

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE BÚFALAS E
SUA APLICAÇÃO NA SELEÇÃO PARA A RESISTÊNCIA À
MASTITE**

Henry Cardona Cadavid

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

JULHO DE 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE BÚFALAS E
SUA APLICAÇÃO NA SELEÇÃO PARA A RESISTÊNCIA À
MASTITE**

Zoot. MSc. Henry Cardona Cadavid

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Coorientadora: Prof. Dra. Janete Aparecida Desiderio Sena

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

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

JULHO DE 2009

C268c Cardona Cadavid, Henry
Contagem de células somáticas no leite de búfalas e sua
aplicação na seleção para resistência à mastite / Henry Cardona
Cadavid . -- Jaboticabal, 2009
xv, 73 f. ; il.;28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Humberto Tonhati

Banca examinadora: Humberto Tonhati, Jeffery Frederico Lui,
Fabio Ricardo Pablos de Souza, Antonio Roberto Otaviano, Lenira El
Faro Zadra

Bibliografia

β -defensina 2. búfalo 3. genética molecular 4. seleção animal. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.293:636.082

À vida, e a todas as incertezas que ela nos depara.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HENRY CARDONA CADAVID – nascido em Medellín-Antioquia, Colômbia, graduou-se em zootecnia na Universidade Nacional de Colômbia, e realizou mestrado em Ciências Básicas Biomédicas com ênfase em genética na Universidade de Antioquia - UdeA, Colômbia. No ano de 2005 iniciou o curso de doutorado oferecido pelo programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da FCAV - UNESP, onde desenvolveu seu trabalho sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e Coorientação da Profa. Dra. Janete Aparecida Desiderio Sena. Do mês de março de 2008 ao final do mês de dezembro do mesmo ano realizou estágio sanduíche no Departamento de Ciências Animais e dos Alimentos na Faculdade de Veterinária, Universidade Autônoma de Barcelona, Bellaterra - Espanha, sob supervisão dos doutores Miguel Pérez Enciso e Josep Maria Folch.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati pela confiança, orientação, ajuda, força e apoio. Muito obrigado.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP, pela oportunidade e ensinamentos que me foram ministrados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 05/58468-1 pela concessão da bolsa de estudos.

Ao grupo e funcionários do laboratório de Genética Molecular, e aos colegas que coletaram amostras das búfalas nas diferentes fazendas e fizeram extrações de DNA com as quais trabalhamos: Beto, André "Murote", Gregório, Renan, Fabio, Larissa, João e todos os que estiveram envolvidos.

Ao programa de Controle Leiteiro do Departamento de Zootecnia da UNESP/Jaboticabal e a todas as pessoas que fazem parte deste.

Aos professores dos Departamentos de Zootecnia e Ciências Exatas, pelos ensinamentos transmitidos.

À banca do exame geral de qualificação pelas dicas para melhorar e acrescentar ao trabalho: Jeffrey Frederico Lui, João Ademir, Fabio Ricardo Pablos de Souza, Danisio Prado Munari e Humberto Tonhati.

À banca de defesa da tese pelas dicas para melhorar o trabalho final: Jeffrey Frederico Lui, Lenira El Faro, Fabio Ricardo Pablos de Souza, Antonio Roberto Otaviano e Humberto Tonhati.

Aos meus colegas e amigos da Zootecnia: Dimas, Joana, Luis Gabriel, Raúl, Francisco, Annaiza, Elias, Javier, Daniele, Rafael, Leo, Severino e Geovanny.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular, os quais me ajudaram tantas vezes em dificuldades com os testes feitos: Elias ``Gafanhoto``, Andre Ferrari, Fabio Pablos, André ``Murote``, Gregório, Renan, Fernanda, Marcio, Dimas, Paulo e João e muitos outros que passaram neste período.

Aos diferentes grupos de amigos da Colômbia, Espanha, Itália, Peru, Argentina, Cuba, Uruguai e do Brasil que sempre foram uma grande ajuda na estadia, quando deram uma mão em momentos nos quais eu precisei deles: Julian, Diana Uribe, Dimas, Anna, Ingrid, Jordi, Miguel Perez, Sebas, Josep Maria, Ali, Javier, Joana, Lucia, Severino, Geovanny, Luisga, Calpa, Lina, Edna, Gloria, Natalia, Raul, Wilson, Fernanda M., Francisco ``Pacho``, Pedro, Ivan, Cristina, Andrei, Francisco, Marcelo, Michelly, Verônica, Naudin, Fernando, Guilherme, Marcos, Juliana, Federico, Carolina, Carla Pierre Bellodi, Lucca Dascia, Nancy, Elias ``gafanhoto``, Leonardo Seno, e tantos outros aos quais sempre estarei agradecido.

Ao Grupo de Genética Molecular da Universidade Autônoma de Barcelona (UAB) na Espanha, que me ensinaram e ajudaram no grandioso mundo da genética molecular.

A minha namorada Maritza, que sempre me acompanhou em muitos momentos difíceis.

Ao grande Brasil pela oportunidade e por nos abrir as portas.

A todas as coisas e momentos que segundo a religião significam a presença de Deus.

	PÁG
ÍNDICE GERAL	.
- RESUMO	xii
- ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. OBJETIVO GERAL	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1- <i>Generalidades dos Búfalos</i>	4
2.1.1- <i>Búfalos na América</i>	5
2.1.2- <i>História dos búfalos no Brasil</i>	6
2.2- <i>Importância da contagem de células somáticas (CCS) e sua associação com a mastite.</i>	9
2.3- <i>Considerações gerais das β-defensinas</i>	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2 - PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E PRODUÇÃO DE LEITE A UTILIZANDO INFERÊNCIA BAYESIANA.	34
- RESUMO	34
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 - <i>Consistência dos dados</i>	38
2.2 - <i>Inferência bayesiana e estimação de componentes de (co) variância</i>	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

4. CONCLUSÕES	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPITULO 3 – CARACTERIZAÇÃO POR MEIO DE PCR-RFLP DOS GENES β-DEFENSINA 1 e 4 EM BÚFALOS.	55
- RESUMO	55
1. INTRODUÇÃO	57
2. OBJETIVO	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1- <i>Rebanhos experimentais</i>	58
3.2 <i>Extração e integridade do DNA</i>	59
3.3 <i>Quantificação e qualidade do DNA extraído</i>	59
3.4- <i>Primers para β-defensina entérica 1 e 4</i>	60
3.4.1 <i>Desenho e características dos primers utilizados</i>	62
3.5 <i>Otimização da PCR</i>	63
3.6 <i>Digestão por enzimas de restrição do material amplificado</i>	63
3.7 <i>Foto-documentação dos fragmentos digeridos</i>	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABELAS	PÁG
CAPÍTULO 1.	
Tabela 1- População de búfalos na América.	6
CAPÍTULO 2.	
Tabela 1- Distribuição das observações das características P305 e CCSt estudadas em búfalas.	39
Tabela 2- Estatísticas descritivas das distribuições “ <i>a posteriori</i> ” dos componentes de variância e parâmetros genéticos para a produção de leite total (P305) e contagem de células somáticas (CCSt).	45
CAPÍTULO 3.	
Tabela 1- Locais onde foram obtidas as amostras de DNA	59
Tabela 2- Primer utilizados para o estudo do gene β -defensina.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG
CAPÍTULO 1.	
Figura 1. Esquema genômico do gene β -defensina 1 bovina	20
Figura 2. Esquema genômico do gene β -defensina 4 bovina	20
Figura 3. Esquema da região codificante e não codificante do gene β -defensina 1.	20
Figura 4. Esquema da região codificante e não codificante do gene β -defensina 4.	20
CAPÍTULO 2.	
Figura 1. Distribuição das observações das características em estudo.	39
Figura 2. Densidades "a posteriori" das herdabilidades (h^2), porção da variância devida a efeitos de ambiente permanente (c), correlação genética (r_a) e residual (r_r) para produção de leite total (P305) e contagem de células somáticas (CCSt) e respectivos intervalos de alta densidade (entre colchetes).	44
CAPÍTULO 3.	
Figura 1 Eletroferograma da extração de DNA genômico extraído a partir de pêlos de búfalas seguindo o protocolo de extração.	59
Figura 2: Electroferograma das amostras de Búfalos (1-9) do gene da β -defensina 1 (Primer A) (Gel 2% de agarose). Amostra 10 Ladder 1Kb.	65
Figura 3. Electroferograma das amostras de Búfalos (1-7, 9-15) do exon 2 do gene da β -defensina 4 (Primer C) (Gel 2% de agarose). Amostra 8 ladder 100pb.	65
Figura 4. Electroferograma das amostras de Búfalos (1-7) do exon 1 do gene da β -defensina 4 (Primer D) (Gel 2% de agarose). Amostra 8 (negativa), amostra 9 (ladder 100pb).	65

- Figura 5.** Electroferograma das amostras de búfalos (1-3, 5-10) do intron do gene da β -defensina 4 (Primer E) (Gel 2% de agarose). Amostra 4 (ladder 100pb). 66
- Figura 6.** Electroferograma das amostras de búfalos (1-14) de sequências parciais do gene entérico da β -defensina 4 (Primer G) (Gel 2% de agarose) 66
- Figura 7.** Electroferograma das amostras de búfalos (1-15) de sequências parciais do gene da β -defensina 4 entérico, exon 2 e CDS parciais (Primer H) (Gel 2% de agarose). Amostra 16 (ladder 100pb). 66

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE BÚFALAS E SUA APLICAÇÃO NA SELEÇÃO PARA A RESISTÊNCIA À MASTITE

RESUMO: Na bovinocultura de leite, a alta contagem de células somáticas (CCS) é considerada indicativo da condição de mastite. A mastite ainda continua sendo a doença de maior prevalência em gado leiteiro, causando altos custos. Em rebanhos bufalinos no estado de São Paulo, a presença de mastite subclínica e clínica representam 1,5% e 18,77%, respectivamente, das búfalas em lactação. Isto pode levar à diminuição na produção e na qualidade do leite. Considerando-se que não é possível erradicar essa doença devido a sua origem ser multifatorial (fatores genéticos e ambientais), todos os esforços devem ser concentrados no sentido de manter sua prevalência a mais baixa possível. Assim sendo, o objetivo de nosso estudo foi estimar os parâmetros genéticos para a CCS e produção de leite e identificar polimorfismos nos genes B-defensina 1 e 4. Na estimação dos parâmetros genéticos para a CCS e produção de leite (P305) foram utilizadas 4.907 lactações de 1986 búfalas contidas no arquivo zootécnico mantido pelo Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da UNESP de Jaboticabal, as quais foram analisadas por meio de inferência bayesiana em análises bicaracterística, empregou-se um modelo animal. Para a caracterização dos genes β -defensina 1 e 4 foram utilizadas amostras de DNA genômico de 132 búfalas de diferentes regiões do estado de São Paulo, empregou-se a técnica de PCR/RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase/ Polimorfismo do Comprimento dos

Fragmentos de Restrição). As estimativas de herdabilidade da CCSt ($h^2=0.27$) e da P305 ($h^2=0.25$) foram moderadas, enquanto que na caracterização polimórfica dos genes β -defensina 1 e 4 todos os animais estudados foram monomórficos para estes genes. Com estes resultados, não foi possível estabelecer associações de dados quantitativos com genótipos para estes dois genes. Mas, com o valor das herdabilidades, é possível utilizar os parâmetros CCS e P305 dentro dos programas de seleção para atingir ganho genético nesta população.

PALAVRAS-CHAVE: β -defensina, búfalo, genética molecular, seleção animal, marcadores moleculares

SOMATIC CELL COUNT IN BUFFALOES DAIRY AND ITS APLICATION IN IMPROVEMENT OF RESISTANCE TO MASTITE.

ABSTRACT: In dairy cows, high-somatic cell count (CCS) in milk is considered indicative of the mastitis condition of the mammary gland. Mastitis, inflammation of the mammary glands of dairy animals both clinical and subclinical, results in significant economic losses because of lower milk yields and its degraded quality, early culling and loss of genetic potential, higher veterinary expenses and increased labour costs for a farmer. In buffaloes from São Paulo State, the presence of clinical and subclinical mastitis represent losses between 1,5% and 18,77% of dairy milk buffaloes. This fact causes a diminution of production in the milk quality, interfering in mozzarella production, which is to making utilizing this specie milk. We known that is not possible disappear this illness because their multifactorial source (genetics and environmental factors), all effort will be concentrated in the direction of to keep the prevalence as low that possible. Because the importance of the mastitis in animal dairy, in the last year increase the number of study of defensin genes, which are a group of multifunctional peptides, due to the role played by defensins in defending animals from bacterial, viral, or fungal infections, the genes encoding them seem to be potential markers of the genetically determined susceptibility (or resistance) of the mammary gland. Defensins are present not only in the mammary gland, but also in milk, as well as in leukocyte granules and in macrophages which constitute a part of milk cell population. The β -defensins are cationic peptides. It is a group of antimicrobiana peptides with antibiotic and cytotoxic activity against bacterium

viruses and fungi. Interest in the β -defensins has grown substantially in recent years, because of their antimicrobial properties and because of their role in protecting the mammary gland against pathogens. Like this, the aim of this study was applied selection to improve the buffaloes' resistance to mastitis. In this study we used PCR-RFLP to determine the polymorphism of the buffaloes' β IV and β I defensin genes and search for its association with somatic cell count in milk. And the estimation for somatic cell count parameter genetics was utilized the reports of the milk program control support by Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da Unesp de Jaboticabal for determination of genetic parameters by somatic cell count and milk production utilizing Bayesian methods.

