

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

VITOR KOSLOSKI

**QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO *Gpam* VIA qRT-PCR EM BOVINOS DA
RAÇA HOLANDESA**

PONTA GROSSA
2023

VITOR KOSLOSKI

**QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO *Gpam* VIA qRT-PCR EM BOVINOS DA
RAÇA HOLANDESA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Zootecnia da Universidade Estadual de
Ponta Grossa, para a obtenção do grau de
bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

PONTA GROSSA

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela minha vida, família, oportunidades e pela força para superar todos os desafios.

À minha família, meu pai Almir José Kosloski, minha mãe Josele Horodecki e minha irmã Luiza Kosloski, que sempre me apoiaram e incentivaram na escolha da minha futura profissão, estando ao meu lado em momentos difíceis, me dando forças para continuar meu caminho com fé e coragem.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari e também sua esposa Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari por despertarem em mim o interesse e a curiosidade crescente pela área da genética molecular, bem como por todos os ensinamentos, pela paciência e carinho que sempre demonstraram.

À Profa. Dra. Adriana de Souza Martins por aceitar o convite em compor a banca, por todos os ensinamentos durante o decorrer da graduação e pelo carinho e atenção que sempre demonstrou.

À Profa. Dra. Cheila Roberta Lehnen por aceitar meu convite em compor a banca examinadora, pelo auxílio e motivação no período do experimento, e pelos ensinamentos durante o decorrer da graduação.

Ao grupo de pesquisa Chromosome Biology: Structure and Function (CBSF Lab) pelo auxílio e ensinamentos passados e por me acolherem de forma tão gentil, em especial ao Dr. Matheus Azambuja dos Santos, por me ajudar durante as coletas e análises do experimento de forma tão solícita.

Também agradeço aos amigos que fiz durante a graduação: Angelo Soltes Filho, Aline Victória Sampaio, Daniela Moraes, Guilherme Jasluk Beber, Isabela Lourenço da Rosa, Julia Ribeiro, Lemuel de Ramos Moraes, Ligia Debetil, Lucas Hass, Renan Ribeiro, Verônica Sophia Degger, Tatiana Veigand. Pelo companheirismo do dia a dia, trabalhos, viagens, festas, experimentos e todos momentos memoráveis que tivemos juntos.

À Empresa Júnior de Zootecnia (CTZ) pelo conhecimento prático e vivência da profissão proporcionados por ela, além das grandes amizades que fiz com os membros que a compõem. Alavancando meu desenvolvimento profissional e

pessoal.

Aos amigos que fiz por meio do esporte, que sempre foi uma válvula de escape e forma de lazer que mantive em minha vida. Em especial a equipe de voleibol Fratelli e os membros que a compõem, como também aos meus vizinhos e amigos Andrew Wallace de Oliveira, Leticia Catarina Nazar, João Vitor de Oliveira Martins, Pedro Henrique Ott Marques. Pela amizade e companheirismo a qualquer hora, boas risadas e momentos incríveis que vivemos juntos.

E por fim, a todos os professores, mestres e doutores que fizeram parte de minha formação profissional e pessoal, me instruindo, inspirando e guiando da melhor forma possível. Aflorando em mim, a vontade de inspirar e guiar o próximo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Células somáticas do leite.....	10
1.2. Utilização de células somáticas.....	12
1.3. Impacto da genética na produção leiteira.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	17
2.1. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Coleta do Leite e extração do RNA total.....	18
3.2. Quantificação da expressão gênica.....	20
3.3. Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	28
7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

- ❖ **Figura 1.** Vias de biossíntese de glicerolipídeos **15**
- ❖ **Figura 2.** Relatório da plataforma Primer-Blast para o resultado do desenho dos *primers Gpam* em *Bos taurus* **21**
- ❖ **Figura 3.** Curva padrão para teste de eficiência do *primer Gpam* **21**
- ❖ **Figura 4.** Quantificação dos níveis de expressão do mRNA do gene *Gpam*.. **22**

LISTA DE TABELAS

- ❖ **Tabela 1.** Relatório de produção, desempenho e controle dos oito animais da raça Holandesa **17**

RESUMO

O desenvolvimento da bovinocultura leiteira evidencia sua importância econômica e social para a região dos Campos Gerais na constante busca por animais superiores ao que se refere à produção, bem estar e saúde. A utilização de mecanismos de avaliação genômica e de expressão gênica de forma não invasiva, se mostra uma alternativa promissora para o futuro do melhoramento genético e manejo animal. Dessa forma, a avaliação da expressão gênica por meio de amostras de leite apresenta uma tendência promissora para explorar uma análise em diversos períodos da vida produtiva das vacas. Nesse estudo, o objetivo foi avaliar a influência da contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite bovinos da raça Holandesa sobre a expressão de genes lipogênicos. O estudo foi realizado na Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON) no município de Ponta Grossa, onde foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa, selecionando animais com alta e baixa “CCS”, com base no controle leiteiro realizado previamente. As células somáticas do leite foram utilizadas para extração do RNA total e síntese de cDNA. A partir dessas informações foi realizada a análise da expressão quantitativa por meio da metodologia qRT-PCR, tendo como alvo o gene *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)*. Os *primers* para o desenvolvimento da qRT-PCR utilizando o gene *Gpam* foram desenvolvidos nesse estudo e testes comprovaram sua eficiência. Os dados obtidos não mostraram alteração significativa da expressão do *Gpam* entre o grupo de animais com baixa e alta CCS. Esses resultados são importantes pois representam que a quantidade de células somáticas no leite pode não ter interferência significativa na expressão de genes ligados ao metabolismo da gordura no leite. Dessa forma, o monitoramento da CCS não é uma variável essencial a ser analisada em experimentos que realizam suplementação lipídica ou de probióticos para a avaliação da expressão gênica em bovinos de leite.

Palavras chave: Bovinocultura de leite, raça Holandesa, leite, células somáticas, qRT-PCR.

