



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E
PASTAGENS



**POLIMORFISMOS DO GENE BOLA-DRB3 EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS 5/8 GIROLANDO E
HOLANDÊS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

2012

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

POLIMORFISMOS DO GENE BOLA-DRB3 EM REBANHOS
BOVINOS LEITEIROS 5/8 GIROLANDO E HOLANDÊS NO ESTADO
DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco – Unidade Acadêmica de
Garanhuns, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal e
Pastagens, para obtenção do título de
Mestre.

Orientador – Kleber Régis Santoro,
Co-orientador – Omer Cavalcanti Almeida

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
(2012)

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

Vilaça, Luciana Florêncio

Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros
5/8 Girolando e Holandês no Estado de Pernambuco / Luciana Florêncio
Vilaça._ Garanhuns, 2012.

58f.

Orientador: Kleber Régis Santoro

Dissertação (Curso de Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de
Garanhuns, 2012.

Inclui Bibliografia

1. Produção de leite
 2. Mastite
 3. Biologia Molecular
 4. Resistência
 5. Melhoramento animal
- I. Santoro, Kleber Régis
II. Título

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

POLIMORFISMOS DO GENE BOLA-DRB3 EM REBANHOS
BOVINOS LEITEIROS 5/8 GIROLANDO E HOLANDÊS NO ESTADO
DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco – Unidade Acadêmica de
Garanhuns, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal e
Pastagens, para obtenção do título de
Mestre.

Aprovado em ____ de _____ de 2012

D.Sc. Júlio César Vieira de Oliveira - IPA

D.Sc. Omer Cavalcanti de Almeida - PPGCAP/UFRPE

D.Sc. Willian Gonçalves do Nascimento - PPGCAP/UFRPE

D.Sc. Kleber Régis Santoro (Orientador)

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
(2012)

*Aos meus pais Geraldo e Jane e ao meu irmão Adriano, pela sabedoria, incentivo,
apoio e ensinamentos. A vocês os méritos dessa conquista.*

À Eduardo, meu noivo, pelo amor, paciência e incentivo durante minhas escolhas.

Dedico

AGRADECIMENTO

À Deus por ter me dado forças para enfrentar as dificuldades e por ter tornado mais um sonho possível em minha vida.

Em especial, a minha família e a Eduardo, por ter investido e acreditado em mim e na realização deste sonho.

Ao Professor Kleber Régis Santoro, pela orientação e ensinamentos acadêmicos desde a época da iniciação científica (2006) e por mais uma oportunidade de aprendizagem.

Aos professores da graduação e pós-graduação pela fundamental participação na minha formação.

Aos colegas da pós-graduação, pelos momentos e ensinamentos, em especial a primeira turma de mestrado em Ciência Animal e Pastagens da UAG-UFRPE (Jadilson, João Tiago, Mábio, Messias, Rodrigo e Tibério).

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (Wellison, Tatiana, Anderson, Sonycleide e Valéria), pela convivência e auxílio na condução do experimento.

Aos colegas Diogo, Pedro, Raquel e Luana pelo acolhimento e pelos momentos passados em Piracicaba.

Ao Professor Luiz Coutinho e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da ESALQ – USP, pelo acolhimento e ensinamentos.

Aos doutores Júlio César Vieira de Oliveira e Sebastião Inocêncio Guido do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) pela disponibilidade, acesso aos animais e aos dados.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pela concessão da Bolsa de estudos e financiamento do projeto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	20
2 CAPÍTULO 01.....	23
2.1 Introdução.....	25
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Animais e coleta das amostras	26
2.2.2 Extração de DNA.....	26
2.2.3 Amplificação do gene BoLA-DRB3	27
2.3 Resultados e Discussão.....	29
2.4 Conclusões.....	31
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	32
3 CAPÍTULO 02.....	33
3.1 Introdução	36
3.2 Material e Métodos	37
3.2.1 Animais	37
3.2.2 Coleta e extração de DNA.....	38
3.2.3 Amplificação do gene BoLA-DRB3.....	38
3.2.4 Sequenciamento do gene BoLA-DRB3	39
3.2.5 Identificação dos alelos	40
3.2.6 Ocorrência de homozigose e Equilíbrio Hardy-Weinberg	40
3.2.7 Diversidade, divergência e filogenia.....	40
3.3 Resultados e Discussão	41
3.3.1 Frequência alélica	41
3.3.2 Identificação de SNP.....	44
3.4 Conclusões	54
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	55
4 CONCLUSÃO GERAL	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa dos genes estruturais localizados no MHC em <i>Bos taurus</i>	15
Figura 2.1. Eletroforese em gel de agarose a 1%, seguindo a metodologia descrita na literatura.....	29
Figura 2.2. Eletroforese em gel de agarose a 1%, com variação de 2°C na temperatura de anelamento na primeira e segunda PCR.....	30
Figura 2.3. Eletroforese em gel de agarose a 1%, seguindo modificação na metodologia.....	30
Figura 3.1. Alinhamento de um indivíduo homozigoto.....	45
Figura 3.2. Identificação dos SNPs em um indivíduo heterozigoto.....	45
Figura 3.3. Relação evolutiva entre alelos identificados, a árvore ótima com soma de ramos igual a 0,81161061 é mostrada (cálculo de distâncias por Máxima Verossimilhança composta, com agrupamento UPGMA sobre 231 posições de nucleotídeos final).....	49
Figura 3.4. Identificação de regiões de conservação com identidade total para os <i>strands</i> não identificados, mas pertencentes à região de interesse. Alinhamento com todos os alelos identificados, sendo apresentado apenas o alelo 0101 para posicionamento e referência. São apresentados somente as regiões com mais de três bases.....	51