KEYWORDS: β -defensina, buffalo, molecular genetics, animal breeding, molecular marker.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A região sudeste do Brasil, onde se localiza o estado de São Paulo, é a principal produtora de queijo tipo *mozzarella*, o qual é produzido exclusivamente de búfalas (*Bubalus bubalis*). Como ocorre em bovinos leiteiros, a alta contagem de células somáticas (CCS) no leite é considerada um indicativo de mastite da glândula mamária.

A mastite, inflamação da glândula mamária é a doença economicamente mais importante relacionada à produção leiteira. Os efeitos da mastite geram altos custos com tratamentos veterinários, sendo a doença claramente associada às causas de apoptoses das células epiteliais mamárias, não permitindo ao animal expressar todo seu potencial genético na produção leiteira.

Outro problema gerado pela mastite é o impacto devido ao uso de antibióticos que podem ocasionar resistência a algumas patogenias bacterianas nos humanos. A estas implicações econômico-produtivas negativas, adiciona-se o fato de que a população humana está cada vez mais exigente no que se refere à biossegurança alimentar, o que impõe limites ao uso de terapias antimicrobianas em animais, visando diminuir o risco de transmissão de resistência bacteriana para os humanos. Tal fato tem levado geneticistas a tentar aumentar a resistência natural da glândula mamária, utilizando-se de marcadores genéticos que possam ser úteis na seleção e multiplicação deste material genético.

As β -defensinas têm sido identificadas como um grupo de peptídeos catiônicos com potente atividade antibiótica e citotóxica contra bactérias, vírus e

fungos, servindo-se como moléculas efetoras da imunidade inata que provêm na primeira linha de defesa do animal contra patogenias microbianas.

Considerando-se o amplo espectro de atividade antimicrobiana das β -defensinas contra micro-organismos, e seu papel na imunidade inata, estas têm sido caracterizadas em muitas espécies animais de produção tais como: bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Neste sentido, um dos principais estudos que está sendo desenvolvido verifica o papel das β -defensinas na proteção da glândula mamária contra patogenias, já que tem se demonstrado que tecidos de glândula mamária dos bovinos infectados, bem como células somáticas de vacas leiteiras, contém transcritos de β -defensinas. Conseqüentemente se faz importante estudar o gene β -defensina e seus possíveis polimorfismos, de forma a auxiliar no estabelecimento de marcadores genéticos como possíveis ferramentas que complementem os programas de melhoramento das búfalas para a resistência à mastite.

1. OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de variabilidade genética para a contagem de células somáticas e a produção leiteira, utilizando-se métodos bayesianos e caracterizar o gene β -defensina em búfalas (*Bubalus bubalis*) leiteiras.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar parâmetros genéticos para a CCS e a Produção de leite utilizando-se inferência bayesiana.

- Testar primers no gene β -defensina reportados em bovinos da raça Holandesa e em sequências de búfalos publicadas no GenBank.

- Examinar a existência de polimorfismos no gene β -defensina em búfalos (*Bubalus bubalis*) com diferentes enzimas de restrição (RFLP).

- Avaliar os genótipos gerados na população e estabelecer a relação do genótipo de cada búfala e de sua associação com os dados gerados no controle leiteiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Generalidades dos Búfalos

A população de búfalo (*Bubalus bubalis*) no mundo é atualmente cerca de 168 milhões de cabeças, das quais cerca de 161 milhões podem ser encontradas na Ásia (95.83%); 3.7 milhões estão na África (2.24%), 3.3 milhões na América do Sul (1.96%), 40.000 na Austrália (0.02%) e 500.000 na Europa (0.30%) (BORGUESE, 2005).

O búfalo asiático ou búfalo de água é classificado no gênero *Bubalus*, espécie *bubalis*. O *Bubalus bubalis* pertence à classe *Mammalia*, subclasse *Ungulata*, ordem *Artiodactyla*, subordem *Ruminantia*, família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, tribu *Bovini*, as quais incluem os seguintes três grupos: Bovina (gado), Bubalina e Syncerina incluindo só a espécie *Syncerus caffer* (o búfalo africano). E a Bubalina (o búfalo asiático), que inclui três espécies: *Bubalus depressicornis* ou Anoa, o qual vive na Indonésia, *Bubalus mindorensis* presente nas Filipinas e *Bubalus bubalis* derivado da domesticação do *Bubalus arnee*, o búfalo selvagem da Índia (BORGUESE, 2005).

A domesticação destas espécies ocorreu recentemente (5.000 anos atrás) comparada com a domesticação do gado *Bos taurus* e *Bos indicus* (10.000 anos atrás). O búfalo asiático compreende duas subespécies conhecidas como os tipos de Rio e de Pântano. Os búfalos possuem 5 pares de cromossomos autossômicos submetacêntricos. O búfalo de água possui 20 pares acrocêntricos ($2n=50$) enquanto que o do pântano ($2n=48$) tem 19 pares acrocêntricos (BORGUESE, 2005).

A diferença no número diplóide é só aparente, de fato, nos búfalos de pântano o cromossomo um é originado da fusão entre o cromossomo quatro e o nove do búfalo de água. Durante este fenômeno, as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) presentes no búfalo de rio no cromossomo quatro foram perdidas e o centrômero do cromossomo nove, inativado. As duas são subespécies, portanto férteis entre si e produzem progênie com 49 cromossomos (BORGUESE, 2005).

2.1.1 Búfalos na América

Atualmente existe um grande entusiasmo acerca da produção de búfalo na América, particularmente entre associações de gado e criadores de búfalos. O búfalo é considerado o animal do futuro e seu número nos últimos 50 anos têm aumentado consideravelmente (Tabela 1) (ROCHA, 2001). Uma das características que faz o búfalo amplamente usado nestes países é sua extraordinária habilidade para converter fibra em energia. Muitas pesquisas têm indicado a superioridade do búfalo na conversão alimentar com o uso de forragens tropicais e subprodutos agrícolas, não competindo com os humanos pelos principais produtos agrícolas.

Outras características importantes dos búfalos são suas capacidades para se adaptar em diferentes climas e sua alta fertilidade, sempre superior aos bovinos. As raças de búfalos são sinônimos de baixos custos de produção e altos níveis de produtividade (BORGUESE, 2005).

2.1.2 História dos búfalos no Brasil

Os búfalos foram introduzidos no país a partir do final do século XIX, inicialmente através da região Norte em pequenos lotes originários da Ásia, Itália e Caribe, muito mais por curiosidade do que por suas características zootécnicas, até então muito pouco conhecidas.

Tabela 1. População de búfalos na América.

País	População
Argentina	50.000
Bolívia	5.000
Brasil	3.000.000
Colômbia	30.000
Cuba	30.000
Equador	5.000
Paraguai	10.000
Peru	25.000
Venezuela	150.000
Trindade e Tobago	10.000
Otros Países (USA, México, Panamá, Guatemala)	10.000
Total	3.345.000

Fonte: Rocha Loures, 2001

Sua grande adaptabilidade, elevada fertilidade e rusticidade despertaram o interesse de produtores e permitiram que o rebanho experimentasse uma evolução significativa, atingindo em 1961 cerca de 500 mil animais (BERNARDES, 2006).

No período de 1961 a 2005, observou-se um crescimento de nada menos que 1.806%, com um rebanho atual estimado em mais de três milhões de exemplares, segundo estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). O búfalo está presente em todos os estados brasileiros, constituindo-se assim o maior rebanho da espécie fora do continente asiático (ABCB, 2009).

Os búfalos vêm sendo criados usualmente em pequenas e médias propriedades e, grandes rebanhos são encontrados principalmente na região Norte onde são mantidos em regime de criação extensiva, sendo explorados principalmente para a produção de carne e leite (BERNARDES, 2006).

Nestas condições, a produtividade leiteira não alcança os níveis de produção encontrados em outros países como é o caso da Itália, onde se tem feito um programa muito rigoroso de melhoramento animal, no entanto, a fabricação de queijos e outros produtos tem experimentado um crescente aumento de produção e consumo no Brasil em função da grande aceitação no mercado (MIRANDA, 1986; ANDRIGHETTO, 2005; BERNARDES, 2006; ABCB, 2009).

Particularmente a partir dos anos 80, com a maior profissionalização e especialização das propriedades dedicadas à exploração dos búfalos, intensificaram-se os processos visando à seleção dos melhores animais. Inicialmente buscou-se a fixação racial, perdida com a intensa miscigenação das raças importadas: Murrah, Jafarabadi e Mediterrânea, entre outras (ABCB, 2009).

A fim de melhor aproveitar as qualidades do leite bufalino na transformação em derivados, alguns criadores desenvolveram programas privados visando à especialização de seus rebanhos, seja para a produção de carne, seja para a

produção de leite, o que resultou na coexistência de indivíduos e rebanhos com ampla variação de performances zootécnicas para tais características (ABCB, 2009).

Assim, a despeito da baixa variabilidade genética existente no rebanho bufalino nacional, dada sua origem a partir de um reduzido número de exemplares, verificou-se, em diversos trabalhos técnicos efetuados, estimativas significativas nas herdabilidades de características produtivas e diferenciais expressivos de valores genéticos individuais, o que favoreceria a implementação de um programa de melhoramento genético baseado na identificação e multiplicação de animais de mérito genético superior (ABCB, 2009).

A partir dos anos 90, com a significativa expansão de unidades industriais dedicadas à produção de laticínios especializados, enfatizou-se o maior rendimento industrial e a produção de produtos de maior valor agregado, remunerando a matéria prima a preços cerca de duas vezes maiores que aqueles pagos pelo leite bovino (BERNARDES, 2006).

O caráter de produção desuniforme durante o ano tem estimulado de forma pronunciada a expansão de propriedades dedicadas à exploração leiteira das búfalas, particularmente no sudeste do país e junto aos maiores centros consumidores (BERNARDES, 2006).

Os bufalinos ultrapassaram a produção de 76,7 bilhões de litros de leite ou cerca de 14% do total de leite produzido em todo o mundo na década anterior. Enquanto a produção de leite de bovinos diminuiu de 2,94% ao ano, a de bufalinos cresceu 2,72% ao ano, passando de 34,97 bilhões em 1984 para 76,73 bilhões em 2004 (RAMOS, 2006).

2.2 Importância da contagem de células somáticas (CCS) e sua associação com a mastite.

A mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária. Usualmente ela é causada pela infecção microbiana, e sua prevalência em gado produtor de leite ainda continua sendo muito alta (WILSON, et al., 1997). Esta doença é caracterizada pelo afluxo de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares dentro da glândula mamária e pelo incremento dos conteúdos de protease no leite, o qual ocasiona mudanças nas características do leite, causando redução na quantidade e na produção final de queijo (VERDI et al., 1987; BARBANO et al., 1991), com grande prejuízo aos produtores.

Quanto à sua forma de apresentação, a mastite é denominada clínica quando acompanhada dos sinais que caracterizam a reação inflamatória (edema, calor, rubor, dor e distúrbios de função). Na ausência destes sinais visíveis, denomina-se mastite subclínica, cujo diagnóstico depende de testes aplicados ao leite que demonstrem os produtos da reação inflamatória e/ou as alterações da composição química da secreção aparentemente sadia (SCHALM et al., 1971; BLOOD et al., 1991).

A incidência do contágio pela mastite tem diminuído consideravelmente nos últimos 30 anos com a adoção de planos de controle como: manutenção de equipes de ordenha, desinfecção do teto após a lactação, uso de antibióticos como medida profilática e terapêutica e descarte de animais com mastite persistente (KERR et al., 2003).

A CCS tem sido usada como uma importante ferramenta para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária, na detecção de mastite subclínica em relação ao rebanho, para estimar as perdas de produção de leite em decorrência da mastite e como indicador das características qualitativas e higiênicas do leite (SANTOS, 2002).

Os leucócitos, macrófagos e neutrófilos são liberados como resposta do sistema imune a infecções e servem para eliminar a infecção do organismo. Isto ocasiona a presença de células somáticas no úbere e conseqüentemente estas estarão presentes no leite alterando sua composição. Baixos níveis de células somáticas melhoram a produção do leite, a vida de prateleira e conseqüentemente a produção de queijo. A CCS é de fácil obtenção, além de ser relativamente barata quando comparada com testes bacteriológicos. Assume-se que, uma contagem baixa de CCS indica um baixo nível ou ausência de infecção ao longo da lactação (SHOOK & SCHULTZ, 1994).

Em relação aos valores das contagens de células somáticas, alguns autores têm considerado para bufalinos um valor superior a 500.000 células/ml, para selecionar os quartos com presença ou ausência do quadro subclínico, sem necessariamente utilizar a confirmação microbiológica (SINGH et al., 2002; SINGH et al., 2004; DHAKAL, 2004). Por outro lado, PICCINI et al. (2006) sugeriram a contagem de 400.000 células/ml como ponto de triagem.

O uso da CCS para propósitos de seleção tem sido amplamente discutido, e acredita-se que a seleção para diminuição da CCS pode reduzir a susceptibilidade à mastite (PHILIPSSON et al., 1995). Por outro lado, levando em

conta que o aumento da CCS é um meio usado pelo próprio organismo para se defender dos ataques de patogenias na glândula mamária, a seleção para CCS muito baixas pode debilitar a resistência dos animais à mastite (SURIYASATHAPORN et al., 2000). Porém, as vacas que apresentam baixas médias de CCS na primeira lactação têm menores riscos de apresentar mastite clínica na segunda, sugerindo que objetivos de seleção devem favorecer vacas com baixas CCS observadas (SHOOK & SCHULTZ, 1994).