ABSTRACT

The development of dairy cattle shows its economic and social importance for the Campos Gerais region in the constant search for superior animals in terms of production, well-being and health. The non-invasive use of genomic evaluation and gene expression mechanisms is a promising alternative for the future of genetic improvement and animal management. Thus, the evaluation of gene expression through milk samples presents a promising tendency to explore an analysis in different periods of the productive life of cows. In this study, the objective was to evaluate the influence of somatic cell count (SCC) in Holstein bovine milk samples on the expression of lipogenic genes. The study was carried out at Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON) in the municipality of Ponta Grossa, where eight Holstein cows were used, selecting animals with high and low "CCS", based on the previously performed dairy control. Milk somatic cells were used for total RNA extraction and cDNA synthesis. Based on this information, quantitative expression analysis was performed using the qRT-PCR methodology, targeting the Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam) gene. Primers for the development of qRT-PCR using the Gpam gene were developed in this study and tests proved their efficiency. The data obtained did not show significant change in Gpam expression between the group of animals with low and high CCS. These results are important because they represent that the amount of somatic cells in milk may not have significant interference in the expression of genes linked to the metabolism of fat in milk. Thus, CCS monitoring is not an essential variable to be analyzed in experiments that perform lipid or probiotic supplementation for the evaluation of gene expression in dairy cattle.

keywords: Dairy cattle, Holstein breed, milk, somatic cells, qRT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

O estudo das células somáticas do leite é de extrema importância para a indústria leiteira e para a pesquisa científica. Com uma melhor compreensão dessas células e de seu papel na produção e qualidade do leite, é possível obter avanços significativos na saúde animal, na produção leiteira e na qualidade dos produtos lácteos, beneficiando tanto os produtores quanto os consumidores. Além disso, a utilização de células somáticas como ferramenta de estudo da expressão gênica e na genômica traz avanços promissores para a pecuária leiteira, impulsionando a seleção de animais superiores e contribuindo para a sustentabilidade e a evolução da indústria (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

1.1. Células somáticas do leite

As células somáticas do leite são um grupo diverso de células encontradas no leite, particularmente na glândula mamária de animais lactantes, incluindo vacas, cabras, ovelhas e humanos. Tais células desempenham um papel vital na manutenção da saúde e qualidade do leite (BOUTINAUD; JAMMES, 2002). Esse grupo de células é composto principalmente por leucócitos, células epiteliais e outros tipos de células que são liberadas da glândula mamária para o leite durante o processo de lactação, caracterizando assim um modelo consistente para estudo da lactogênese, interações ambientais, imunidade e transmissão de vírus (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

As células somáticas são classificadas em duas categorias principais: células funcionais e células não funcionais (KNIGHT et al., 1998; LINDMARK-MÅNSSON et al., 2006). Células funcionais, como por exemplo as células epiteliais mamárias e leucócitos, estão envolvidas na produção de leite e desempenham um papel crítico na defesa imunológica contra patógenos que podem entrar no úbere (KNIGHT et al., 1998; LINDMARK-MÅNSSON et al., 2006). Células não funcionais, como os glóbulos vermelhos e células mortas, não desempenham um papel significativo na produção e qualidade do leite (KNIGHT; PEACKER; WILDE, 1998; LINDMARK-MÅNSSON et al., 2006).

O estudo das células somáticas é essencial para o entendimento da produção e qualidade do leite, bem como da resposta imune da glândula mamária. O número e a composição das células somáticas no leite são influenciados por vários fatores, como estágio de lactação, raça, ordem de parição, manejo da ordenha e estado de infecção da glândula mamária (BOUTINAUD; JAMMES, 2002; LI et al., 2014). Essas células são responsáveis pela síntese e secreção de inúmeros componentes, como proteínas, lipídios e oligossacarídeos (KNIGHT; PEACKER; WILDE, 1998; LINDMARK-MÅNSSON et al., 2006).

Em vacas leiteiras, a mastite subclínica, caracterizada pelo aumento do número de células somáticas no leite é uma doença prevalente e “dispendiosa”, que pode reduzir a produção e a qualidade do leite. Além disso, altas contagens de células somáticas no leite podem afetar suas propriedades de processamento, como a capacidade de formar uma espuma estável para produção de derivados do leite (RAINARD; RIOLLET, 2006).

No entanto, a presença de células somáticas no leite também pode ter efeitos negativos no que se refere a qualidade do leite, pois altos níveis podem indicar condições de inflamação, infecção ou estresse, o que pode afetar a produção, composição e vida útil do produto (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

Nos últimos anos, foi possível observar um interesse crescente no estudo das células somáticas do leite. Muito se faz devido ao seu potencial uso como ferramenta de diagnóstico de forma não invasiva para monitorar a saúde da glândula mamária e identificar mastites subclínicas (RAINARD; RIOLLET, 2006). Além disso, são consideradas uma fonte de células-tronco que podem ser usadas para medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Assim, uma melhor compreensão de tal grupo celular e seu papel na produção e qualidade do leite pode levar a melhorias na saúde animal, na produção de leite e na saúde humana (RAINARD; RIOLLET, 2006; BOUTINAND; JAMMES, 2002).

Dessa forma, as células somáticas do leite desempenham um papel crucial na qualidade do leite, influenciando suas propriedades nutricionais e higiênicas. As células somáticas, particularmente os leucócitos, estão envolvidas na resposta imune da glândula mamária, o que ajuda a prevenir e combater infecções (BOUTAUD; JAMMES, 2002).

1.2. Utilização de células somáticas

Estudos de transcriptoma apontaram o elevado grau de similaridade dos genes expressos na glândula mamária em comparação com às células somáticas do leite (CÁNOVAS et al., 2014). Dessa forma, a utilização de células somáticas do leite como material de estudo da expressão gênica se mostra uma ferramenta promissora de avaliação não invasiva, descartando a necessidade de coleta de material tecidual da glândula mamária (BOUTINAUD; JAMMES, 2002; CÁNOVAS et al., 2014). A utilização das células somáticas e a não necessidade de biópsia da glândula mamária ou coleta de tecido após o abate do animal, melhoram os resultados em estudos de expressão (BECKER et al., 2021). Isso se deve ao fato da ampla diversidade de tipos celulares que compõem o tecido da glândula mamária, como de células epiteliais, mioepiteliais, fibroblastos e adipócitos, os quais geram uma possibilidade de desvio dos resultados das análises de transcrição global conforme a composição celular da amostra (BECKER et al., 2021).

Ainda segundo Becker (2021), a possibilidade de utilização dessa metodologia avaliativa permite uma amostragem repetitiva de um mesmo animal, em diferentes períodos da lactação, de forma a não interromper ou reduzir sua produção por procedimentos invasivos, permitindo assim o desenvolvimento de potenciais estudos de forma mais dinâmica em relação à regulação transcricional da expressão de genes em diferentes períodos da vida produtiva da vaca.