Figura 3.5. Identificação de regiões únicas (*singletons*) para os *strands* não identificados, mas pertencentes à região de interesse. Alinhamento com todos os alelos identificados, sendo apresentado apenas o alelo 0101 para posicionamento e referência..... 52

Figura 3.6. Relação evolutiva entre alelos identificados e não identificados, a árvore ótima com soma de ramos igual a 0,62059115 é mostrada, onde EBI são os identificados (EBI e NCBI) e P os não identificados (cálculo de distâncias por Máxima Verossimilhança composta, com agrupamento UPGMA sobre 194 posições de nucleotídeos final)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Produção de leite no Brasil, Nordeste, Pernambuco e Mesorregiões do estado de Pernambuco.....	12
Tabela 1.2. Evolução dos estudos voltados a associação do gene BoLA-DRB3 e a resistência a mastite no mundo.....	18
Tabela 2.1. Variações na temperatura de anelamento.....	28
Tabela 3.1. Frequência de alelos identificados e não identificados (NI) para o gene BoLA-DRB3.2.....	43
Tabela 3.2. Frequência dos genótipos homozigotos e heterozigotos identificados e não identificados.....	44
Tabela 3.3. Diversidade e divergência entre e dentro dos rebanhos para o gene BoLA-DRB3.....	48

RESUMO

VILAÇA, Luciana Florêncio. **Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no Estado de Pernambuco**. 2012. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, PE¹.

A seleção em gado de leite tem sido voltada, ao longo do tempo, ao aumento na quantidade de leite, enquanto características relacionadas aos componentes do leite e à resistência a doenças têm sido pouco consideradas em programas de criação. Esta intensa seleção a características de produção ocasionou um aumento na incidência de doenças como a mastite, sendo esta um dos fatores que mais acarretam prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite. Dessa forma, tem-se dedicado grande atenção na identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência à mastite, de modo a selecionar animais ao mesmo tempo produtivos e resistentes. Uma região do genoma bovino que está associado à mastite é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que na espécie bovina foi denominado de região BoLA. No entanto, atualmente não existem trabalhos relacionados à identificação dos polimorfismos do gene BoLA-DRB3 nos rebanhos do estado de Pernambuco. Com esse objetivo, foram analisados rebanhos 5/8 Girolando e Holandês do estado de Pernambuco, para avaliar os polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2, através de modificação de protocolo da metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR), o que permitiu identificação de alelos. A modificação do protocolo mostrou-se adequada e satisfatória para indicação de polimorfismos do gene estudado. Identificaram-se 39 alelos, sendo três sequências (AV-141F, AV-18F e AV-133F) consideradas com maior probabilidade. As frequências alélicas variaram entre 0,42 e 15,97%, onde os alelos mais frequentes foram 0101 (6,13%), R (14,11%) e 1101 (14,72%). Verificaram-se valores baixos de similaridade, demonstrando maior variabilidade genética entre os animais. A estimativa de distância entre os rebanhos Holandês e Girolando, foi de 0,075, sendo a média da distância entre os rebanhos de 0,002. A heterozigosidade observada (H_o) apresentou valores menores que a heterozigosidade esperada (H_e), indicando que há menos heterozigotos na população do que esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. A divergência genética observada entre as sequências da população geral foi de 40,8792, sendo que quanto maior a divergência encontrada dentro de uma população maior será o número de alelos diferentes presentes. Na análise filogenética observou-se a formação de seis grupos entre todos os alelos encontrados com o corte da árvore em torno de 0,04 de similaridade. Dessa forma, verificou-se um elevado polimorfismo do gene BoLA-DRB3.2 para os animais estudados, sendo os alelos encontrados relatados quanto a conferirem resistência a mastite. Os animais do estudo revelam alta variabilidade se caracterizando com um alto valor genético para a pecuária, devendo essas informações serem consideradas em programas de melhoramento genético nacional.