De acordo com CERON-MUÑOZ et al. (2002), em búfalos, a CCS decresceu no segundo mês de lactação, aumentando depois por volta do nono mês de lactação. Os coeficientes de correlação entre CCS e produção de leite e porcentagem de lactose foram negativos e significativos durante todos os meses de lactação, mostrando que a produção de leite e de lactose diminuiu com o aumento da CCS, causando perdas na produção de leite de búfalas.

COFFEY et al. (1986), EMANUELSSON et al. (1988) e PHILIPSSON et al. (1995) obtiveram estimativas de correlação genética entre CCS e incidência de mastite clínica variando entre 0,60 e 0,80. Por causa desta associação, vários pesquisadores têm avaliado as perspectivas de incluir esta característica em programas de seleção.

A CCS não tem distribuição normal, assim, geralmente, os dados são transformados para a escala logarítmica e convertidos em escores de células somáticas (ECS). Nos EUA, a média dos controles mensais de ECS é a medida usada como base nas avaliações genéticas. A transformação fornece uma distribuição aproximadamente normal com homogeneidade de variância, além de

propiciar uma relação linear entre a perda na produção de leite e uma tradução direta entre CCS e ECS, de modo que para cada unidade de aumento em ECS a CCS é dobrada (KIRK, 1984).

Segundo NASH et al. (2000), a herdabilidade da mastite clínica varia entre 0,01 e 0,42; onde filhas de touros que transmitem baixo ECS tiveram baixa incidência de mastite clínica e poucos episódios clínicos durante a primeira e segunda lactação. As filhas de touros que transmitem longas vidas produtivas e úberes bem conformadas tiveram poucos episódios clínicos e baixa incidência de mastite clínica durante a primeira e segunda lactação.

A incidência de mastite clínica e episódios clínicos por lactação podem ser reduzidos pela seleção de animais com baixo ECS, longa vida produtiva e úbere bem conformado (NASH et al. 2000). Características de avaliação linear de tipo, principalmente aquelas relacionadas com a forma do úbere ou com a implantação dos tetos, e ECS foram sugeridas por ROGERS (1993) como características que podem ser usadas na seleção indireta para melhorar a saúde e reduzir custos de manejo em rebanhos leiteiros.

Ainda, segundo ROGERS (1993), a eficiência da seleção aumenta levemente quando a profundidade do úbere, implantação de tetos, ângulo do casco e ECS eram usados como critérios de seleção juntamente com produção de leite. Além disso, sendo a correlação genética entre incidência de mastite clínica e ECS de, pelo menos, 0,80, as avaliações genéticas baseadas em ECS teriam maior importância na redução da incidência da mastite resultante da seleção para aumento da produção de leite (NASH et al., 2000).

De acordo com PHILIPSSON et al. (1995), os ECS podem ser usados, em análises multivariadas, para avaliação de reprodutores leiteiros como uma forma de limitar a incidência de mastite clínica que ocorre como resposta correlacionada ao melhoramento da produção de leite.

COFFEY et al. (1985) e DA et al. (1992) sugeriram, com base em estimativas de correlação genética entre ECS em várias ordens de parto, que o escore médio da célula somática não pode ser considerado como a mesma característica em diferentes lactações.

PÖSÖ & MÄNTYSAARI (1996), trabalhando com vacas da raça Ayrshire Finlandesa, observaram que as estimativas de correlação genética entre os escores de células somáticas nas primeiras três lactações eram 0,78 (primeira e segunda), 0,77 (primeira e terceira), e 0,95 (segunda e terceira). Ao mesmo tempo, os autores estimaram as correlações genéticas entre CCS na primeira lactação e incidência de mastite nas primeiras três lactações, e concluíram que ocorrência de mastite clínica e CCS medem diferentes aspectos da saúde do úbere.

Vários trabalhos reportam estimativas de correlação genética entre características resultantes da CCS e características de produção e qualidade do leite. MONARDES et al. (1984) usaram log (CCS) de vacas Ayrshire e agregadas como média aritmética, geométrica, harmônica e ponderada (pela produção no dia do controle). As estimativas de herdabilidade para as diferentes medidas para a primeira lactação variaram de 0,09, para a média aritmética, a 0,16, para a mediana. As correlações genéticas entre as medidas relacionadas à célula

somática e às produções de leite, gordura e proteína foram, em média, 0,36; 0,68 e 0,74, respectivamente. As estimativas de correlação fenotípica foram, respectivamente, -0,15, -0,16, e -0,11, para leite, gordura e proteína. Para as segundas e terceiras lactações, as correlações genéticas e fenotípicas foram negativas (MONARDES et al., 1984).

MANFREDI et al. (1984) definiram duas medidas relacionadas à CCS: o escore cumulativo da lactação (ECL), definido por um índice (ou escore) proporcional ao número de vezes e à fase da lactação em que a CCS era superior a 400.000 cel/ml, e a contagem total de células somáticas/ml/lactação (CTCS). Estimativas de herdabilidade foram 0,17 e 0,61, para ECL e CTCS, respectivamente.

No mesmo estudo, MANFREDI et al (1984) encontraram que as correlações genéticas entre ECL e as produções de leite, gordura e proteína foram -0,11; -0,02 e 0,08, respectivamente, enquanto que as correlações fenotípicas foram estimadas em 0,02; 0,07 e -0,05, respectivamente. Entre as características produtivas, as correlações genéticas foram 0,43; 0,79 e 0,80, entre leite e gordura, leite e proteína, e gordura e proteína, respectivamente. As correlações fenotípicas foram todas altas e positivas, variando de 0,73 a 0,90. Estimativas de herdabilidade obtidas sob um modelo de touro foram, respectivamente, 0,21; 0,24 e 0,19, para as produções de leite, gordura e proteína.

WELPER & FREEMAN (1992) usaram médias de ECS para toda a lactação ponderada pela produção de leite no dia do controle para estimar parâmetros genéticos para ECS, leite e seus constituintes. Para as primeiras lactações de

vacas Holandesas, as estimativas de correlação genética entre ECS e as características de produção foram 0,15; 0,12 e 0,18, para leite, gordura e proteína, respectivamente. As correlações fenotípicas foram negativas e próximas de zero. Considerando-se apenas as características produtivas, as correlações genéticas variaram de 0,71, entre leite e gordura, a 0,93, entre leite e proteína.

BOETTCHER et al. (1992) usaram lactações de aproximadamente 240.000 vacas nos EUA e obtiveram correlações genéticas entre ECS e as respectivas produções de leite, gordura e proteína de 0,16; 0,11, e 0,18, respectivamente.

Utilizando-se cerca de 72.000 primeiras lactações de vacas da raça Holandesa, criadas em oito estados americanos, GADINI et al. (1997) obtiveram como correlações genéticas entre o ECS e as produções de leite, gordura e proteína, os respectivos valores: 0,23; 0,11 e 0,32, enquanto que as correlações genéticas entre as produções de leite e gordura, e de leite e proteína, foram 0,27 e 0,72, respectivamente. Os mesmos autores estimaram em 0,23; 0,22; 0,20 e 0,14 as herdabilidades das produções de leite, gordura e proteína, e do ECS, respectivamente.

Vários autores analisaram ECS de forma a utilizar toda informação disponível e melhorar a acurácia das estimativas de parâmetros genéticos. Estimativas de herdabilidade foram de baixas a médias, variando de 0,06 a 0,35, quando os controles leiteiros individuais foram considerados, mas os valores são similares àqueles obtidos para o ECS médio (COFFEY et al., 1985; EMANUELSSON et al., 1988; BANOS & SHOOK, 1990; SCHUTZ et al., 1990; DA. 1992; REENTS et al., 1994 e 1995).

SHOOK & SCHUTZ (1994) reportaram que a correlação genética entre a incidência de mastite clínica e a produção de leite foi 0,20, indicando que vacas com alto valor genético para produção de leite tendem a apresentar mais casos de mastite, e que um aumento na incidência de mastite pode ser esperado como uma resposta correlacionada em um programa de melhoramento genético para aumentar o potencial produtivo.

Considerando-se que não é possível erradicar essa doença, todos os esforços devem ser concentrados no sentido de manter a sua prevalência o mais baixa possível, pois ela traz prejuízo para a pecuária leiteira, causando, para o produtor, a redução no lucro pela diminuição da produção de leite, aumento do leite descartado e dos custos com tratamentos clínicos e da mão-de-obra, além de promover o descarte prematuro de vacas (SHOOK, 1989). HARMON (1998) cita que, nos EUA, a mastite resulta em perdas de aproximadamente US\$ 185,00/vaca/ano, ou, US\$ 1,8 bilhão/ano, e que cerca de 66% das perdas são devidas à diminuição na produção de leite.

Atualmente, alguns países como o Canadá e a Itália pagam preço diferenciado pelo leite, de acordo com sua qualidade, sendo a contagem de células somáticas, um dos parâmetros de qualidade (CERON-MUÑOZ et al., 2002).

A CCS por si só apresenta um impacto econômico e de qualidade sobre os vários setores da cadeia produtiva de leite. Na portaria 46 do Ministério da Agricultura (aprovada recentemente como Instrução Normativa No. 51), que regulamenta os critérios de qualidade do leite a ser disponibilizado para o

consumo humano, existe um programa de diminuição progressiva destes padrões para CCS, iniciando em um máximo permitido de 1.000.000 de células somáticas/ml e atingindo 200.000 células/ml em cinco anos.

Mesmo antes da aprovação desta portaria, já se observava uma tendência crescente entre os laticínios e postos receptores de leite de compor o valor do litro do leite a ser pago ao produtor com base em critérios de qualidade, entre estes a CCS, estabelecendo valores, abaixo do qual o leite seria descartado ou então seu preço pago seria penalizado.

O leite e os produtos fabricados a partir de búfalas afetadas com mastite constituem um grande risco para os consumidores. Este risco é dado não só pela presença de remanescentes de antibióticos ou patogenias no leite (podem ser destruídos pela pasteurização), mas também pela presença de toxinas, as quais podem ser termoestáveis e que persistem nos produtos derivados do leite após pasteurização (MITCHELL et al., 1998, LARANJA & AMARO, 1998). Além disto, cada vez mais se limita a utilização da terapia antimicrobiana em animais de produção com o intuito de diminuir o risco de transmissão de bactérias resistentes para os humanos e até mesmo para os animais (GRUET et al., 2001). Por causa deste risco é muito importante selecionar animais com uma alta resistência genética a inflamações mamárias. Assim, a determinação de marcadores genéticos indicadores de saúde da glândula mamária seria muito importante (BAGNICKA et al., 2007).

2.3 Considerações gerais das β -defensinas

O sistema imune de organismos multicelulares inclui peptídeos que protegem contra uma ampla faixa de micróbios (bactérias, fungos e protozoários) e vírus. Estes peptídeos são uma família conhecida sob o termo coletivo de “defensinas” fazendo parte do sistema imune inato de vertebrados, insetos e plantas (KLÜVER, 2006).

As β -defensinas são caracterizadas por seis resíduos de cisteína com uma estrutura de uniões disulfídicas formando espaços específicos Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 e Cys3-Cys6. As β -defensinas foram isoladas dos neutrófilos e sangue ultra filtrado. Análises de expressão revelaram uma produção predominante de β -defensinas em células epiteliais (KLÜVER, 2006).

As β -defensinas são peptídeos multifuncionais com atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas, vírus e fungos. Além de sua atividade antimicrobiana, elas exercem função de moléculas sinalizadoras no sistema imune e são quimioatraentes para linfócitos T, células dendríticas imaturas e monócitos (ROOSEN, 2004; KLÜVER, 2006; VERMA, 2007).

Devido à importância dos neutrófilos β -defensinas na resposta imune inata, os genes das β -defensinas dos animais de produção têm atraído muito a atenção. Assim, elas têm sido caracterizadas em muitos animais como os bovinos, cabras, ovelhas e suínos. Até o momento conhece-se muito pouco da estrutura e sequência dos genes β -defensina do búfalo de água (*Bubalus bubalis*), apesar de sua alta contribuição na produção leiteira dos países tropicais (BERA et al., 2007; HAFEZ, 2008).

A identificação de indivíduos que sejam resistentes a doenças é desejável, no entanto, difícil de ser realizada nas populações comerciais. O valor genético estimado (VGE) é baseado na informação fenotípica de um indivíduo e dos membros de sua família (KELM et al., 1997). Após a identificação de indivíduos resistentes, as causas biológicas da resistência à doença devem ser examinadas. Causas em potencial incluem maior capacidade de resposta imune ou posse de alguns genes com amplo efeito (VERMA, 2007).

A β -defensina é produzida no epitélio dos rins, pâncreas, glândulas salivares, trato respiratório, trato urogenital e placenta. A expressão dos genes β -defensina foi mostrada também na glândula mamária de vacas. Os peptídeos β -defensina são codificados por genes localizados em humanos no cromossomo oito, enquanto que em bovinos a maioria de genes do grupo das defensinas estão localizados no cromossomo 27, como é o caso da β -defensina 1 e 4 (Figuras 1 e 2). Os genes da β -defensina bovinos são compostos por dois éxons separados por um íntron (Figuras 3 e 4). Devido ao papel das β -defensina, os genes codificadores podem ser potenciais marcadores em estudos de determinação genética de resistência (ou susceptibilidade) da glândula mamária (RYNIEWICZ et al., 2002; RYNIEWICZ et al., 2003; ROOSEN et al., 2004; WOJDAK-MAKSYMIEC, 2005; BAGNICKA et al, 2007).

Cromossomo: 27; Localização: 27q13-q14



Figura 1. Esquema genômico do gene β -defensina 1 bovina.