1.3. Impacto da genética na produção leiteira

Na pecuária leiteira, a raça Holandesa tem grande destaque na produção devido elevado potencial produtivo e também pela composição do seu leite (relativo a porcentagem de sólidos totais), além de sua adaptabilidade a diferentes sistemas de produção, tornando-se extremamente importantes do ponto de vista econômico e produtivo. Por essa razão, a seleção de animais superiores mostra-se em constante crescimento, mesmo embora a produção de leite possa sofrer influência de fatores como a composição do leite, raça dos animais, ordem de parto, estágio de lactação e outros fatores ambientais. A produção de sólidos e o volume de leite total ainda são potenciais alvos para estudos no campo da genômica, devido a sua elevada influência econômica (VARGAS et al., 2002).

A avaliação genômica como ferramenta de melhoramento genético desempenha um papel fundamental na cadeia produtiva de leite, explorando a potencial seleção de animais a partir de genes de interesse produtivo. É possível observar que a partir dessas análises do genoma pode-se identificar marcadores genéticos associados a características produtivas muito estudadas na atualidade, como a saúde de úbere e qualidade do leite, visando sempre a seleção com maior grau de precisão e eficiência de animais superiores (GODDARD; HAYES; COLE; VANRADEN, 2018).

O uso da genômica na produção leiteira foi intensificado justamente pela aceleração do progresso genético que ela permite, visto que as técnicas de seleção utilizadas anteriormente foram baseadas em características visíveis, tais como de conformação, histórico produtivo de linhagens anteriores ou de animais que compartilham material genético (meia-irmãs) já em fase produtiva. Portanto, nestas situações, a avaliação se limitou a analisar os parâmetros simplificados, já que a quantificação de várias características de interesse produtivo são de difícil mensuração ou demandam muito tempo para serem coletadas (GODDARD; HAYES; COLE; VANRADEN, 2018).

Com a utilização dessas novas tecnologias, é possível ao produtor realizar a genotipagem de animais jovens, conseguindo assim obter informações do potencial daquele animal, antes mesmo dele iniciar seu período produtivo, com controle mais assertivo do futuro do rebanho e, por consequência, aumentando a eficiência do melhoramento genético na propriedade. A identificação e seleção de animais superiores para as características desejadas pode ser feita de forma mais precoce, acelerando o ganho genético do rebanho por completo (GODDARD; HAYES, 2018).

O desenvolvimento de tecnologias de genotipagem faz com que seja possível a identificação de indivíduos com alelos associados a doenças, haplótipos letais ou predisposições genéticas, não desejáveis do ponto de vista produtivo. Assim, uma maior precisão no gerenciamento dos acasalamentos é possível com vistas à redução da incidência dessas doenças genéticas no rebanho, melhorando por consequência a saúde e bem-estar dos animais. Com isso, haverá um incremento genético que resulta na redução de potenciais prejuízos produtivos relacionados a problemas de cunho genético (GODDARD; HAYES; COLE; VANRADEN, 2018).

Atualmente, diversas técnicas são utilizadas pelos melhoristas na produção de bovinos leiteiro, sendo exemplos a genotipagem de marcadores moleculares e o sequenciamento de nova geração (GWAS). Estas são ferramentas que conseguem realizar uma análise completa do genoma do indivíduo, resultando em uma grande quantidade de dados genéticos que são combustíveis que alimentam as avançadas ferramentas de bioinformática (GODDARD; HAYES, 2018).

Sendo assim, a utilização de técnicas de seleção genética a partir de avaliação genômica se mostra vital na bovinocultura leiteira, pois acarreta em grande avanço na seleção de rebanhos superiores em menor tempo, acelerando assim o progresso genético e aumentando os índices produtivos de forma eficiente e adaptando-se mais rapidamente às necessidades da indústria e do consumidor quanto à qualidade, saúde e bem-estar do rebanho (GODDARD; HAYES, 2018).

Por outro lado, estudos que envolvem a análise da expressão de genes em animais de produção ainda são escassos. Nos bovinos de leite, devido a possibilidade de utilização de células somáticas para as análises de expressão, esses estudos se mostraram promissores em auxiliar no entendimento do funcionamento gênico sob diferentes condições de manejo (MEDRANO; RINCON; ISLAS-TREJO, 2010; WICKRAMASINGHE et al., 2012).

Entre os principais conjuntos de genes expressos nas células somáticas do leite estão os que codificam caseínas, proteínas do soro de leite, enzimas envolvidas na via de síntese de lactose, proteases endógenas, antioxidantes, genes envolvidos no metabolismo da gordura, além de inúmeros outros (WICKRAMASINGHE et al., 2012). O metabolismo da gordura do leite na glândula mamária, devido sua importância, pode ser subdividido em alguns processos distintos: absorção de ácidos graxos, síntese de novo de ácidos graxos, dessaturação de ácidos graxos, esterificação de ácidos graxos, regulação da síntese dos ácidos graxos e secreção de gordura do leite. Inúmeros são os genes envolvidos em cada um desses processos, os quais podem sofrer drásticas alterações em sua expressão devido a dieta (MEDRANO; RINCON; ISLAS-TREJO, 2010; WICKRAMASINGHE et al., 2012).

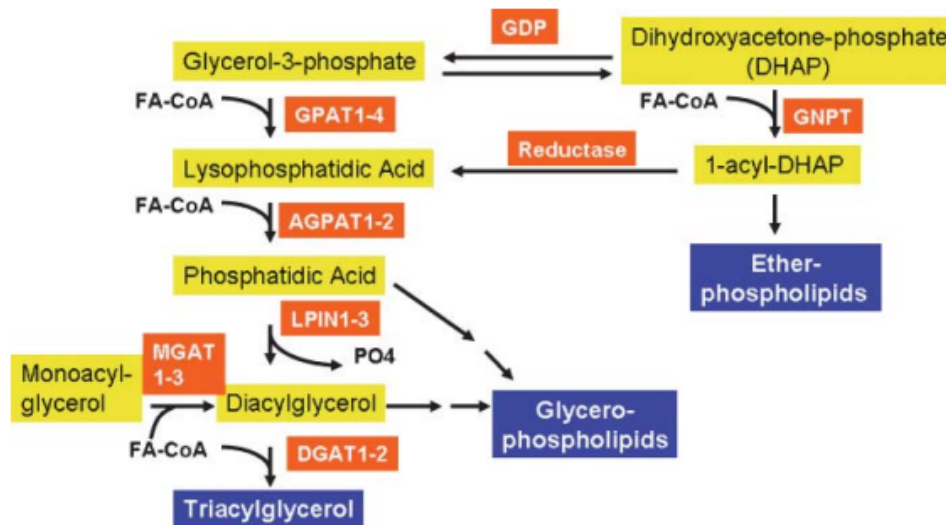
O gene *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)* atua na via de esterificação de ácidos graxos (WICKRAMASINGHE et al., 2012). A biossíntese de