¹Comitê Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro – UAG/UFRPE (orientador); Prof. Dr. Omer Cavalcanti Almeida – UAG/UFRPE (co-orientador).

ABSTRACT

VILAÇA, Luciana Florêncio. **Polymorphisms of gene BoLA-DRB3 in dairy herds 5/8 Girolando and Holstein in the State Pernambuco.** 2012. 58p. Dissertation (Master in Animal Science and Grassland) - University Federal Rural of Pernambuco, Academic Unit of Garanhuns, PE¹.

Selection in dairy cattle was turned over time, increasing the quantity of milk, while features related to the milk constituents and disease resistance have been hardly considered in breeding programs. This intense selection to production characteristics led to an increased incidence of diseases such as mastitis, which is one of the factors that cause economic losses in milk production chain. Therefore, it has been given great attention in the identification of genes or chromosomal regions and their associated with resistance to this disease, in order to select animals productive and resistant at the same time. A region of the genome associated with bovine mastitis is the Major Histocompatibility Complex (MHC), that the bovine region was named BoLA. However, currently there are no studies related to the identification of gene polymorphisms in BoLA-DRB3 herds in the state of Pernambuco. With this objective, we analyzed herds 5/8 Holstein-Gir and Holstein the state of Pernambuco, to evaluate gene polymorphisms BoLA-DRB3.2, by using a modified protocol of the method of polymerase chain reaction (PCR), allowing identification of alleles. The modification of the protocol was adequate and satisfactory to indication of gene polymorphisms studied. We identified 39 alleles, where three sequences (AV-141f, AV and AV-18F-133F) were considered more likely. The allele frequencies ranging between 0.42 and 15.97%, where the most common alleles were 0101 (6.13%), R (14.11%) and 1101 (14.72%). There were low of similarity values, demonstrating greater genetic variability among animals. The distance estimated between the Holstein-Gir and Holstein, was 0.075 and the average distance among the flocks of 0.002. The observed heterozygosity (H_o) had values lower than expected heterozygosity (H_e), indicating that there are fewer heterozygotes in the population than expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. The genetic divergence between the sequences of the general population was 40.8792, the greater the divergence found in a population greater the number of different alleles. Phylogenetic analysis checks the formation of six groups found between all alleles of the tree with the cutting around 0.04 similarity. Thus, there was a high polymorphism BoLA-DRB3.2 for the animals studied, reported as the alleles found to confer resistance to mastitis. The animals of the study show high variability characterized with a high genetic value for livestock, such information to be considered in breeding programs nationwide.

¹Comitê Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro – UAG/UFRPE (orientador); Prof. Dr. Omer Cavalcanti Almeida – UAG/UFRPE (co-orientador).

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo (IBGE, 2010). Entretanto, a região Nordeste não é uma grande produtora de leite se comparada a sua produção anual em relação ao número de habitantes, onde no ano de 2010, foi responsável por uma produção que correspondeu a 13,01% do total de leite produzido no país (Tabela 1.1). O Estado de Pernambuco apresentou em 2010, 21,95% da produção de todo o Nordeste e 2,85% da produção nacional. Dentre as regiões do estado de Pernambuco, o Agreste vem ganhando destaque sendo responsável pelo maior aporte, produzindo 70,47% do leite do estado (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Produção de leite no Brasil, Nordeste, Pernambuco e Mesorregiões do estado de Pernambuco

PRODUÇÃO DE LEITE	
REGIÃO	LITROS DE LEITE X 10³
Brasil	30.715.460
Nordeste	3.997.890
Pernambuco	877.420
Sertão - PE	203.141
São Francisco - PE	23.969
Agreste - PE	618.351
Zona da Mata - PE	25.699
Metropolitana - PE	6.261

Fonte: adaptado do IBGE (2010).

Apesar do crescimento na cadeia produtiva do leite, ainda existem entraves que precisam ser resolvidos para que se possa manter a sustentabilidade e competitividade do setor. São inúmeros os fatores que podem vir a interferir sobre a produção de leite em um rebanho, tais como: alimentação, manejo, sanidade, fatores ambientais, fatores genéticos, entre outros.