Cromossomo: 27

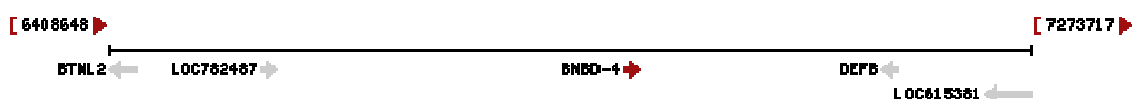


Figura 2. Esquema genômico do gene β -defensina 4 bovina.

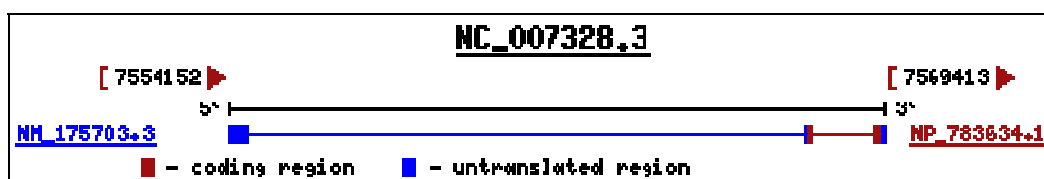


Figura 3. Esquema da região codificante e não codificante do gene β -defensina 1.

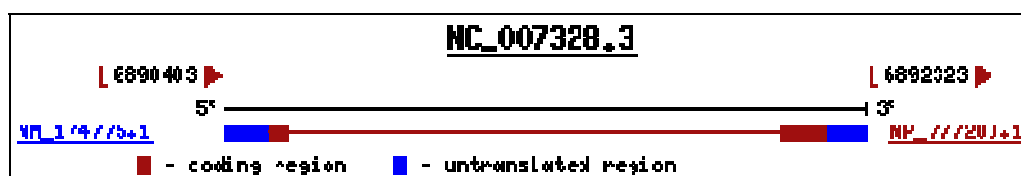


Figura 4. Esquema da região codificante e não codificante do gene β -defensina 4.

As técnicas moleculares aplicadas à genética e aliadas aos procedimentos tradicionais de melhoramento podem proporcionar maior ganho genético ao se

determinar o potencial do animal, antes que se expresse o fenótipo (STAUB et al., 1996; KLÜVER, 2006).

Para considerar o marcador genético, o locus marcador deve possuir variação detectável experimentalmente entre os indivíduos da população avaliada. A variação pode ir desde o fenótipo até a mudança de um só nucleotídeo (STAUB et al., 1996).

Os marcadores genéticos servem para relacionar favoravelmente alelos de características quantitativas e informação sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa e sua utilização prática na criação. As características onde a aplicação de marcadores na seleção pode ser efetiva são aquelas expressas tardiamente na vida do animal ou aquelas controladas por poucos pares de genes (MONTALDO & MEZA-HERRERA, 1998).

O uso de marcadores moleculares de DNA pode auxiliar o planejamento de estratégias de cruzamento em búfalos, melhorando a composição genética dos rebanhos para as características desejadas (BURZYNSKA & TOPZEWISKI, 1995; KLÜVER, 2006). O uso de marcadores baseados em DNA para a seleção assistida por marcadores é uma importante ferramenta para o mapeamento físico e de ligação do genoma com o fim de detectar e caracterizar QTL potenciais (DODGSON et al., 1997; VERMA, 2007).

Assim, a importância deste estudo está relacionada ao desempenho das β -defensinas em búfalos (*Bubalus bubalis*) e sua associação com a mastite através dos mecanismos do sistema imune. Existe alta probabilidade de que genes

codificantes para as β -defensina possam ser utilizados como potenciais marcadores de resistência da glândula mamária determinada geneticamente.

Neste sentido supõe-se que o uso da CCS em búfalas como critério de seleção e da associação entre o VGE para CCS pode ser afinado com o uso de marcadores moleculares, auxiliando o planejamento de estratégias de acasalamento com o intuito de melhorar a resistência à mastite dos rebanhos bufalinos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.B.C.B, **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos**, disponível em: www.bufalo.com.br. Acesso em: jan. 2009

ANDRIGHETTO, C., et al. Efeito da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, a produção de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, no.2, p.641-649. Abr 2005

BAGNICKA, E., STRZAŁKOWSKA, N., K. FLISIKOWSKI, T. SZREDER, A. JO´Z´WIK, B. PRUSAK, J. KRZY_ZEWSKI & L. ZWIERZCHOWSKI The polymorphism in the β 4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. **Journal of Animal Breeding Genetics**. v.124, p.150-156, 2007

BANOS, G.; SHOOK, G. Genotype by environment interaction and genetic correlations among parities for somatic cell count and milk yield. **Journal Dairy Science**. v.73, p.2563-2573, 1990

BARBANO, D. M., R. R. RASMUSSEN, AND J. M. LYNCH. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**. v.74, p.369–388, 1991

BERA, B., CHAUDHURY, P. BHATTACHARYA, A. K. BERA and S. K. DAS. Cloning, sequencing and expression of cDNA of bovine neutrophil β -defensin from water buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Immunogenetics**, v.34, p.173-179, 2007

BERNARDES, OTAVIO. Búfalos no Brasil. **Segundo Simposio de Búfalos Europa-América**, Medellín-Colômbia, p.18-24, 2006

BLOOD, D. C. AND RADOSTITS, O. M. **Veterinary Medicine**. 7th edition London: Baillière Tindall. p.5001-5059, 1991

BOETTCHER, P.; HANSEN, L.; VAN RADEN, P.; ERNST, C. Genetic evaluation of Holstein bulls for somatic cells in milk of daughters. **Journal Dairy Science**, v.75, p.1127-1137, 1992

BORGHESE, A. Buffalo Production and Research, Rome 2005 **FAO. Food Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

BURZINSKA, B.;TOPZEWISKI, J. – Genotyping of Bison bonasus κ - casein gene following DNA sequence amplification. **Animal Genetics**, v.26, p.335-336, 1995

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. – Contagem de Células Somáticas e Produção de Leite em Bufalinos. **Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, v.324, no.57, p.8-10, 2002a

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. - Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal Dairy Science**, v.85, p.2885-2889, 2002b

COFFEY, E.; VINSON, W.; PEARSN, R. Heritabilities for lactation average of somatic cell counts in first, second, and third or later parities. **Journal Dairy Science**, v.68, p.3360-3362, 1985

COFFEY, E.M.; VINSON, W.E.; PEARSON. R.E. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, p.2163-2172, 1986

DA, Y.; GROSSMAN, M.; MISZTAL, I.; WIGGANS, G.R. Estimation of genetic parameters for somatic cell scores in Holsteins. **Journal Dairy Science**, v.75, p.2265-2271, 1992

DHAKAL, I. P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. **Buffalo Journal**, v.20, no.3, p.261-70, 2004

DODGSON, J. B., CHENG, H. H., & OKIMOTO, R. I. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. **Poultry Science**. v.76, p.1108-1113, 1997

EMANUELSON, U.; DANELL, B.; PHILIPSSON, J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple trait restricted maximum likelihood. **Journal Dairy Science**, v.71, p.467-476, 1988

GADINI, C.H.; KEOWN, J.F.; VAN VLECK, L.D. Parâmetros genéticos das produções de leite, gordura e proteína, e do escore de células somáticas em 305 dias de produção. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 34. SBZ, 28 a 31 de julho de 1997, Juiz de Fora, MG. *ANAIS*. v.3, p.47-49, 1997

GRUET P., MAINCENT P., BERTHELOT X., KALTSATOS V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advantage Drug Delivery Reviews**, v.50, p.245–259, 2001

HAFEZ, A., EL-SOHAIFY. Accompaniment of the polymorphism at defensin gene loci with milk productivity in holstein friesian and egyptian cows **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.24, no.5-6, p.9-21, 2008

HARMON, R.J. Aspectos econômicos da mastite bovina. **Simpósio Internacional sobre qualidade do leite**, 1. UFPR/SCA, 8 a 11 de novembro de 1998, Curitiba, PR. *ANAIS*. p.36-39, 1998

KELM, S.C.; DEITILLEUX, J.C.; FREEMAN, A.E. et al. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1767-1775, 1997

KERR, D. and WELLNITZ, O. Mammary expression of new genes to combat mastitis. **Journal of Animal Science**. v.81, p.38-47. 2003

KIRK, J.H. Programmable calculator program for linear somatic cell scores to estimate mastitis yield losses. **Journal of Dairy Science**. v.67, p.441-443, 1984

KLÜVER, E., ADERMANN, K. and SCHULZ, A.. Synthesis and structure–activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system. **Journal of Peptide Science**. v.12, p.243–257, 2006

LARANJA, L.F. & AMARO, F. Contagem de células somáticas. Conceitos e estratégias de controle. **Balde Branco**. v.35, no.408, p.28-34, 1998

MANFREDI, E. J.; EVERETT, R.W.; SEARLE, S.R. Phenotypic and genetic statistics of components of milk and two measures of somatic cell concentration. **Journal Dairy Science**. v.67, p.2028-2033, 1984

MIRANDA, W. C. Criação de Búfalos no Brasil. São Paulo: **Editores dos Criadores**. p.15-39, 1986

MITCHELL J.M., GRIFFITHS M.W., MCEWEN S.A., MCNAB W.B., YEE A.J. Antimicrobiana drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal Food Protein**. v.61, p.742-756, 1998

MONARDES, H. G.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. Heritability of lactation cell count measures and their relationships with milk yield and composition in Ayrshire cows. **Journal Dairy Science**. v.67, p.2429-2435, 1984

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A.- Use of molecular markers in major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**. Disponible em:
<http://www.ejb.org/content/vol1/issue2/full/4/http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/livestock.pl>. Acesso em julho de 2008

NASH, D.L.; ROGERS, G.W.; COOPER, J.B. - et al. – Heritability of Clinical Mastitis Incidence and Relationships with Sire Transmitting for Somatic Cell Score, Udder type Traits, Productive Life, and Protein Yield. **Journal of Dairy Science**., v.86, p.2350-2360, 2000

PHILIPSSON, J., RAL, G.; BERGLUND, B. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. **Livestock Production Science**, , v.41, p.195-200, 1995

PICCINI, R.; MIARELLI, M.; FERRI, B.; TRIPALDI, C.; BELOTI, M.; DAPRÀ, V; ORLANDINI, S.; ZECCONI, A. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. **Journal of Dairy Research.** v.73, no.2, p.129-133, 2006

PÖSÖ, J.; MÄNTYSAARI, E.A. Relationships between clinical mastitis, somatic cell score, and production for the first three lactations of Finnish Ayrshire. **Journal Dairy Science.** v.79, p.1284-1291, 1996

RAMOS A. de A. Melhoramento genético de bufalinos. **Segundo Simposio de Búfalos Europa-América**, Medellín, Colômbia. p.96-115, 2006

REENTS, R., DEKKERS, J.C.M.; SCHAEFFER, L.R. Genetic parameters of test day somatic cell counts and production traits. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 5. Guelph, Canada. **Proceedings.** v.17, p.120-122, 1994

REENTS, R., JAMROZIK, J.; SCHAEFFER L.; DEKKERS, J. Estimation of genetic parameters for test day records of somatic cell scores. **Journal of Dairy Science.**, v.78, p.2847-2857, 1995

ROCHA LOURES. Buffalo production systems in Americas. **Proceeding of the Sixth World Buffalo**. Congress, Maracaibo, Zulia, Venezuela, 20 to 23 May. p.74-86, 2001

ROGERS, G. W. Index selection using milk yield, somatic cell score, udder depth, teat placement, and foot angle. **Journal Dairy Science**. v.76, p.664-670, 1993

ROOSEN, S.; EXNER, K.; PAUL, S.; Bovine β -defensin: Identification and characterization of novel bovine β -defensin genes and their expression in mammary gland tissue. **Mammalian Genome**. v.15, p.834-842, 2004

RYNIEWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. et al – Preliminary investigations on the polymorphism of defensin genes in cattle – relation with milk somatic cell count. **Animal Science Papers and Reports**. v.20, no.2, p.125-131, 2002

RYNIEWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. et al – Association of the polymorphism at defensin gene loci with dairy production traits and milk somatic cell count in Black-and-White cows. **Animal Science Papers and Reports**. v.21, no.4, p.209-222, 2003

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

SCHALM, O. M.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia:Lea & Febiger. p.360, 1971

SCHUTZ, M. M.; HANSEN, L.B.; STEUERNAGEL, G.R.; RENEAU J.K.; KUCK, A.L. Genetic parameters for somatic cells, protein, and fat in milk of Holsteins. **Journal Dairy Science**. v.73, p.494-502, 1990

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

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

SINGH, A.; SAINI, A. L.; RANDHAWA, S. S. Variation in somatic cell count in relation to udder health and milk quality in cross bred cows and buffaloes. **Journal of Livestock and Poultry Production**. v.18, no.3-4, p.52-62, 2002

SINGH, R. S.; BANSAL, B. K.; RANDHAWA, S. S.; MAVI, P. S. Effect of lactation therapy on quarter infection and milk composition in specific mastitis of buffaloes.

Indian Journal of Veterinary Medicine. v.24, no.1, p.16-18, 2004

STAUB, J. E. et al. Genetic markers, map construction, ADN their application in plant breeding. **HortScience.** v.31, no.5, p.729-741, 1996

SURIYASATHAPOM, W.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEM, M.; BRAND, A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in dairy herd.