triacilgliceróis (TAG) no leite ocorre nas células epiteliais mamárias, por meio da adição gradual por diferentes aciltransferases de grupos acil-graxo ativados ao glicerol-3-fosfato (COLEMAN; MASHEK, 2011). O primeiro e limitante passo na via de biossíntese de TAG é catalisado por aciltransferases de glicerol-3-fosfato (GPAT) que adicionam grupos acil-graxo à posição sn-1 do glicerol-3-fosfato, levando à produção de monoacilgliceróis (MAG). As principais isoformas GPAT conhecidas por serem expressas na glândula mamária bovina são a *Gpam* e a *1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (AGPAT6)* (COLEMAN; MASHEK, 2011).

A segunda etapa na via de biossíntese de TAG é catalisada por AGPAT, que adiciona grupos acil-graxo à posição sn-2 no esqueleto do glicerol, levando à conversão de MAG em diacilglicerol (DAG), também chamado de ácido fosfatídico (NAFIKOV et al., 2014). A *1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (Agp1)* é a segunda isoforma AGPAT mais expressa na glândula mamária bovina e parece ser responsável por catalisar esta etapa da via em ruminantes (COLEMAN; MASHEK, 2011). O DAG deve ser desfosforilado antes de avançar para a etapa final da biossíntese de TAG (COLEMAN; MASHEK, 2011; NAFIKOV et al., 2014). A enzima que catalisa a remoção de um grupo fosfato de DAG é chamada fosfatidato fosfatase ou lipina (LPIN), que tem sua principal isoforma expressa por *Lipin 1 (Lpin1)* na glândula mamária bovina (REUE; BRINDLEY, 2008; COLEMAN; MASHEK, 2011; NAFIKOV et al., 2014).

A etapa final da via de biossíntese de TAG é catalisada por *Diacylglycerol transferase 1 e 2 (DGATs)* que adicionam grupos acil-graxo à posição sn-3 no esqueleto do glicerol, levando à produção de TAG (COLEMAN; MASHEK, 2011; NAFIKOV et al., 2014), exemplificado na figura 1.

Figura 1. Vias de biossíntese de glicerolípideos.



Fonte: GIMENO;CAO, 2008.

Nesse panorama, para análises da expressão gênica em leite bovino, é essencial conhecer se as diferentes condições de CCS interferem na expressão de genes do metabolismo do leite. De posse dessa avaliação será possível determinar se há a necessidade de inclusão de mais esta variável nos grupos amostrais submetidos à dietas suplementadas. Com isso, será possível a obtenção da análise de perfis de expressão gênica em células somáticas do leite em bovinos submetidos a dietas com suplementação de fontes lipídicas ou de probióticos pode auxiliar no reconhecimento de vias bioquímicas e reguladores genéticos que atuam diretamente em parâmetros de interesse comercial.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi verificar se há a alteração da expressão gênica do *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)* em amostras de leite de bovinos da raça Holandesa com baixa e alta CCS.

2.1. Objetivos Específicos

- Padronizar o método de extração de RNA total a partir de células somáticas do leite bovino;
- Desenhar pares de *primers* específicos para a amplificação e quantificação da expressão de genes relacionados ao metabolismo da gordura no leite de bovinos;
- Obter a quantificação da expressão gênica via qRT-PCR do gene *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)* em bovinos da raça holandesa.
- Avaliar a influência da contagem de células somáticas em relação à expressão do gene *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)* em bovinos da raça holandesa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do Leite e extração do RNA total

As amostras de leite utilizadas no experimento foram coletadas de vacas da raça Holandesa, com valores de alta contagem de células somáticas (CCS > 300) (n = 4) e animais com baixa (CCS < 100) (n = 4), segundo a análise realizada pelo Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros (Tabela 1). Na Fazenda Escola da UEPG, as vacas são ordenhadas duas vezes ao dia, às 7:00h e às 15:00h, em sistema de ordenha canalizado, com extrator automático de teteiras. Os protocolos utilizados no manejo dos animais e nas coletas de leite para o experimento estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPG (processo CEUA – SEI 23.000017438-0).

Oito vacas Holandesas em lactação na FESCON foram selecionadas para o estudo com base nos seus resultados para CCS obtidas no dia 31/05/2023 pela PARLEITE (Tabela 1). Quatro dessas vacas selecionadas foram classificadas com baixa CCS, variação de 34.000 a 72.000 células/mL, e quatro amostras foram classificadas com alta CCS, variação de 770.000 a 2.301.000 células (Tabela 1).

Tabela 1. Relatório de produção, desempenho e controle dos oito animais da raça Holandesa utilizados neste estudo.

R	REGISTRO	APELIDO	IDADE	PARTO	LAC	DIAS	No	LEITE	PERS	%	%	%	%	cel/mL	mg/dL	LEITE	PROJ	PROJ
					LAC	LAC	CON	(litros)		GOR	PROT	LACT	SOL	CCS	URÉIA	ACUM	305	ADULTA
H	BX592561	ALANA	04/05	22/08/22	3	282	3	20,0	95	4,50	3,55	4,47	13,50	34	10,0	5218,6	5427,4	6078,7
H	BR1938685	FANNI	04/06	06/05/23	3	25	1	34,8	0	5,20	3,27	4,60	14,01	29	11,30	810,0	7208,7	7713,3
H	BR1810662	FILO	07/05	19/09/22	5	254	2	26,7	98	3,91	3,0	4,51	12,34	72	12,0	6761,5	7437,6	7437,6
H	SR9088985	LISA	04/03	19/03/23	3	73	2	35,2	106	4,21	3,03	4,75	12,89	39	12,0	2556,2	7924,2	8003,5
H	BR1828964	CLARA	05/07	09/04/23	4	52	1	37,7	0	4,03	2,84	4,49	12,27	2301	7,60	1911,4	8219,0	8219,0
H	BR1938693	IRENE	02/07	30/10/22	1	213	2	18,3	91	3,74	3,41	4,40	12,52	770	8,90	4232,8	5544,9	6931,1
H	BR1938697	LAURA	02/06	27/11/22	1	185	2	24,1	100	4,34	3,65	4,49	13,47	1149	12,0	4694,0	6900,2	8349,2
H	SR9140468	MIMOSA	02/12	25/11/22	1	187	2	15,1	93	3,61	3,42	4,35	12,36	1774	11,20	2922,3	4003,5	4003,5

R = Raça, Holandesa (H)

Lac = Ordem de Lactação

Nº Con = Número de controles leiteiros

Idade = Idade em anos/ mês de nascimento

Fonte: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) - Parleite.

