. 2004.

HASAN, U., CHAFFOIS, C., GAILLARD, C., SAULNIER, V., MERCK, E., TANCREDI, S., GUIET, C., BRIERE, F., VLACH, J., LEBECQUE, S., TRINCHIERI, G. BATES, E.E.M. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. **J. Immunol.** 174. 2942–2950. 2005

HILL, H.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, v. 38, p. 209-216, 1981.

HILL, H.G., ROBERTSON, A. The effect of linkage on limits to artificial selection. **Genetical Research**, v.8, p.269-294, 1966.

IAÑEZ PAREJA E. **Complejo principal de histocompatibilidad**. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_08.htm>. Fecha de acceso 15 de setembro de 2016.

JANN, OLIVER C., KING, ANNEMARIE., LOPEZ CORRALES, NESTOR., ANDERSON, SUSAN I., JENSEN, KIRSTY., AIT-ALI, TAHAR., TANG, HAIZHOU., WU, CHUNHUA., COCKETT, NOELLE E., ARCHIBALD, ALAN L., AND GLASS, ELIZABETH J. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. **BMC Genomics**, 10:216. 2009.

JUNGI W. THOMAS, FARHAT KATJA, BURGNER A. IWAN AND WERLING DIRK. Toll-like receptors in domestic animals. **Cell Tissue Res** 343:107–120. 2011.

KUMAR, H., KAWAI, T. & AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 388, 621. 2009.

KUNO M, NEMOTO K, NINOMIYA N, INAGAKI E, KUBOTA M, MATSUMOTO T, YOKOTA H. The novel selective toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor tak-242 prevents endotoxaemia in conscious guinea-pigs. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 36:589–593. 2009.

LEHNINGER, L. Lehninger Principles of Biochemistry. **W. H. Freeman & Co**, 4 ed., pp. 1100, 2004.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.-M. & HOFFMANN, J.A. The dorso ventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cells**, 86, 973. 1996.

LIMA, S. P. G. **Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento**, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. 2013.

MALAVOLTA, F.C. **Métodos indiretos de avaliação da saúde da glândula mamária nas espécies bovina y bubalina.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Julio de mesquita filho”, Jaboticabal, 2006.

MARQUES, J. R. F. Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Brasília: Embrapa-SCT/Embrapa- CPATU**, 176 p. (Coleção 500 Perguntas 500 respostas. Embrapa-SCT). 2000.

MCGUIRE K, JONES M, WERLING D, WILLIAMS JL, GLASS EJ, JANN O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. **Anim Genet** 37:47–50. 2006.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature** 449:819–826. 2007.

MEREDITH B.K, KEARNEY F.J, FINLAY E.K, BRADLEY D.G, FAHEY A.G, BERRY D.P AND LYNN D.J. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. **BMC Genetics**. 13:21. 2012.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre: Editora UFRGS. 141 p. 1998.

MIYASAKI KT. The neutrophil: Mechanism of controlling periodontal bacteria. **J Periodontol**. 62(12):761-74. 1991.

NOORI R, MAHDAVI A.H, EDRISS M.A, RAHMANI H.R, TALEBI M, & SOLTANI-GHOMBAVANI M. Association of polymorphism in Exon 3 of toll-like receptor 4 gene with somatic cell score and milk production traits in Holstein dairy cows of Iran. **South African Journal of Animal Science**, 43 (No. 4). 2013.

NOVO VILLAVERDE, F.J. **Human molecular genetics: Potencial patogénico de las mutaciones en el ADN codificante.** Departamento de Genética Universidad de Navarra. 2012.

PATEL, R.S., MISTRY, V.V. Physicochemical and structural properties of ultrafiltered buffalo milk and milk powder. **J. Dairy Sci.** 80:812-817. 1997.

PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M.A.R., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., DE BAKKER, P.I.W., DALY, M.J., AND SHAM, P.C. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**. Volume 81. 2007.

QUEIROZ DE MESQUITA, ADRIANO; SILVA MINAFRA, CINTIA; REZENDE, E; JOSÉ DE MESQUITA, ALBENONES; GARCIA DA VEIGA JARDIM, EURIONE ANTONIO; JUNQUEIRA KIPNIS, ANA PAULA. Association of tlr4 polymorphisms with subclinical mastitis in brazilian holsteins. **Brazilian Journal of Microbiology** **692-697**. ISSN 1517-8382. 2012.

RAMOS, A.A.; WECHSLER, F.S.; GONÇALVES, H.C. Phenotypic, genetic and environmental trends of milk yield from Brazilian buffalo cows. **In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 7. 2004, Makati. Proceeding. Makati: p.175-177. 2004.**

RAVINDRAN, R., SARAVANAN, B.C., RAO, J.R., MISHRA, A.K., BANSAL, G.C. & RAY, D. A PCR-RFLP method for the simultaneous detection of Babesia bigemina and Theileria annulata infections in cattle. **Current Science**, 93, 1840. 2007.