Journal of Dairy Science. v.83, p.1248-1255, 2000

VERDI, R. J., D. M. BARBANO, M. E. DELLAVALLE, AND G. F. SENYK. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science.** v.70, p.230-242, 1987

VERMA, C., SEEBAH, S., SOO M. LEI Z, SHOU P L, JING LI and ROGER W. B. Defensins: Antimicrobiana peptides for therapeutic development. **Biotechnology Journal.** v.2, p.1353–1359, 2007

WELPER, R.D.; FREEMAN, A.E. Genetic parameters for yield traits of Holstein including lactose and somatic cell score. **Journal Dairy Science.** v.75, p.1342-1348, 1992

WILSON, D., GONZALES, N., AND DAS, H. H. Bovine mastite pathogens in new york and pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**. v.80, p.2592-2598, 1997

WOJDAK-MAKSYMIEC K, KMIEC AND A. ZUKIEWICZ M. Associations between Defensin Polymorphism and Somatic Cell Count in Milk and Milk Utility Traits in Jersey Dairy Cows. **Journal of Veterinary Medical**. v.53, p.495–500, 2006

GenBank, aceso N°AF016539 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em nov. 2007

GenBank, aceso N°AF008307 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em fev. 2008

GenBank, aceso N°AY301005 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em ago. 2008

CAPÍTULO 2 - PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E PRODUÇÃO DE LEITE DE BÚFALAS UTILIZANDO INFERÊNCIA BAYESIANA

RESUMO: Conhecer as estimativas dos parâmetros genéticos das características de importância econômica é fundamental nos programas de melhoramento genético dos búfalos leiteiros. No presente estudo foram estimados os parâmetros genéticos para a produção de leite total (P305) e a contagem de células somáticas (CCS) no leite de búfalas. Utilizaram-se 4.907 lactações, provenientes de 12 rebanhos do interior do São Paulo, com partos registrados no período de 1985 a 2008. A característica CCS foi transformada em escala logarítmica (CCSt). Os grupos contemporâneos foram definidos como rebanho, ano e estação do parto. Aplicou-se a restrição que cada grupo deveria conter no mínimo, quatro observações. Os componentes de (co)variância foram estimados por meio de inferência bayesiana, em análise bicaracterísticas, utilizando-se um modelo animal que incluiu os efeitos fixos de grupo contemporâneo, número de ordenhas e a idade da búfala ao parto como covariável (linear e quadrática) e os efeitos aleatórios genéticos aditivos, de ambiente permanente e residual. As estimativas posteriores de herdabilidade para P305 e CCSt obtidas pelas análises foram 0,25 e 0,27, respectivamente. A correlação genética entre P305 e CCSt é quase nula (0,06). Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que é possível incrementar a P305 e diminuir a CCSt por meio da seleção. A estimativa de correlação genética indica que é possível praticar a seleção simultânea destas

características ao longo do tempo. Assim, é possível aumentar a P305 sem influenciar a susceptibilidade à mastite.

PALAVRAS-CHAVE: herdabilidade, correlações genéticas, melhoramento, mastite, bufalinocultura

1. INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas (CCS) tem sido usada como uma importante ferramenta para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária. Além disso, pode ser empregada para a detecção de mastite subclínica em relação ao rebanho, para estimar as perdas de produção de leite em decorrência da mastite, e como indicador das características qualitativas e higiênicas do leite (SANTOS, 2002).

As células somáticas são liberadas dentro da glândula mamária durante uma infecção, cerca de 98% das células somáticas correspondem a células de resposta inflamatória. Essas células incluem macrófagos, leucócitos e neutrófilos, e, em uma glândula mamária sadia 60% desta contagem corresponde aos macrófagos (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

GADINI et al. (1997) observaram que, como a medida da CCS é mais fácil e mais econômica quando comparada com os testes bacteriológicos, esta tem se convertido numa ferramenta importante para o manejo de animais leiteiros. A CCS serve como um método preventivo por permitir o acompanhamento regular da situação individual dos animais em lactação, levando à diminuição da incidência de mastite nos rebanhos (RIBAS, 1994) e elevando a qualidade da matéria-prima que é enviada aos laticínios (ANDREWS et al., 1983).

ALLORE et al. (1998) indicaram que a contagem feita com amostras individuais é utilizada como medida de saúde do úbere, enquanto que a CCS das amostras do tanque de leite é usada como medida de qualidade. O uso da CCS para propósitos de seleção tem sido amplamente discutido, e acredita-se que a

seleção para diminuição da CCS pode reduzir a susceptibilidade à mastite (PHILIPSSON et al., 1995).

Por não possuir uma distribuição normal, a CCS deve ser transformada para uma escala logarítmica em escore de células somáticas, possibilitando assim o cálculo das perdas obtidas na produção de leite, em decorrência do aumento das células somáticas (GADINI et al., 1997).

A utilização de características associadas a doenças e à produção leiteira como critérios de seleção para melhoramento da resistência à mastite, visando minimizar perdas no sistema produtivo, encontra-se dependente da estimação acurada de componentes de (co)variância e parâmetros genéticos. Atualmente, grande parte das pesquisas realizadas emprega métodos frequentistas para obtenção destas estimativas. Através destes métodos são obtidas estimativas pontuais, não sendo possíveis outras inferências, além de ocorrer um aumento considerável do custo computacional quando da utilização de modelos mais complexos.

Tendo em vista as dificuldades impostas pelos métodos frequentistas, GIANOLA & FERNANDO (1983) propuseram a utilização de métodos bayesianos em melhoramento animal, sendo sua aplicação viabilizada pela implementação do algoritmo de Gibbs em modelos genéticos (WANG et al., 1993).

Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar as estimativas dos parâmetros genéticos da contagem de células somáticas e a produção leiteira, utilizando-se métodos bayesianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - *Consistência dos dados*

Neste estudo foram analisadas 4.907 lactações de 1.986 búfalas da raça Murrah, filhas de 140 reprodutores, provenientes de 12 rebanhos do interior do estado de São Paulo, com os partos registrados no período de 1985 a 2008. As características em estudo (produção total de leite e contagem de células somáticas) foram padronizadas a 305 dias de lactação. Por não apresentar distribuição normal, a contagem de células somáticas (CCS) foi transformada para uma escala logarítmica (CCSt), utilizando-se a função $CCSt = (\log_2(CCS/100.000)) + 3$, proposta por DABDOUB & SHOOK (1984).

As produções de leite foram obtidas a partir do quinto dia de produção, sendo o primeiro controle considerado até o 45º dia após o parto. As lactações com durações menores que 90 dias foram excluídas do arquivo de dados. As idades ao parto foram consideradas de dois até oito anos. Foram criadas duas estações de parto, sendo a estação 1, de outubro a março, e a estação 2, de abril a setembro. Para a formação de grupo contemporâneo (GC) utilizaram-se das seguintes variáveis: rebanho, ano e estação de parto, com a restrição de que cada GC deveria conter, no mínimo, quatro animais. Na análise, utilizou-se um arquivo de pedigree com 11.632 animais na matriz de parentesco. A estrutura geral dos dados é apresentada na Figura 1 e Tabela 1.

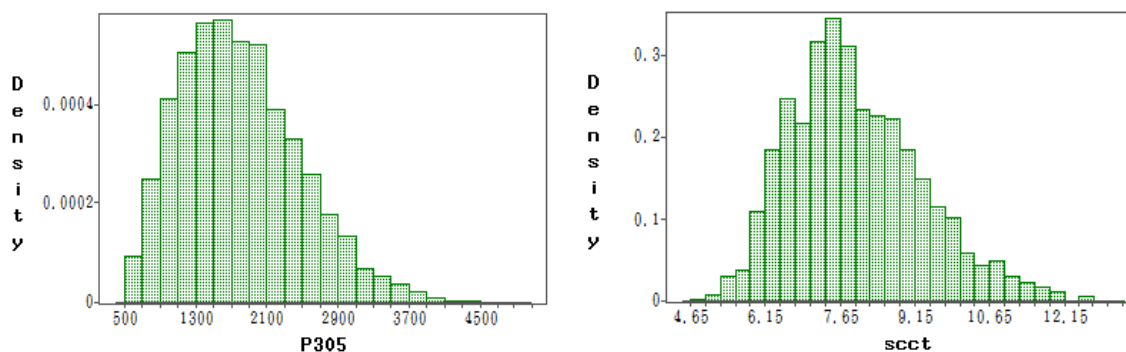


Figura 1 - Distribuição das observações das características P305 e CCSt estudadas em búfalas.

Tabela 1. Estrutura dos dados da P305 e da CCSt das búfalas em estudo.

Característica	N	Média	D.P	C.V (%)	Max.	Mín.	NGC
P305	4.905	1.813,81	524,17	38,44	5.016,80	13,12	197
CCSt	1.220	7,98	1,37	17,11	13.23	4,88	49

2.2- Inferência bayesiana e estimação de componentes de (co)variância

A análise bayesiana consiste em uma metodologia de inferir, na qual os parâmetros são tidos como variáveis aleatórias detentoras de distribuições “*a priori*” que refletem o estágio de conhecimento sobre eles, antes mesmo de se obterem os dados (GIANOLA & FERNANDO, 1983; BEAUMONT & RANNALA, 2004), sendo fundamentada na seguinte proporcionalidade:

$$p(\theta | y) \propto p(\theta)p(y | \theta)$$

em que, $p(\theta)$, $p(y|\theta)$ e $p(\theta|y)$ são, nesta ordem, a densidade de probabilidade “*a priori*” de θ ; a função de verossimilhança de y e; a densidade de probabilidade “*a posteriori*” de θ , sobre a qual são realizadas as inferências sobre determinado

parâmetro de interesse, através da determinação de estimadores pontuais (média, mediana e moda) e por intervalares (intervalos de alta densidade).

Pode-se verificar que ocorre uma atualização das informações contidas na distribuição “*a priori*” de θ , pela função de verossimilhança. Deste modo, a distribuição “*a posteriori*” contempla o grau de conhecimento prévio sobre o parâmetro e também as informações adicionais propiciadas pelos dados (BEAUMONT & RANNALA, 2004).

Os componentes de (co)variância para a produção de leite total e contagem de células somáticas foram estimados utilizando-se um modelo animal bicaracterístico, tendo como efeitos fixos o grupo de contemporâneos e número de ordenhas, e como covariável a idade da vaca ao parto (linear e quadrática) e, como efeitos aleatórios, os aditivos diretos, de ambiente permanente e residual. Para realização da análise bayesiana, empregou-se o algoritmo de Gibbs implementado no programa Gibbs2f90 (MIZSTAL, 2007). Em expressão matricial, temos o modelo:

$$y = X\beta + Za + Wp + e$$

em que, y , β , a , p e e são os vetores de observações, dos efeitos fixos, valores genéticos aditivos diretos, valores de ambiente permanente e efeitos residuais, respectivamente; X , Z , e W são, nesta ordem, as matrizes de incidência que associam β , a e p às observações. Admitiram-se as seguintes pressuposições:

$$\begin{bmatrix} y \\ a \\ p \\ e \end{bmatrix} \sim NMV \left\{ \begin{bmatrix} X\beta \\ \phi \\ \phi \\ \phi \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} ZGZ'+WPW'+R & ZG & WP & R \\ & GZ' & G \otimes A & \phi \\ & PW' & \phi & I \otimes P \\ & R & \phi & \phi & I \otimes R \end{bmatrix} \right\}$$

onde G, P e R são matrizes de (co)variância para efeitos aditivos diretos, de ambiente permanente e residual; A e I referem-se às matrizes de parentesco e identidade; e \otimes é o operador produto direto.

Como em contexto bayesiano todo parâmetro é considerado uma variável aleatória, assumiu-se “*a priori*” para β uma distribuição uniforme, que reflete um conhecimento prévio vago sobre este vetor. Para os componentes de (co)variância utilizou-se a distribuição Wishart invertida, que em caso univariado corresponde a uma distribuição qui-quadrada invertida (VAN TASSEL & VAN VELCK, 1996).

Foram geradas 1.500.000 amostras, considerando-se um período de (*burn-in*) de 50.000 amostras e coleta a cada 50. Para a obtenção de distribuições posteriores para os parâmetros genéticos, estes foram calculados vetor a vetor. Realizou-se análise através do programa Gibanal (VAN KAAM, 1997), visando verificar a convergência das cadeias e a obtenção de estimativas oriundas de amostras efetivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante os resultados obtidos verificou-se que o período de “*burn-in*” adotado foi suficiente para atingir a convergência em todos os parâmetros considerados. Uma vez que o amostrador de gibbs consiste em uma sequência de cadeias de Markov, muitas das amostras obtidas não contribuem para a obtenção das estatísticas em distribuições posteriores. Desta forma, após eliminação de amostras no *burn-in*, obtiveram-se as amostras efetivas, que determinam a distribuição.

Considerando o modelo utilizado, em que a complexidade é relativamente pequena, o número de amostras efetivas para os parâmetros (mínima de 462 e máxima de 14.997) foi suficiente para obtenção de medidas de tendência central e dos intervalos dos parâmetros estudados. As densidades posteriores dos parâmetros relacionados à produção de leite total apresentaram maior proximidade da normalidade (Figura 2), em relação às densidades referentes à CCS, sendo esta uma consequência do maior número de amostras efetivas obtidas no estudo da primeira característica.

As estimativas de herdabilidade para a produção de leite (Tabela 2) estão próximas às obtidas por TONHATI et al. (2000), RAMOS et al. (2006) e TONHATI et al. (2008), de 0,24, 0,21 e 0,22, respectivamente. Por outro lado valores de menor magnitude para esta característica (0,14) foram relatados por ROSATI e VAN VLECK (2002). A estimativa de herdabilidade para produção de leite apresentou magnitude moderada, indicando que existe suficiente variabilidade

genética aditiva para tornar eficiente a seleção de reprodutores e matrizes, no sentido de se obter ganhos para essa característica.