Foram coletados 100 mL de leite de cada vaca, na ordenha da manhã de forma manual. As amostras de leite foram armazenadas em dois tubos *falcon* estéreis de 50 mL, com a identificação respectiva de cada animal. As amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo e levadas ao laboratório de “Biologia cromossômica: Estrutura e Função” da UEPG, onde foram processadas e analisadas.

Os processos de separação e lavagem do precipitado de células seguiram os protocolos de Mura *et al.* (2013) com modificações. Inicialmente, as amostras do leite foram decantadas em tubos de 50 mL de fundo cônico e a precipitação das células somáticas presentes no leite foi realizada por meio de centrifugação a 2700 g, 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi lavado três vezes em 5 mL de tampão PBS/0,05 mM EDTA gelado (pH = 7,2), onde cada etapa foi submetida a centrifugação a 2700 g, 4°C, por 10 min, visando a eliminação de caseína e glóbulos de gordura. Ao final do processo, foi adicionado 250 µL de PBS 1 M para ressuspender o precipitado, sendo este então transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi então descartado para obtenção da CCS.

A extração do RNA total foi realizada assepticamente, utilizando-se o 1 mL de Trizol (Invitrogen), de acordo com indicações do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro UV Vis Cirrus 80 MB (Femto) e as razões de absorbância ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$) foram utilizadas para verificação do controle de qualidade da extração do RNA. As amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C até sua utilização. Para a síntese do DNA complementar (cDNA), aproximadamente 2 µg de RNA total foram submetidos à transcrição reversa, utilizando-se o kit comercial *GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, descritas abaixo.

A etapa inicial foi de preparação do cDNA a partir da desnaturação do RNA e *primers*, portanto, conforme as instruções de uso do kit, iniciou-se com a mistura de 5 µL RNA e 2 µL de *primers* em microtubos com água destilada, totalizando volume de 7 µL em cada tubo de reação. Na sequência, foi realizada a desnaturação do RNA e *primers* em temperatura de 70° C por 5 minutos, sendo transferido imediatamente para descansar no gelo por 5 minutos e realizado uma

centrifugação por 10 segundos. Finalizando esse primeiro procedimento com o armazenamento das amostras de RNA e *primers* em gelo antes de adicionar o mix de reação da transcrição reversa.

Na segunda etapa, ocorreu o emparelhamento dos *primers* e a síntese de cDNA, para tal foi combinado os componentes do Sistema de Transcrição Reversa da GoScript™, preparando uma reação de síntese de cDNA com volume total 13 µL em cada tubos sendo ao final vortexado e armazenado em gelo. Em seguida, as amostras foram então adicionadas a cada tubo contendo o RNA e *primers* previamente preparados e armazenados em gelo, totalizando um volume final de reação de 20µL.

As etapas finais do procedimento de síntese do cDNA ocorreram com a fase de emparelhamento, a partir do aquecimento dos tubos em bloco de aquecimento por 5 minutos em temperatura de 25° C. Seguido pela fase de extensão, onde as amostras permaneceram por 45 minutos em bloco de aquecimento com temperatura controlada de 42° C. Finalizando com a fase de inativação da transcrição reversa, com o aquecimento dos tubos em temperatura de 70° C por mais 15 minutos. Ao final do processo, as amostras foram armazenadas em temperatura de -20°C para posterior realização da amplificação via qRT-PCR.

3.2. Quantificação da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada por ensaios de qRT-PCR em equipamento *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (Applied Biosystem). Todas as amostras de cDNA a serem testadas foram deixadas em uma mesma concentração inicial (aproximadamente 20 ng) e todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Os *primers* para os ensaios de qRT-PCR com o gene *Gpam* foram desenhados na plataforma Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir da sequência do transcriptoma de *Bos taurus* depositada em banco de dados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Id: NM_001012282.1). O gene de referência (controle interno) escolhido neste trabalho foi a *B-actina*.

Nas reações de amplificação, foram utilizados os seguintes reagentes (*GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix* - Promega): *Go Taq Master mix* 2x, 0,5 µM primer *forward* e *reverse*, 40 ng cDNA e água q.s.p. 10 µL. O equipamento foi programado da seguinte maneira: 2 min - 95 °C, 40x (15 s - 95° C, 30 s - 60 °C), seguido de curva de dissociação (1 min – 95 °C, 30 s – 55 °C, 30 s – 95 °C). Foi então obtido o *Threshold Cycle* (Ct) e a mudança relativa na expressão gênica foi apresentada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

O teste de eficiência dos *primers* foi realizado utilizando-se uma diluição seriada a partir de uma solução estoque de cDNA molde (solução estoque → 10^{-1} → 10^{-2} → 10^{-3} → 10^{-4}), segundo curva padrão.

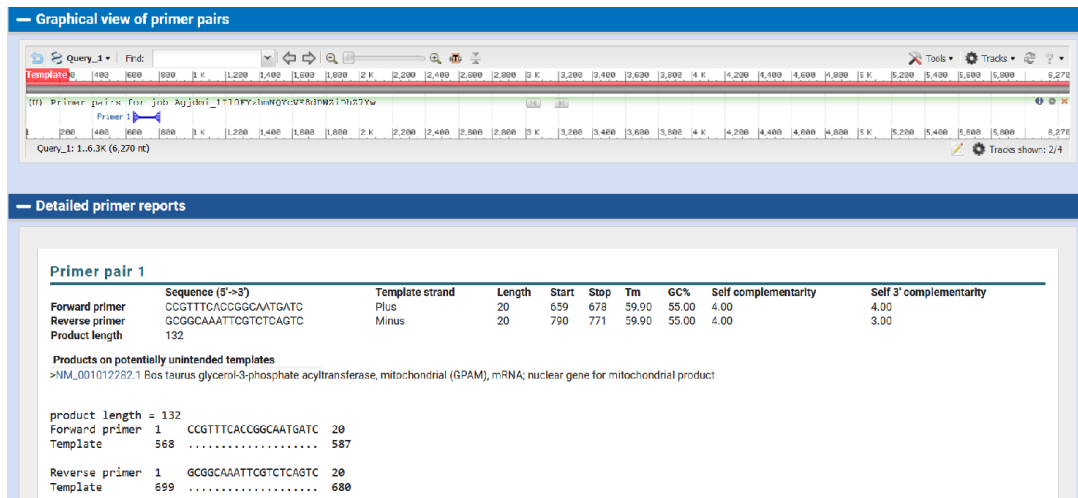
3.3. Análise Estatística

Todos os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. O teste estatístico utilizado foi o teste T de *Student*, com significância atribuída de $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