Assim, o estado de saúde dos animais pode prejudicar o desempenho produtivo e, conseqüentemente, terá impacto sobre o resultado econômico da atividade, além de aumentar os custos de produção (Miller et al., 1993). Dentre as doenças que acometem o gado leiteiro destaca-se a mastite, sendo esta uma inflamação na glândula mamária, causada por microrganismos, principalmente bactérias (Dias, 2007). Essa doença caracteriza-se por ser um dos fatores que acarreta grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite, e até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Duque et al., 2005; Ribeiro et al., 2007).

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo. No Brasil, estima-se que haja, devido à alta prevalência da mastite, uma perda de produção entre 12% e 15% (Fonseca & Santos, 2000), com gastos aproximados de U\$126,00/vaca em lactação por ano, dos quais 60% devido à redução da produção por mastite subclínica e 15% à mastite clínica (Holanda Júnior et al., 2005). Entretanto, muitos produtores ainda não se preocupam com este problema, talvez por não atentar às perdas decorrentes desta enfermidade, dos riscos do tratamento através de resíduos de antibióticos no leite e da baixa relação custo/benefício desse procedimento (Fonseca & Santos, 2000).

No entanto, verifica-se que a seleção em gado de leite tem sido voltada, ao longo do tempo, ao aumento na quantidade de leite, enquanto características relacionadas à

resistência a mastite e aos componentes do leite têm sido pouco consideradas em programas de criação, o que contrasta com a tendência mundial para maior valorização dos componentes do leite, especialmente proteínas (Nascimento et al., 2006).

A maioria dos estudos genéticos focados em leite utiliza a contagem de células somáticas (CCS) e a mastite clínica como medida fenotípica para prever o status de bactérias no úbere (Rupp & Boichard, 2003). A correlação genética existente entre a CCS e a mastite, tanto clínica como subclínica, é estimada em torno de 0,3 a 0,7, com herdabilidade de 0,10 a 0,14 para a CCS (Shook & Schutz, 1994), sendo esta uma variável que deve ser levada em consideração em programas de melhoramento genético, com o objetivo de elevar a resistência à mastite. Tais programas têm logrado êxito parcial, devido a CCS também depender de fatores ambientais (Magalhães et al., 2006).

Logo, a mastite é uma doença desafiadora e onerosa para a indústria de laticínios e para os pecuaristas, sendo uma alternativa para redução dos problemas causados por essa doença, além dos cuidados sanitários, a seleção de animais menos susceptíveis (mais resistentes) e a incorporação desta característica aos rebanhos (Fonseca, 2008), e para isso tem sido utilizada a biologia molecular como ferramenta nos sistemas de produção, a fim de possibilitar novas perspectivas e auxiliar na compreensão entre os genes e as características fenotípicas de interesse comercial.

Dessa forma, tem-se dedicado grande atenção na identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência à mastite, de modo a selecionar concomitantemente animais produtivos e resistentes (Mota, 2003). Assim, a resistência genética a enfermidades pode ser utilizada como uma ferramenta benéfica para a pecuária, podendo ser definida como a capacidade de evitar a doença ou promover a rápida recuperação após uma infecção, sendo uma função complexa e que envolve

diversos caminhos biológicos, moleculares e celulares, onde numerosos genes candidatos podem estar envolvidos (Rupp & Boichard, 2003).

Uma região do genoma bovino que está associado à mastite é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (Figura 1.1), que na espécie bovina foi denominado de região BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*) (Wu et al., 2010; Mosafer et al., 2011). Esses genes têm recebido atenção em relação a sua atuação sobre a resistência à mastite (Sharif et al., 1998; Sharif et al., 2003; Takeshima & Aida, 2006), estando envolvidos nos processos celulares relacionados ao sistema imunológico dos animais, sendo altamente polimórficos nas diferentes espécies e responsáveis por codificar as proteínas presentes na superfície das células e envolvidas na relação entre antígeno e anticorpos (Mota, 2003).