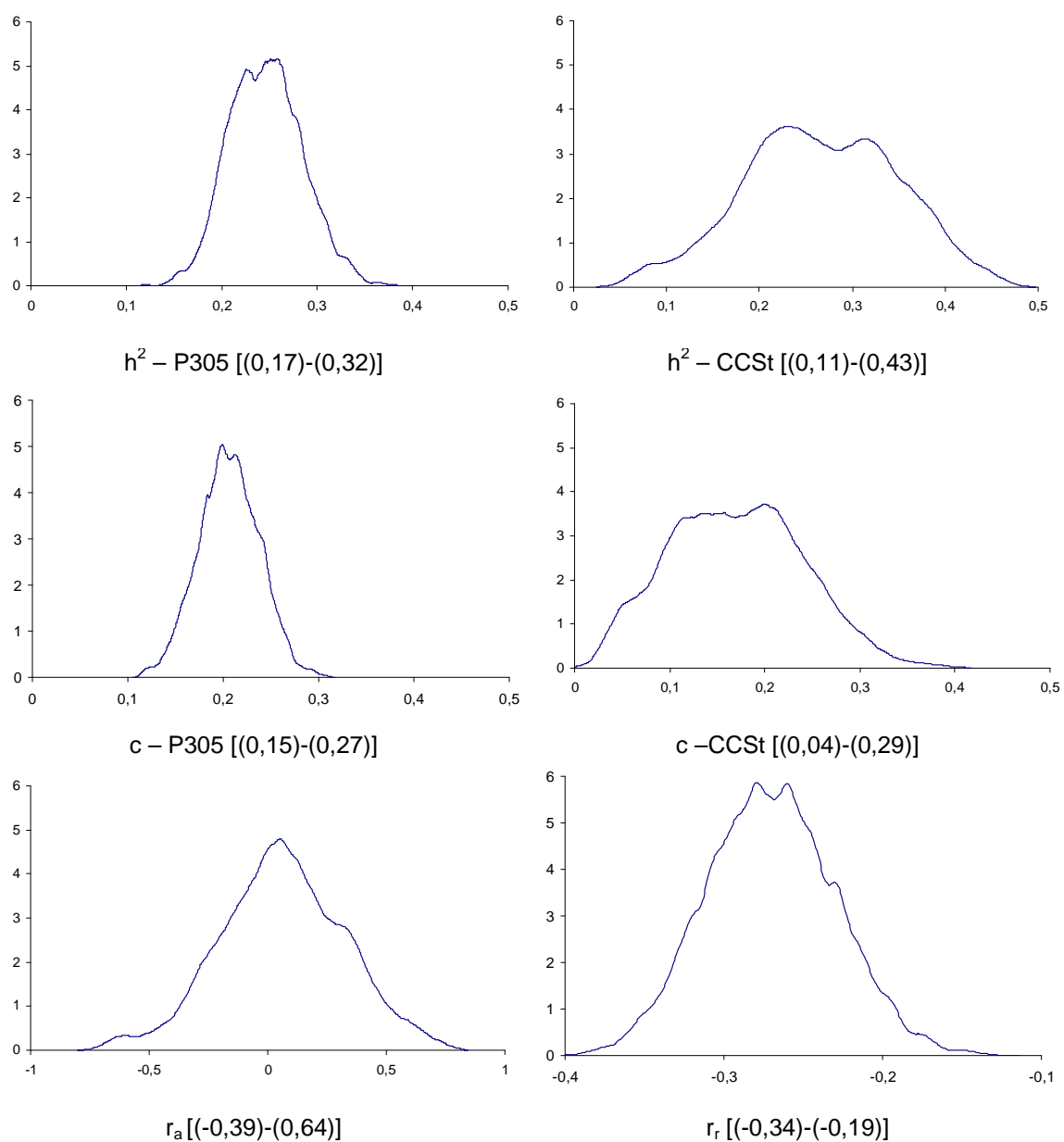


Figura 2 - Densidades "a posteriori" das herdabilidades (h^2), porção da variância devida a efeitos de ambiente permanente (c), correlação genética (r_a) e residual (r_r) para produção de leite total (P305) e contagem de células somáticas (CCSt) e respectivos intervalos de alta densidade (entre colchetes).

Tabela 2 – Estatísticas descritivas das distribuições “*a posteriori*” dos componentes de variância e parâmetros genéticos para a produção de leite total (P305) e contagem de células somáticas (CCSt).

Caract.	Parâmetro ¹	Média	D.P. ²
P305	σ_a^2	56918,56	9939,32
	σ_p^2	47413,52	7029,67
	σ_r^2	126641,13	3369,08
	h^2	0,25	0,04
	C	0,21	0,03
CCSt	σ_a^2	0,40	0,14
	σ_p^2	0,26	0,10
	σ_r^2	0,86	0,05
	h^2	0,27	0,08
	C	0,17	0,07

¹ σ_a^2 = variância genética aditiva; σ_p^2 = variância atribuída aos efeitos de ambiente permanente; σ_r^2 = variância residual; h^2 = herdabilidade; c = porção da variância total devida aos efeitos de ambiente permanente; ² desvio-padrão.

As altas contagens de células somáticas no leite causam redução nas concentrações de lactose, gordura, caseína, cálcio e potássio, como consequência disto uma redução no rendimento na fabricação de queijos e outros produtos lácteos. As análises estatísticas e genéticas para a contagem de células somáticas têm algumas deficiências, tais como: sua distribuição não é normal e

sua correlação com a produção de leite não é linear, todavia, o escore para células somáticas, transformação para \log_2 , resolve estes problemas e é aceito como uma escala padrão para a contagem de células somáticas (ALI & SHOOK, 1980).

As estimativas de herdabilidade para a contagem de células somáticas em bufalinos leiteiros são pouco estudadas. A estimativa de herdabilidade no presente trabalho foi próxima às relatadas por MENDOZA (2007), indicando que esta característica na espécie bufalina pode responder à seleção para resistência à mastite. Em bovinos leiteiros, os coeficientes de herdabilidade encontrados em diversos trabalhos mostraram grande variação nos resultados. Num trabalho descrito por WELLER et al. (1992), foram encontradas estimativas que variaram de 0,13 a 0,23, aplicando-se diferentes modelos e diferentes transformações para a CCS. Estimativas menores foram relatadas por KOIVULA et al. (2005), que reportaram valores de 0,07 e 0,08 para bovinos leiteiros de primeira e segunda lactação respectivamente. De maneira geral, em bovinos leiteiros, as estimativas de herdabilidade variaram de 0,10 a 0,14 (MODARDES, 1984; MODARDES & HAYES, 1985; BANOS & SHOOK, 1990; BOETTCHER et al., 1992; DA et al., 1992; DÜRR, 1995).

A correlação genética entre a produção de leite e a CCS foi muito baixa (0,06), sendo este resultado similar ao relatado por MENDOZA (2007), o qual relata uma correlação baixa negativa (-0,11) numa pesquisa feita igualmente com população bufalina do estado de São Paulo. MENDES et al (2005) encontraram uma correlação nula entre as características P305 e CCS que eles estudaram.

A baixa correlação genética entre as características em estudo pode ser explicada pelo fato de que os bufalinos ainda são uma espécie com pouca intensidade de seleção e a contagem de células somáticas pode estar relacionada com a rusticidade e adaptabilidade ao meio ambiente.

No estado inicial de melhoramento genético em que se encontra a produção de leite em bufalinos, a seleção para baixa contagem de células somáticas pode levar a ganhos genéticos para esta característica sem afetar a produção de leite aos 305 dias e diminuindo a suscetibilidade dos animais à mastite.

4. CONCLUSÕES

As estimativas de herdabilidade das características estudadas foram moderadas, indicando que existe variação genética entre os animais no sentido de se alcançar progresso genético na população mediante a seleção.

A baixa correlação genética entre a produção de leite e a contagem de células somáticas permite processos de seleção simultânea de ambas características sem afetar nenhuma delas.

5. REFERÊNCIAS

ALI, A.K.A.; SHOOK, G.E. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. **Journal of Dairy Science**. v.63, p.487-90, 1980.

ALLORE, H. G.; WILSON, D. J.; ERB, H. N.; AND OLTENACU, P. A. Selecting linearscore distributions for modeling milk-culture results. **Preventive Veterinary Medicine**, v 3, p.11-29, 1998.

ANDREWS, R. J., KITCHEN, B. J., KWEE, W. S., DUNCALFE, F. Relationship between individual cow somatic cell counts and the mastitis infection status of the udder. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 38, p.71-74, 1983.

BANOS, G.; SHOOK, G. Genotype by environment interaction and genetic correlations among parities for somatic cell count and milk yield. **Journal Dairy Science**, v.73, p.2563-2573, 1990.

BEAUMONT, M.A.; RANNALA, B. The bayesian revolution in genetics. **Nature Reviews/Genetics**, v.5, p.251-261, 2004.

BOETTCHER, P.; HANSEN, L.; VAN RADEN, P.; ERNST, C. Genetic evaluation of Holstein bulls for somatic cells in milk of daughters. **Journal Dairy Science**, v. 75, p.1127-1137, 1992.

DA, Y.; GROSSMAN, M.; MISZTAL, I.; WIGGANS, G.R. Estimation of genetic parameters for somatic cell scores in Holsteins. **Journal Dairy Science**, v.75, p.2265-2271, 1992.

DABDOUB, S. A. M.; SHOOK, G. E. Phenotypic relations among milk yield, somatic count cells, and mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p.163-164, supplement 1, 1994.

DÜRR, J.W. Associations between neutrophil potential phagocyte capacity in proven bulls and traits of economic importance in their daughters. Montreal: **McGill University, M.Sc. Thesis**, 75 p. 1995

GADINI, C.H.; KEOWN, J.F.; VAN VLECK, L.D. Parâmetros genéticos das produções de leite, gordura e proteína, e do escore de células somáticas em 305 dias de produção. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 34. SBZ, 28 a 31 de julho de 1997, Juiz de Fora, MG. *ANAIS*. v.3, p. 47-49, 1997.

GIANOLA, D.; FERNANDO, R.L. Bayesian methods in animal breeding theory. **Journal Animal Science**, v.63, p.217-244, 1983.

KOIVULA, M.; MANTYSAARI, E. A.; NEGUSSIE, E.; SERENIUS T. Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p.827–833, 2005.

MENDES, A. J., BARZON M. R., ANDRIGHETTO, C., MARINHO, S., PICCININ, A., CASSIANO, V., DOMINGUES, P., COLARES VILELA, L.

Correlação entre a Contagem de Células Somáticas, Produção e Composição do leite de Búfalas Murrah. 2005. file:///D:/7_Monograficos/997.htm

http://www.fmvz.unesp.br/bufalos/HPBufalos_files/Trab_Comp_Eventos/N-37.PDF.

Acesso em: 20/04/2009

MENDOZA, GEOVANNY. Estudo Genético e Quantitativo da Contagem de Células Somáticas em Bufalinos Leiteiros. **Tese. Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP-Jaboticabal**, 73p. 2007

MISZTAL, I. [2007]. BLUPF90 family of programs. Disponível em <<http://nce.ads.uga.edu/~ignancy/newprograms.html>>. Acesso em: 12/12/2007.

MONARDES, H. G.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. Heritability of lactation cell count measures and their relationships with milk yield and composition in Ayrshire cows.

Journal of Dairy Science, v.67, p.2429-2435, 1984.

MONARDES, H. G., J. F. HAYES. Genetic and phenotypic relationships between lactation cell counts and milk yield and composition of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1250-125, 1985.

PHILIPSSON, J., RAL, G.; BERGLUND, B. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. **Livestock Production Science**, v. 41, p.195-200, 1995

PHILPOT W. N. and NICKERSON S. C. Mastitis: counter attack. **Babson Bros, Naperville**. 150p. 1991.

RAMOS, A. A.; MALHADO, C. H. M.; CARNEIRO, P. L. S. et al. Caracterização fenotípica e genética da produção de leite e do intervalo entre partos em bufalinos da Raça Murrah. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, p.1261-1267, 2006.

RIBAS, N. P. Análise do leite. **Gado Holandês**, v.57, n.10, p 92-94, 1994.

ROSATI, A., VAN VLECK, L.D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production in Italian river buffalo population. **Livestock Production Science**, v.74, p.185-190. 2002.

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

SHOOK, G.E. Selection for disease resistance. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1349, 1989.

TONHATI, H., MUÑOZ, M. F. C., OLIVEIRA, J. A., DUARTE, J. M. C., FURTADO, T. P., TSEIMAZIDES, S. P., Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bufalinos **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29 (Suppl. 1): p.2051-2056, 2000.

TONHATI, H., MUÑOZ, M. F. C., OLIVEIRA, J. A., EL FARO L., LIMA A.L.F., ALBUQUERQUE L. G. Test-day milk yield as a selection criterion for dairy buffaloes. **Genetic and Molecular Biology**. v. 31, p.674-679, 2008.

VAN KAAM, J.B.C.H.M. GIBANAL – **Analyzing program for Markov Chain Monte Carlo sequences. Version 2.4**, Netherlands: 1997.

VAN TASSEL, C.P.; VAN VLECK, L.D. Multiple-trait Gibbs Sampler for animal models: flexible programs for bayesian and likelihood-based (co)variance component inference. **Journal Animal Science**, v.74, p.2586-2597, 1996.