Os *primers* Fw (CCGTTTCACCGGCAATGATC) e Rv (GCGGCAAATTCGTCTCAGTC) para o *Gpam* tiveram 20 nucleotídeos de tamanho, temperatura de melting (Tm) 59,9 °C e localização nos exons 6 e na junção entre exons 7 e 8, respectivamente, com amplicon resultante de 132 pb (Figura 2).

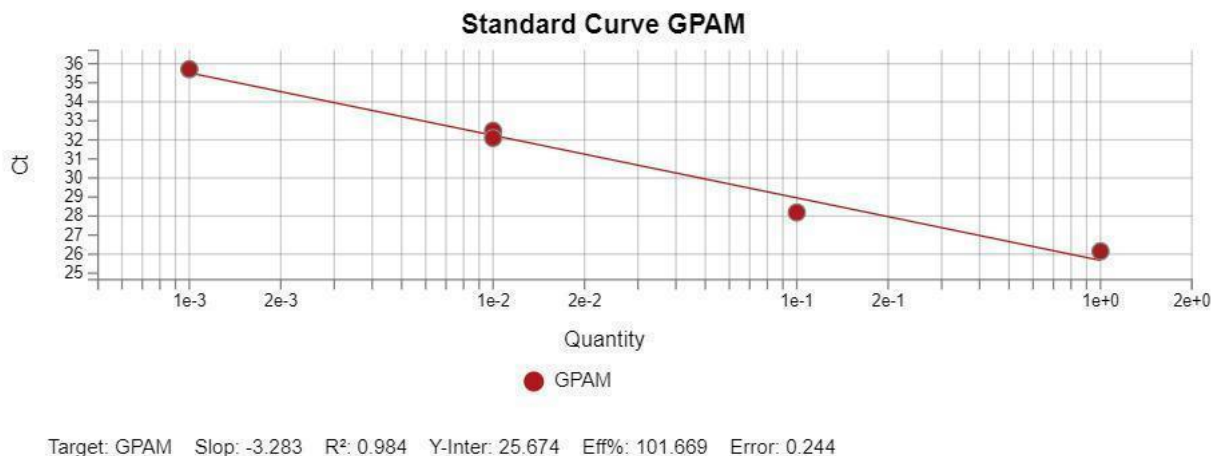
Figura 2. Relatório da plataforma Primer-Blast para o resultado do desenho dos *primers Gpam* em *Bos taurus*.



Fonte: O Autor.

A curva padrão obtida a partir da diluição seriada de cDNA molde para a análise de eficiência dos *primers* indicou que *Gpam* possui uma eficiência de 101.669% e slope de -3.283 (Figura 3) enquanto a *B-actina* apresentou eficiência de 109% e slope de = -3.10 (dados não mostrados).

Figura 3. Curva padrão para teste de eficiência do *primer Gpam*.



Pontos em vermelho indicam as diluições seriadas de cDNAs utilizados nos ensaios.

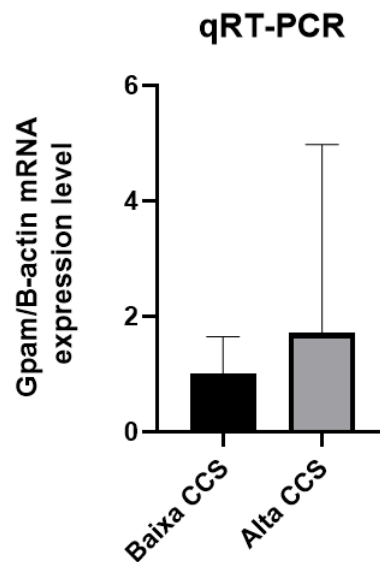
Fonte: O Autor.

Os procedimentos utilizados para a extração de RNA total dos oito animais a partir das células somáticas do leite mostraram-se eficientes, visto que

proporcionaram quantidades suficientes e puras de RNA, o qual foi utilizado para o prosseguimento das análises.

A análise da expressão gênica relativa de *Gpam* a partir de RNA de amostras de leite obtidas de vacas com baixa CCS (utilizada como controle) *versus* vacas com alta CCS (grupo teste) não indicaram haver uma expressão diferencial entre as amostras analisadas ($p = 0,6827$) (Figura 4). Nota-se um pequeno aumento de expressão de *Gpam* em vacas com alta CCS, porém, sem relevância estatística, considerando-se $p < 0,05$.

Figura 4. Quantificação dos níveis de expressão do mRNA do gene *Gpam*.



Barras em preto = vacas com baixa CCS; barras em cinza = vacas com alta CCS.

Fonte: O Autor.

5. DISCUSSÃO

Este experimento consistiu em uma primeira avaliação e padronização de métodos para estudos da alteração da expressão gênica em bovinos de leite realizados na Zootecnia UEPG. Avaliação de genes diferencialmente expressos em determinadas condições requer o reconhecimento das inúmeras variáveis intrínsecas ou ambientais as quais os grupos amostrais estão sujeitos. A composição de grupos amostrais homogêneos e sem a interferência das variáveis do modelo animal utilizado e ambientais são essenciais para a obtenção de resultados fidedignos.

Para a análise de genes diferencialmente expressos em bovinos de leite a partir das células somáticas, um importante item a ser avaliado é a CCS (BOUTAUD; JAMMES, 2002). Para cada via analisada, como por exemplo, metabolismo de gordura ou agentes antioxidantes, animais com CCS elevada podem ou não apresentar diferenças significativas quanto a expressão dos genes.