RIFFON, R., SAYASITH, K., KHALIL, H., DUBREUIL, P., DROLET, M. Y LAGACÉ J. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 39:2584-2589. 2001.

ROCK, F.L., HARDIMAN, G., TIMANS, J.C., KASTELEIN, R.A. & BAZAN, J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95, 588-593. 1998.

ROSSITTO, P.V., RUIZ, L., KIKUCHI, Y., GLENN, K., LUIZ, K., WATTS, J. L. Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. **J. Dairy Sci.** 85:132-138. 2002.

RUIZ-LARRAÑAGA, O., MANZANO, C., IRIONDO, M., GARRIDO, J.M., MOLINA, E., VAZQUEZ, P., JUSTE, R.A., AND ESTONBA, A. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. **J. Dairy Sci.** 94 :3635–3641. 2011.

SHARMA ANUJ AND MAHESHWARI, RADHA K. Oligonucleotide array analysis of Toll-like receptors and associated signalling genes in Venezuelan equine encephalitis virus-infected mouse brain. **Journal of General Virology**, 90, 1836–1847. 2009.

SHARMA, B. S., LEYVA, I., SCHENKEL, F., AND KARROW, N. A. Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein Bulls. **J. Dairy Sci.** 89:3626–3635. 2006.

SHARMA, B.S., ABO-ISMAIL, M.K., SCHENKEL, F.S., YOU, Q., VERSCHOOR, C.P., PANT, S.D., AND KARROW, N.A. Association of TLR4 polymorphisms whit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in canadian holsteins. **Stichting international foundation for animal genetics**, 46, 560-565. 2015.

SIMPSON J. Amplified fragment length polymorphisms. **Bol. Soc. Bot. Méx.** 60:73-76. 1997.

STACEY, B.G., STEPHEN, F.S., HUY NGUYEN, JAMIE, M.M., ROY, J., BLUMENSTIEL, B., HIGGINS, J., DEFELICE, M., LOCHNER, A., FAGGART, M., LIU-CORDERO, S.N., ROTIMI, C, ADEYEMO, A., COOPER, R., WARD, R., LANDER, E.S., DALY, M.J., ALTSHULER, D. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. **Science**. 2225-2229. 2002.

TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. Toll-like receptors. **Ann. Rev. Immunol.** 21, 335-376. 2003.

TEIXIERA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun, 2005.

TEMPERLEY, N.D., BERLIN, S., PATON, I.R., GRIFFIN, D.K., BURT, D.W. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. **BMC Genomics** 9:62–73. 2008.

TOLEDO, L.T., TONHATI, H., OLIVEIRA, J.F.S. et al. Produção e composição físico-química do leite de búfalas na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECHNIA, 35, Botucatu. Anais...** Botucatu: SBZ,1998 p.282-284. 1998.

TOLLERSRUD, T., KENNY, K., REITZ, A. J. JR., AND LEE, J. C. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**. 38:2998-3003. 2000.

TONHATI, H., ALBUQUERQUE, L.G., OLIVEIRA, J.F.S. ET al. Melhoramento genético em bubalinos. Programa Vale do Ribeira, SP. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL, 1, Ribeirão Preto, SP.** 1996.

TONHATI, H., MUÑOZ, M.F.C., DUARTE, J.M.C., REICHERT, R.H., OLIVEIRA, J.A., LIMA, A.L.F. Estimates of correction factors for lactation length and genetic parameters for milk yield in buffaloes. Animal science and technology and inspection of animal products. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.56 no.2 Belo Horizonte Apr. 2004.

TURIN L, RIVA F Toll-like receptor family in domestic animal species. **Crit Rev Immunol.** 28:513–538. 2008.

VALLE, J.L.E. Características e usos do leite de bubalinos. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27, Campinas, SP. Anais...** Campinas: SBZ. 1990. p.739-743. 1990.

WANASINGHE D.D. Mastitis among buffalos in Sri Lanka. **Proc. First World Buffalo Congr. Cairo, Egypt.** 4: 1331-1333. 1985.

WHITE, L. J., SCHUKKEN, Y. H., LAM, T. J. G. M., MEDLEY, G. F., CHAPPELL, M. J. A. Multi species model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. **Epidemiol. Infect.** 127:567-576. 2001.

WOLFINGER, R. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics – simulation and computation**, New York, v.22, n. 4, p. 1079-1106, disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03610919308813143>>1993.

ZETOUNI, L., FERREIRA DE CAMARGO, G.M., DIAS DA SILVA FONSECA, P., CARDOSO, D.F., MONSALVES GIL, F.M., HURTADO-LUGO, N.A., ASPILCUETA-BORQUIS, R. R., CERVINI, M., TONHATI, H. Polymorphisms in the **MTRN1A** gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. **Trop Anim Health Prod.** 46: 337. doi:10.1007/s11250-013-0493-1. 2014.

ZHU M, ZHU B, WANG YH. Linkage Disequilibrium Estimation of Chinese Beef Simmental Cattle Using High-density SNP Panels. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.** 26(6):772-779. 2013.