WANG, C.S.; RUTLEDGE, J.J.; GIANOLA, D. Marginal inferences about variance components in a mixed linear model using Gibbs sampling. **Genetics, Selection and Evolution**, v.25, p.41-62, 1993.

WELLER, J. SARAN, A.; ZELIGER, Y. Genetic and Environmental Relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2532-2540, 1992.

CAPITULO 3 – CARACTERIZAÇÃO POR MEIO DE PCR-RFLP DOS GENES β -DEFENSINA 1 e 4 EM BÚFALOS.

RESUMO: As defensinas, também conhecidas como antibióticos naturais, são um componente importante do sistema imune inato dos mamíferos, o qual provê uma barreira antimicrobiana inicial na superfície da mucosa, olhos, vias respiratórias, pele e úbere, entre outras. Portanto, presume-se a grande importância das defensinas no setor leiteiro devido ao fato de que a mastite é a doença mais frequente neste tipo de exploração e sua principal causa são as infecções bacterianas. Neste sentido, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com gado bovino, principalmente nos genes β -defensina 1 e 4, tentando encontrar alguma associação de polimorfismos encontrados nestes genes com uma baixa contagem de células somáticas (CCS). Assim, o objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos por PCR-RFLP nos genes β -defensina 1 e 4 em búfalas e estabelecer associação dos genótipos com a CCS. O trabalho se desenvolveu utilizando-se 132 búfalas da raça Murrah com CCS determinada. A CCS foi estimada a partir de amostras coletadas no dia do controle leiteiro e considerou-se como indicador de status de saúde do úbere. Para a caracterização dos genes β -defensina 1 e 4 e posterior genotipificação das búfalas, utilizou-se a técnica de PCR-RFLP. Após conseguir a amplificação de seis pares de primers, fizemos genotipificações em dois deles e verificou-se que todas as amostras analisadas foram monomórficas. Com estes resultados não foi possível fazer associação de polimorfismos dos genes das β -defensinas com a CCS. Porém, a amplificação destes genes em búfalos foi importante para iniciar o trabalho de caracterização

destes genes das β -defensinas já que até o momento não estão descritos em búfalos.

Palavras-chave: defensinas, bufalinocultura, mastite, leite, imunogenética

1. INTRODUÇÃO

As β -defensinas são peptídeos multifuncionais com atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas, vírus e fungos. Além de sua atividade antimicrobiana, eles têm uma função como moléculas sinalizadoras no sistema imune e são quimioatraentes para linfócitos T, células dendríticas imaturas e monócitos (ROOSEN, 2004; KLÜVER, 2006; VERMA, 2007).

Devido à importância dos neutrófilos β -defensinas na resposta imune inata, os genes das β -defensinas dos animais de produção têm atraído muito a atenção, e assim têm sido caracterizados em muitos animais como os bovinos, cabras, ovelhas e suínos. Até o momento conhece-se muito pouco da quantificação, estrutura, sequência e genômica dos genes β -defensina no búfalo de água (*Bubalus bubalis*), apesar da alta contribuição na produção leiteira dos países tropicais (BERA, et al., 2007; HAFEZ, 2008).

A identificação de indivíduos que sejam resistentes a doenças é desejável, no entanto, difícil de ser realizada nas populações comerciais. O valor genético estimado (VGE) é baseado na informação fenotípica de um indivíduo e nos membros de sua família (STAUB, 1996).

As técnicas moleculares aplicadas à genética e aliadas aos procedimentos tradicionais de melhoramento poderão proporcionar maior ganho genético ao se determinar o potencial do animal, antes que se expresse o fenótipo (STAUB et al., 1996; KLÜVER, 2006). Para considerar o marcador genético, o locus marcador deve ter variação detectável experimentalmente entre os indivíduos da população avaliada (Detilleux, 2009).

Neste sentido supõe-se que o uso da CCS em búfalas como critério de seleção e da associação entre VGE para CCS pode ser refinado com o uso de marcadores moleculares em búfalas, com o qual existe a probabilidade de que estes genes codificantes para defensinas possam ser utilizados como potenciais marcadores de resistência da glândula mamária determinada geneticamente (Detilleux, 2009).

2.OBJETIVO

Identificar polimorfismos por PCR-RFLP nos genes β -defensina 1 e 4 e estabelecer associação dos genótipos com a CCS das búfalas analisadas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Rebanhos experimentais

Os estudos foram realizados utilizando-se 132 búfalas da raça Murrah de diferentes regiões do estado de São Paulo (Tabela 1) em diferentes estágios da lactação e que fazem parte do programa de controle leiteiro de bufalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da UNESP/Jaboticabal SP.

Foram determinadas as produções totais de leite, e a CCS a partir de amostras coletadas no dia do controle leiteiro e esta contagem foi considerada como indicador de *status* de saúde do úbere.

Tabela 1: Locais onde foram obtidas as amostras de DNA.

FAZENDAS	REGIÃO	Número de amostras
RIO PARDO	BOCAINA, SP	64
SANTA ELISA	DOURADO, SP	48
SÍTIO PAINEIRAS DA INGAÍ	SARAPUÍ, SP	20
TOTAL		132

3.2 Extração e integridade do DNA

Extraíu-se o DNA genômico do bulbo usando protocolos pelo método do fenol-cloroformo (AUSEBEL et al, 1995; FRITSCH et al, 1989). A visualização da pureza e concentração do DNA foi feita através de luz ultravioleta (UV) em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) (Figura 1).

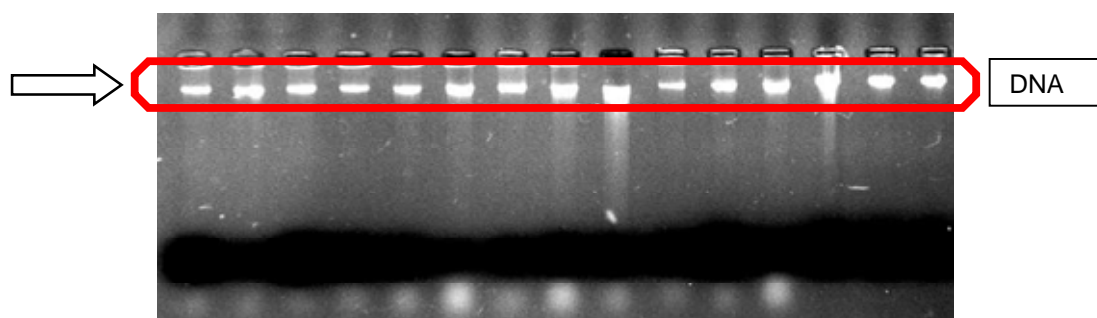


Figura 1: Eletroferograma da extração de DNA genômico extraído a partir de pêlos de búfalas seguindo o protocolo de extração.

3.3 Quantificação e qualidade do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas para a concentração e a qualidade usando o NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para esta quantificação foram utilizados 1.5µl do DNA extraído e, além de medir a quantidade de DNA baseado na absorbância a 260 nm, também foram

mensuradas duas variáveis de qualidade, a proporção 260/280 nm e 260/230 nm, as quais medem respectivamente a pureza do DNA e a presença de proteínas, fenol e outros contaminantes que podem absorver a 280 nm e a medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos através da presença de contaminantes copurificados.

3.4 Primers para β -defensina 1 e 4

As amplificações fizeram-se com base nos seguintes nove primers: o descrito por RYNIWICZ et al (2002 e 2003), em estudos feitos com gado Holandês na Polônia (Primer A, acesso GenBank AF016539); o descrito por BAGNICKA et al (2007) em estudos com gado Holandês (Primer B, acesso GenBank AF008307); mais quatro de acordo com as sequências depositadas no GenBank de regiões do gene da β -Defensina 4 (Primer C, D, E e F acesso GenBank AF008307); outros dois feitos de sequências do gene da β -Defensina entérico (Primers G e H, acesso GenBank EF489402 e DQ886701). E o último dos primers foi desenhado de acordo com uma sequência publicada do RNA mensageiro e alguns CDS da β -defensina 4 (Primer I, acesso EF418030) (Tabela 2).

Tabela 2. Primers utilizados para o estudo do gene β -defensina.

Nome do Primer	Primer 5' - 3'	Gene	Cod. Primer	Tamanho pb
FW_Bdef1	GCCAGCATGAGGCTCCAT	β def 1 bov	A	1638
RV_Bdef1	ACAGATTGGCACCTGTT			
FW_Bdef4	TGGCAGGAAGGAGGATGTAG	β def 4 bov	B	393
RV_Bdef4	ACGGCACAAGAACGGAATAC			
BDEF_IV_EX2 FW AF008307	GAAGGAGGATGTAGCAGAGCTTC	β def 4 bov Exon 2	C	494
BDEF_IV_EX2 RV AF008307	AGTTTCTGACTCCGCATTGGT			
BDEF_IV_E1 FW AF008307	ACCAGTTCCTAATAACCAAATCCA	β def 4 bov Exon 1	D	283
BDEF_IV_E1 RV AF008307	ATATGGTGGGTTTAGTCTGACCAC			
BDEF_IV_FW Intron	ACCAGTTCCTAATAACCAAATCCA	β def 4 bov Intron	E	1844
BDEF_IV_FW Intron	AGTTTCTGACTCCGCATTGGT			
B4_Poli FW	CTCAGCTCCACTACTTGACTGACTC	β def 4 bov	F	466
B4_Poli RV	AGAACGGAATACAGACACCCATATT			
FW EF489402	GATGTCAAATCAAGTTGAAAAGG	β def buf	G	217
RV EF489402	CCTTCCAGTCTTCCTCACAGG			
FW DQ886701	ACAGATGGCCTTCTTGAGATGC	β def buf	H	241
RV DQ886701	AGTTTCTATCTCCGCATCAGTCC			
FW_B-4_UAB EF418030	TCGTA CTCCGAGGTAGATGAGG	β def 4 buf RNA	I	680
RV_B-4_UAB EF418030	CTTGCCCACTGCTCACAGATT			

3.4.1 Desenho e características dos primers utilizados

Para o desenho dos primers A e B, foram utilizadas as sequências reportadas em estudos anteriores em gado bovino (RYNIEWICZ et al em 2002 e 2003, BAGNICKA et al 2007). Os outros sete primers (C, D, E, F, G, H e I) foram desenhados através do programa Primer3 (v. 0.4.0) (STEVE E SKALETSKY, 2000) a partir das sequências que se encontram no GenBank para o gene β -Defensina, RNAm da β -Defensina 4 e β -Defensina 4 entérica.

Estes primers foram desenhados com o intuito de tentar amplificar tanto íntrons quanto éxons, tendo como requisito fundamental: alta temperatura de melting (TM), alta especificidade por meio de um tamanho maior que 22pb e baixa quantidade de regiões GC.

Para o teste destes primers foram utilizadas amostras de DNA de gado Holandês do banco genético pertencente ao laboratório de genética molecular. A amplificação foi feita com base no protocolo descrito por RYNIEWICZ et al. (2002 e 2003) e BAGNICKA et al. (2007) para os primers A e B, respectivamente. Após comprovar que eles amplificaram bem, estes foram testados em DNA de búfalo. Da mesma forma, os primers C, D, E e F foram amplificados com DNA bovino devido ao fato de que a sequência utilizada era desta espécie e posteriormente foram testados em búfalos. Ao contrario, os primers G, H e I foram testados diretamente em búfalos, já que as sequências foram obtidas desta espécie.

3.5 Otimização da PCR

A reação de amplificação foi realizada de acordo com a programação para cada primer, as temperaturas ótimas para cada um deles foram obtidas através de uma PCR em gradiente. Foram realizados ajustes de ciclos, variação na quantidade e variedade das Taq polimerases e finalmente mudando-se as concentrações dos diferentes reagentes utilizados na PCR.

3.6 Digestão por enzimas de restrição do material amplificado

Após confirmar a amplificação procedeu-se a digestão dos amplificados com a enzima Taq I ou Nla III. Para este procedimento seguiu-se o protocolo sugerido pelos produtores da enzima (Promega 10U/ μ l), assim: RE 10X ``buffer'' 2 μ l; BSA acetilado, 10 μ g/ μ l 0,2 μ l; enzima de restrição 10U/ μ l 0,5 μ l; DNA amplificado 10 μ l. num volume final de 20 μ l. O tempo de digestão que se utilizou para cada enzima esteve de acordo com o intervalo sugerido pelo fabricante.

Após este procedimento, os fragmentos gerados nesta digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3%) em tampão TBE 1X (Tris-HCl 100 mM; EDTA 2,5 mM e ácido Bórico 100mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 μ /ml) a 100V, e posteriormente foi visualizado através de luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Biorad) onde foram obtidos diretamente os genótipos utilizando-se o tamanho das bandas.

3.7 Foto-documentação dos fragmentos digeridos

Após a digestão, os fragmentos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3%) em tampão TBE 1X (Tris-HCl 100 mM; EDTA 2,5 mM e ácido Bórico 100mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µ/ml) a 100V, e posteriormente foi visualizado através de luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Biorad) onde foram obtidos diretamente os genótipos utilizando-se o tamanho das bandas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos nove pares de primers utilizados neste estudo, conseguimos a amplificação de seis deles (A, C, D, E, G e H). Com estes primers, conseguimos a amplificação das 132 amostras de DNA de búfalos do estudo. O primer A gerou uma banda de 1.638pb (Figura 2), o primer C, 494pb (Figura 3), o primer D, 283pb (Figura 4), o primer E, 1.844pb (Figura 5), o primer G, 217pb (Figura 6) e o primer H, 241pb (Figura 7).