Com base na avaliação do controle leiteiro deste estudo e na avaliação zootécnica, foi possível observar animais em diferentes estágios de lactação, ordem de parto, e estágio de infecção do úbere, que se distribuíram entre valores baixos a altos da CCS. É proposto que a quantidade de células somáticas no leite pode ser influenciada pela produtividade da vaca, saúde, ordem de parição, estágio de lactação e raça do animal (DAMM et al., 2017; SHARMA et al., 2017; ALHUSSIEN; DANG, 2018; GONÇALVES et al., 2018). Quaisquer mudanças nas condições ambientais, nas práticas de manejo e também nas condições estressantes aumentam significativamente a quantidade de células somáticas provenientes do leite (ALHUSSIEN; DANG, 2018; GONÇALVES et al., 2018). Uma melhor higiene e nutrição adequada ajudam na redução das células somáticas no leite. Por outro lado, baixo teor de CCS no leite implica na melhoria da qualidade dos produtos lácteos bem como da vida de prateleira destes produtos (DAMM et al., 2017). Nesse estudo, a seleção dos animais para avaliação da expressão gênica baseou-se apenas no critério de apresentar baixa ou alta CCS. No entanto, a análise do controle leiteiro demonstrou que os animais apresentaram alta ou baixa CCS independente do número de dias em lactação e ordem de parto. Dessa forma, é provável que a alta

CCS apresentada por alguns animais seja decorrente de questões relacionadas a infecções, conforme também proposto por Damm et al. (2017), ou relacionados ao manejo de ordenha e estresse do rebanho (BOUTAUD; JAMMES, 2002).

Também relacionado com a padronização dos métodos para a determinação do estudo de qRT-PCR, a avaliação da eficiência dos *primers* é considerada um fator crítico, visto que desempenham papel fundamental na precisão e sensibilidade dos resultados mensurados (TICHOPAD et al., 2002). Os *primers* são oligonucleotídeos curtos projetados para se ligarem a sequência específica do gene em estudo, permitindo a amplificação de uma região alvo durante a PCR (RUIJTER et al., 2009; BUSTIN, 2009). Entre os fatores que influenciam na eficiência dos *primers* pode-se listar a sua temperatura de melting (T_m - temperatura de emparelhamento) devido ao conteúdo GC, comprimento da sequência, especificidade ao alvo, tamanho do amplicon e concentração de uso na reação (RUIJTER et al., 2009; BUSTIN, 2009). *Primers* para qRT-PCR usualmente são entre 18 e 27 nucleotídeos de tamanho, entre 40 e 60 % de conteúdo GC e T_m de 60 °C, e amplicon entre 60 e 200 pb (TICHOPAD et al., 2002). Outro importante fator é desenhar *primers* na junção entre exons ou em exons diferentes, evitando a amplificação do DNA genômico (RUIJTER et al., 2009).

De acordo com Tichopad et al. (2002), na etapa de amplificação exponencial da PCR, qualquer erro na eficiência dos *primers* resulta em erro na quantificação do produto amplificado. Os resultados obtidos com a avaliação de eficiência dos *primers* demonstram resultados dentro dos limites aceitáveis (90% a 110%) e com valores próximos de eficiência entre o gene alvo e o gene referência. O valor de slope obtido para o gene *Gpam* (-3.283) está próximo ao idealizado e dentro dos limites recomendados para avaliação, sendo eles de -3,6 a -3,1. Os *primers* desenhados foram para uma T_m de 60 °C na ciclagem e a análise da curva de dissociação evidenciaram pico único, mostrando que não houve formação de dímeros. Ainda, os *primers* *Gpam* foram desenhados para exons diferentes, sendo que o primer reverso foi complementar a uma região de junção, permitindo assim a amplificação somente do RNA presente na amostra. Dessa forma, foi possível inferir a eficiência dos *primers* para o gene alvo na avaliação, resultando em dados confiáveis de amplificação via qRT-PCR.

A avaliação da integridade do RNA é outro passo crítico na obtenção de dados confiáveis de expressão gênica (FLEIGE; PFAFFL, 2006). Trabalhar com RNA de baixa qualidade pode comprometer fortemente os resultados experimentais de aplicações a jusante, que geralmente são trabalhosas, demoradas e caras (FLEIGE; PFAFFL, 2006). O uso de RNA intacto é um elemento-chave para a aplicação bem-sucedida de métodos biológicos moleculares, como a qRT-PCR e o sequenciamento de RNA. O RNA obtido na amostra depende da padronização de método de extração ajustado àquele tecido ou células alvo. Para as células somáticas do leite diferentes protocolos são propostos visando a remoção de impurezas e obtenção de RNA de alta qualidade. Em nosso estudo, foi utilizado o protocolo de extração de RNA a partir de células somáticas do leite ovino, descrito por Mura et al. (2013), com modificações. As etapas de lavagem e centrifugação das amostras para remoção de impurezas, gordura e caseína, além de demais componentes do leite não desejáveis no estudo foram essencialmente as mesmas descritas pelos autores. A principal modificação consistiu em utilizar o reagente trizol para separação de fases e obtenção do RNA. Com a utilização dessa etapa, os resultados obtidos foram de maior qualidade. A padronização de extração e aprimoramento das técnicas avaliativas não invasivas, que aliam o bem-estar ao progresso genético de forma acelerada, possibilitam o aprofundamento de estudos científicos que adotem a metodologia de avaliação de expressão de genes. Assim, a análise de amostras de leite em vacas com diferentes tratamentos nutricionais e/ou diferentes estágios de lactação permitem obter um melhor conhecimento no que se refere à produção, saúde do úbere, bem-estar e nutrigenômica.

O procedimento de extração e purificação do RNA total deve atender aos seguintes critérios: livre de proteínas (absorvância 260 nm/280 nm); livre de DNA genômico; não degradado (relação 28S:18S deve estar aproximadamente entre 1,8 e 2,0, com baixa quantidade de fragmentos curtos); livre de inibidores enzimáticos para reação de transcrição reversa e PCR, que é fortemente dependente dos métodos de purificação e limpeza; livre de quaisquer substâncias que complexem os cofatores essenciais da reação, como Mg^{2+} ou Mn^{2+} ; e livre de nucleases para armazenamento prolongado (BUSTIN; NOLAN, 2004; PFAFFL, 2005). Nesse estudo, a verificação da presença/qualidade do RNA e ausência de

DNA foi realizada em eletroforese de gel de agarose 1,5%, que demonstrou apenas RNA no produto de extração. Já a quantificação da concentração e a mensuração da qualidade do RNA obtido foi realizada em nano espectrofotômetro UV Vis, onde os produtos obtidos demonstraram valor de razão de absorbância em 260 nm/280 nm dentro de limites de qualidade (1,8 e 2,0). É conhecido que os ácidos nucleicos apresentam um pico de absorção de luz a 260 nm, enquanto as proteínas absorvem a 280 nm, principalmente devido às cadeias laterais de triptofano e tirosina. Já o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), carboidratos fenol e Tris-HCl têm absorbância próxima a 230 nm (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2009). Para o RNA, essas razões próximas a 2,0 indicam a qualidade do material obtido.

O metabolismo da gordura do leite na glândula mamária bovina é controlado pela expressão de inúmeros genes (MEDRANO; RINCON; ISLAS-TREJO, 2010; WICKRAMASINGHE et al., 2012). Alguns estudos já demonstraram que o gene *Gpam* apresenta alteração da sua expressão em bovinos com dietas suplementadas com fonte lipídica (WICKRAMASINGHE et al., 2012). Com isso, nosso estudo utilizou esse gene, importante na via de esterificação de ácidos graxos do leite, para determinar se animais com altas CCS apresentam alteração significativa da sua expressão. Os dados qRT-PCR obtidos indicaram que houve um leve aumento na expressão *Gpam* no grupo de animais com CCS alta em relação ao grupo controle (baixa CCS). Contudo, esses resultados não apresentaram diferenças estatísticas acentuadas (considerando $p < 0,05$), portanto, não foi significativo.

Nesse contexto, o presente estudo demonstra a importância da determinação da CCS como um fator que não resulta em interferência na expressão de genes ao se utilizar metodologias de avaliação gênica a partir de amostras de leite. A eliminação dessa variável detém grande importância para futuros estudos que aliem a quantificação de genes de interesse com o fornecimento de dietas suplementadas visando ganhos na produção.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que não houve influência significativa dos valores registrados de contagem de células somáticas (CCS) em relação à expressão do gene *Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (Gpam)* em vacas da raça Holandesa. Esses resultados fornecem uma validação importante ao demonstrar que a determinação da CCS não interfere na expressão do gene avaliado (*Gpam*) quando se utilizam metodologias de avaliação gênica a partir de amostras de leite. Além disso, o estudo destaca a relevância de padronizar os métodos de análise molecular via qRT-PCR para obter dados confiáveis e aplicáveis em futuras pesquisas que visem melhorias na produção de leite através da manipulação genética ou da suplementação dietética aplicado à bovinocultura de leite da UEPG.

7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHUSSIEN, M. N.; DANG, A. K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 562, 2018.

BECKER, D., et al. Single-cell RNA sequencing of freshly isolated bovine milk cells and cultured primary mammary epithelial cells. **Scientific Data**, v. 8, n. 1, p. 177, 2021.

BOUTINAUD, M. JAMMES, H. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1258-1269, 2002.

BUSTIN, S. A., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of **Quantitative Real-Time PCR Experiments**. 2009.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Template handling, preparation, and quantification. **The Real-Time PCR Encyclopaedia A–Z of Quantitative PCR. Published by International University Line, La Jolla, CA**, p. 87-120, 2004.

CÁNOVAS, Angela et al. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 5297, 2014.

COLE, J. B.; VANRADEN, P. M. Symposium review: Possibilities in an age of genomics: The future of selection indices. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3686-3701, 2018.

COLEMAN, R. A.; MASHEK, D. G. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6359-6386, 2011.

DAMM, M., et al. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4926-4940, 2017.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006.

GIMENO, Ruth E.; CAO, Jingsong. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 10, p. 2079-2088, 2008.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 6, p. 381-391, 2009.

GONÇALVES, J. L., et al. Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4357-4366, 2018.

KNIGHT, C.; PEAKER, M.; WILDE, C. Local control of mammary development and function. **Reviews of Reproduction**, v.3, p.104-112, 1998.

LINDMARK-MÅNSSON, H., et al. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. **International Dairy Journal**, v.16, p.717-727, 2006.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIU, Q., et al. Effects of branched-chain volatile fatty acids on lactation performance and mRNA expression of genes related to fatty acid synthesis in mammary gland of dairy cows. **Animal**, v. 12, n. 10, p. 2071-2079, 2018.

LI, N., et al. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 517-538, 2014.

MEDRANO, J. F.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A. Comparative analysis of bovine milk and mammary gland transcriptome using RNA-Seq. 9th World Congress on Genetics applied to Livestock Production; Leipzig, Germany 2010, 852.

NAFIKOV, R. A., et al. Polymorphisms in lipogenic genes and milk fatty acid composition in Holstein dairy cattle. **Genomics**, v. 104, n. 6, p. 572-581, 2014.

MURA, M. C., et al. Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2169-2173, 2013.

PFAFFL, M. W., 2005. Nucleic acids: mRNA identification and quantification. In: Worsfold, P.J., Gallagher, P.K. (Eds.), Nucleic Acids, **Encyclopedia of Analytical Science**, second ed. Academic Press, ISBN 0-12- 764100-9, pp. 417–426.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

RAJNEESH, S. J.; CHAUHAN, P.; KUMAR, N. Bypass fat as a feed supplement in ruminants: A review, 2020.

REUE, K.; BRINDLEY, D. N. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 12, p. 2493-2503, 2008.

RUIJTER, J. M., et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. e45, 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios. **Thermo Fisher Scientific: Waltham, MA, USA**, 2009.

TICHOPAD, Ales; DZIDIC, Anamarija; PFAFFL, Michael W. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2053-2056, 2002.

SHARMA, T., et al. Association between udder morphology and in vitro activity of milk leukocytes in high yielding crossbred cows. **Veterinary World**, v. 10, n. 3, p. 342, 2017.

TUDISCO, R., et al. Effect of hydrogenated palm oil dietary supplementation on milk yield and composition, fatty acids profile and Stearoyl-CoA desaturase expression in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 132, p. 72-78, 2015.

VARGAS, B., et al. Economic values for production and functional traits in Holstein cattle of Costa Rica. **Livestock Production Science**, v. 75, n. 2, p. 101-116, 2002.

WICKRAMASINGHE, S., RINCON, G., ISLAS-TREJO, A., MEDRANO, J. F. Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. **BMC Genomics**, v.13, n.1, p.1-14, 2012.