Nos primers A (β -defensina 1) e C (β -defensina 4), nos quais havia sido descrito um polimorfismo, procedeu-se a digestão por meio de sua respectiva enzima de restrição, porém, não foram detectados polimorfismos nestas amostras para nenhum dos primers. Devido a isto, não foi possível fazer associação de um determinado genótipo com as CCS das búfalas analisadas.

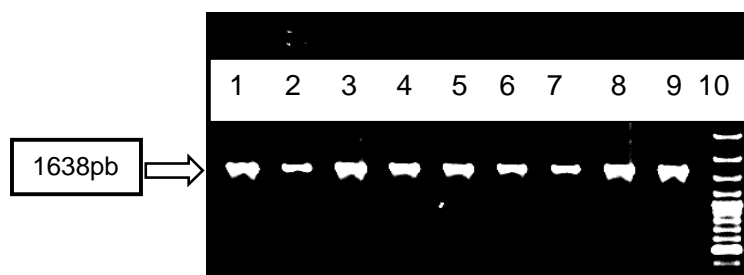


Figura 2. Electroferograma das amostras de Búfalos (1-9) do gene da β -defensina 1 (Primer A) (Gel 2% de agarose). Amostra 10 Ladder 1Kb.

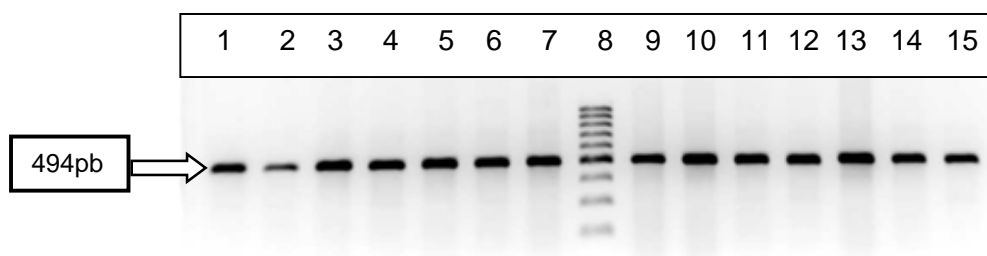


Figura 3. Electroferograma das amostras de Búfalos (1-7, 9-15) do exon 2 do gene da β -defensina 4 (Primer C) (Gel 2% de agarose). Amostra 8 ladder 100pb.

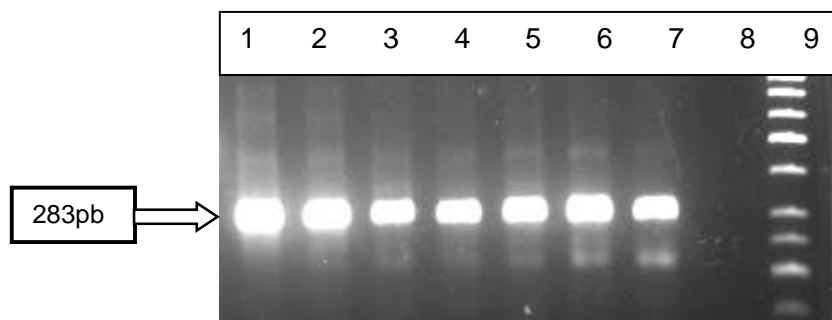


Figura 4. Electroferograma das amostras de Búfalos (1-7) do exon 1 do gene da β -defensina 4 (Primer D) (Gel 2% de agarose). Amostra 8 (negativa), amostra 9 (ladder 100pb).

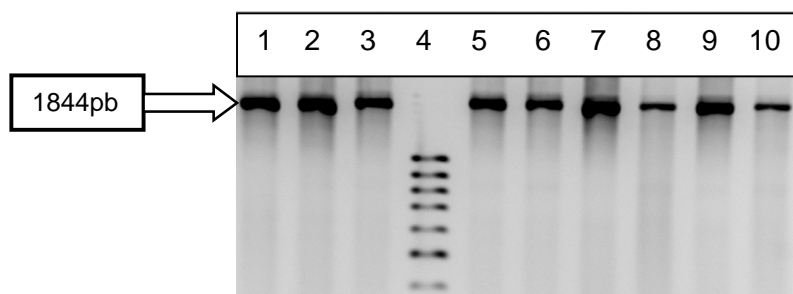


Figura 5. Electroferograma das amostras de búfalos (1-3, 5-10) do intron do gene da β -defensina 4 (Primer E) (Gel 2% de agarose). Amostra 4 (ladder 100pb).

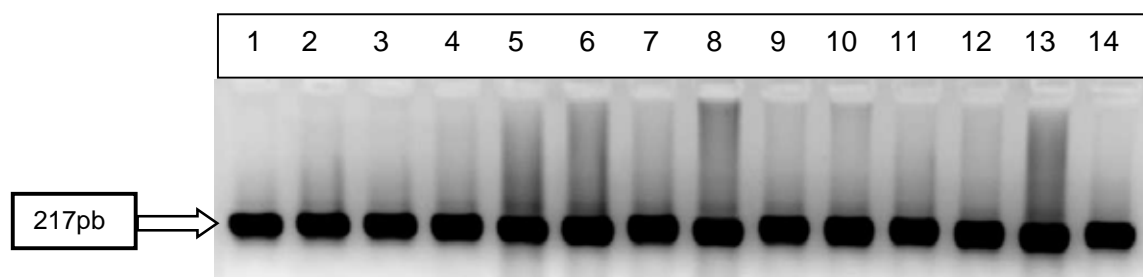


Figura 6 Electroferograma das amostras de búfalos (1-14) de seqüências parciais do gene entérico da β -defensina 4 (Primer G) (Gel 2% de agarose).

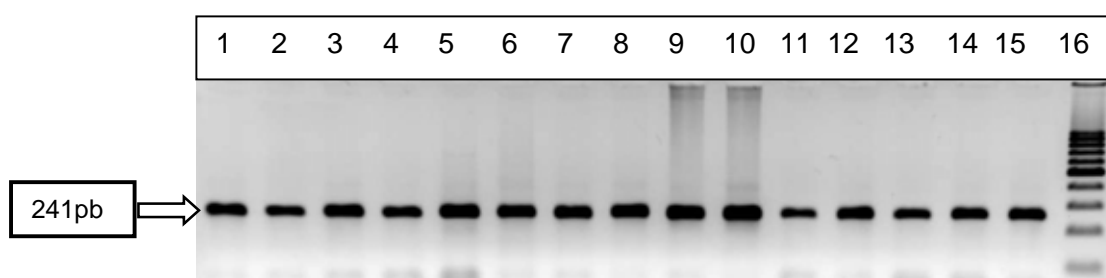


Figura 7 Electroferograma das amostras de búfalos (1-15) de seqüências parciais do gene da β -defensina 4 entérico, exon 2 e CDS parciais (Primer H) (Gel 2% de agarose). Amostra 16 (ladder 100pb).

Os estudos genéticos podem ser classificados de acordo com dois modos de ação para os genes associados a características com resistência à mastite: o enfoque de genes maiores e o poligênico, respectivamente. Mas, a distinção entre os modos de ação é teórica, pois, na realidade, poucas características são puramente mendelianas, puramente poligênicas ou puramente ambientais. A maioria das características depende em geral, de uma mistura de determinantes genéticos maiores e menores, junto com uma influência ambiental (Detilleux, J. C. 2009).

Em gado bovino leiteiro, muitos QTL para mastite clínica e contagem de células somáticas foram encontrados (Klungland, et al, 2001; Rupp & Boichard, 2003). Eles estão localizados em quase todos os 30 cromossomos bovinos, mas os QTL mais importantes para estas duas características foram encontrados nos cromossomos 3, 4, 9, 11, 18 e 27 (Detilleux, J. C. 2009). No cromossomo 27 bovino encontra-se o grupo das β -defensinas, que são um grupo de genes associados com migração neutrófila e são marcadores genéticos potenciais para a seleção, entre os quais o mais promissor até o momento é a β -defensina 4 (Krzyżewski et al., 2008). Porém, nesta pesquisa não foram encontrados o gene β -defensina 4, nem polimorfismos, todos os animais foram monomórficos (Primer C). Com estes resultados não foi possível fazer associação de um polimorfismo com a CCS. Embora este resultado é importante para começar a caracterizar este gene em búfalos por meio de sua sequenciação e procura de polimorfismos ou SNP por outros métodos que não foram abordados neste trabalho. O mesmo ocorreu com o gene β -defensina 1 (Primer A), no qual todas as amostras analisadas foram

monomórficas. Estes resultados podem ser explicados pela similaridade genética das populações estudadas, já que foram relativamente poucos os búfalos especializados na produção de leite que foram importados ao Brasil e que são utilizados nesta região, ou a que estes genes não são tão variáveis em búfalos quanto em bovinos.

A importância deste trabalho tem que ser ressaltada no sentido de conseguir a amplificação de diferentes pares de primer, os quais permitiram um melhor estudo da estrutura genética dos genes β -defensina 1 e 4 em búfalos, devido ao que até o momento se conhece muito pouco deles. É importante ter presente que o gene β -defensina faz parte de um complexo maior de genes associados à defesa inata do organismo, e que o estudo das bases genéticas para resistência ou susceptibilidade da mastite não devem ser estudados por componentes individuais ou separados como se fosse uma doença de tipo especificamente mendeliano e sim como um sistema no qual está envolvido numa rede de genes num sistema complexo.

5.CONCLUSÕES

A genotipificação de dois pares de primers (A e C) resultou em monomorfismos das amostras analisadas, não se comprovando associação das β -defensinas com a contagem de células somáticas.

A amplificação por PCR dos genes β -defensina 1 e 4 pode contribuir para a caracterização destes genes nos búfalos, já que até o presente momento não se conhecem suas respectivas sequências.

Ainda que os genes das β -defensinas tenham muitas regiões em comum entre bovinos e bufalinos, estas duas espécies têm diferenças relevantes nas sequências deste gene. Isto pode ser devido ao fato de que as β -defensinas constituem um grupo de genes do sistema imune primário, e este complexo apresenta grandes diferenças dentro e entre espécies, proporcionando uma maior variabilidade genética e assim maior *pool* genético que permita um amplo sistema de defesa da espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSEBEL, F; BRENT, R; KINGSTON, R; MOORE D; SERDMAN J.G; SMITH, J.A. and STRUN, K. **Current protocols in molecular biology**. 20 Ed. 900p. 1995.

BAGNICKA, E., STRZAŁKOWSKA, N., K. FLISIKOWSKI, T. SZREDER, A. JOŹWIK, B. PRUSAK, J. KRZYŻEWSKI & L. ZWIERZCHOWSKI. The polymorphism in the β 4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. **Journal of Animal Breeding Genetics**. v.124, no.3, p.150-156, 2007

BERA, B., CHAUDHURY, P. BHATTACHARYA, A. K. BERA and S. K. DAS. Cloning, sequencing and expression of cDNA of bovine neutrophil β -defensin from water buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Immunogenetics**. v.34, p.173-179, 2007

DETILLEUX, J. C. Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens. **Veterinary Microbiology**. v.134, p.157-164, 2009

FRITSCH E. F., SAMBROOK, J., MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. 1659p. 1989

HAFEZ, A., EL-SOHAIFY. Accompaniment of the polymorphism at defensin gene loci with milk productivity in holstein friesian and egyptian cows **Biotechnology in Animal Husbandry**. v.24, no.5-6, p.9-21, 2008

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

KLÜVER, E., ADERMANN, K. and SCHULZ, A.. Synthesis and structure–activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system. **Journal of Peptide Science**. v.12, p.243–257, 2006.

KRZYŻEWSKI, J., EMILIA BAGNICKA, NINA STRZAŁKOWSKA, ARTUR JÓŻWIK, BOŻENA PYZEL, LECH ZWIERZCHOWSKI. Association between the polymorphism of bovine β 4-defensin gene and milk traits in Holstein-Friesian cows as computed for standard (305 days) and the whole lactation. **Animal Science Papers and Reports**. v.26, no. 3, p.191-198, 2008

ROOSEN, S.; EXNER, K.; PAUL, S.; Bovine β -defensin: Identification and characterization of novel bovine β -defensin genes and their expression in mammary gland tissue. **Mammalian Genome**. v.15, p.834-842, 2004.

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

RYNIEWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. et al – Preliminary investigations on the polymorphism of defensin genes in cattle – relation with milk somatic cell count. **Animal Science Papers and Reports**. v.20, no.2, p.125-131, 2002.

RYNIEWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. et al – Association of the polymorphism at defensin gene loci with dairy production traits and milk somatic cell count in Black-and-White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, no.4, p.209-222, 2003.

STAUB, J. E. et al. Genetic markers, map construction, ADN their application in plant breeding. **HortScience**. v.31, no.5, p.729-741, 1996.

[STEVE ROZEN](#) AND HELEN J. SKALETSKY (2000) [Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers](#). In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: *Methods in Molecular Biology***. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, [Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>](#). Acesso em fev. de 2009

VERMA, C., SEEBAH, S., SOO M. LEI Z, SHOU P L, JING LI and ROGER W. B.
Defensins: Antimicrobiana peptides for therapeutic development. **Biotechnology
Journal**. v.2, p.1353-1359, 2007.

GenBank, aceso N°AF016539 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em nov. 2007

GenBank, aceso N°AF008307 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em fev. 2008

GenBank, aceso N°AY301005 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em ago. 2008

GenBank, aceso N°EF489402 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em abr. 2009

GenBank, aceso N°DQ886701 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast Acesso em abr. 2009