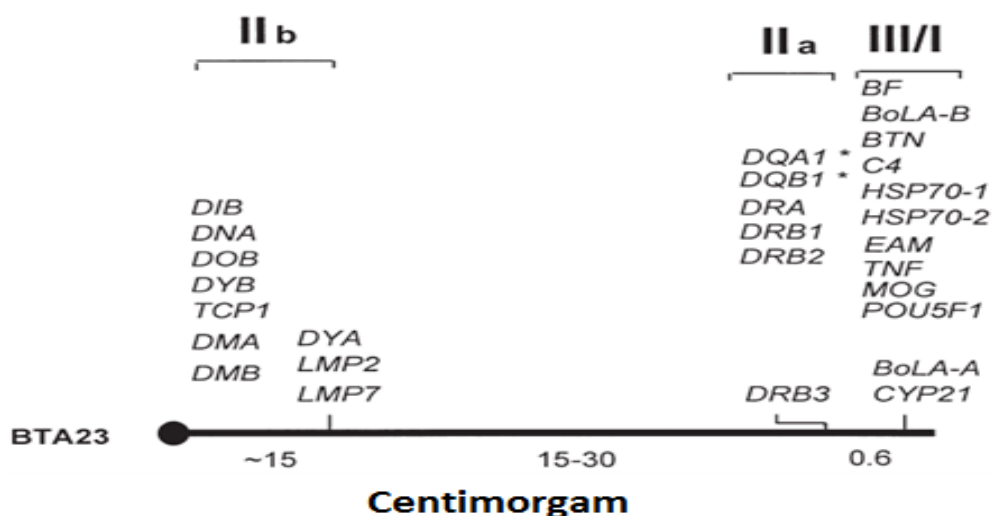


Figura 1.1. Mapa dos genes estruturais localizados no MHC em *Bos taurus*

Fonte: Fries & Ruvinsky (1999).

O gene BoLA está localizado no braço curto do cromossomo 23 (BTA23) (Wu et al., 2010) e é um alvo potencial na identificação de genes candidatos nos estudos da variação molecular, em razão a sua influência sobre as características produtivas e às relacionadas à saúde animal, uma vez que apresenta ação direta sobre as funções

imunológicas, podendo ainda apresentar um efeito indireto sobre as características de produção, onde indivíduos que apresentem melhores condições gerais de saúde podem ser mais produtivos, além da possível existência de ligação do loco BoLA com loci de características quantitativas (Machado et al., 2005). Segundo esses autores, quando identificado e verificado o efeito de um gene candidato, ele pode ser imediatamente utilizado na seleção assistida por marcadores, com resultados satisfatórios.

Dentre os produtos dos genes localizados nessa região, há duas classes de antígenos: Classe I que são encontrados na superfície das células do organismo, e Classe II que são expressos em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos (Mota, 2003). Alguns estudos associaram alelos da Classe I à susceptibilidade e resistência à mastite. Weigel et al. (1990) investigando o potencial do gene BoLA como marcador para a saúde e características de produção em bovinos de leite, relataram associação significativa entre o alelo A14 e a diminuição do CMT (*California Mastitis Test*) e entre o alelo A11 e a diminuição da mastite clínica em 98 vacas Holandesas nos Estados Unidos. Aarestrup et al. (1995) avaliando a associação entre a mastite subclínica e os alelos da Classe I do gene BoLA em 657 vacas de várias raças dinamarquesas, observaram associação dos alelos A11 e A12 com a CCS, e dos alelos A7 e A26 com a resposta dos anticorpos significativamente mais baixos para *Staphylococcus aureus*, sugerindo que o BoLA está envolvido na resistência e susceptibilidade a mastite. Dessa forma, Rupp & Boichard (2003) concluíram que os alelos A11 estão associados à susceptibilidade, o alelo A7 e A26 estão associados à resistência a mastite.

Em relação à associação dos alelos da Classe I e as características de desempenho, foi relatado por Weigel et al. (1990) associação do alelo A11 com a diminuição da quantidade e do teor de gordura e a influência do alelo A14 sobre o aumento da

produção de leite e de gordura, da porcentagem de gordura e da receita sobre o custo da alimentação. Batra et al. (1995) estudando a relação entre os alelos do BoLA e o tempo de vida e rentabilidade em um rebanho, encontraram associação significativa entre o alelo A14 e o aumento da vida produtiva, quantidade de leite, proteína e lactose em 94 animais da raça Holandesa no Canadá.

Os genes da Classe II em bovinos estão localizados dentro de duas distintas regiões do cromossomo 23 dos bovinos: a Classe IIa, que contém os genes funcionalmente expressos DR e DQ, e a Classe IIb, que contém genes identificados como DYA, DYB, DMA, DMB, DOB, DOA, TAP1, TAP2, LAP2 e LMP7 (Takeshima & Aida, 2006).

Vários são os estudos que investigaram as relações existentes entre os alelos da Classe II e os indicadores de diferentes mastites. Os primeiros estudos que sequenciaram regiões do loco BoLA-DR relacionados a ação imunológica específica, verificaram que os genes BoLA-DRB1 não é expresso, o BoLA-DRB2 é pouco expresso e o BoLA-DRB3 é altamente expresso (Mota, 2003). Dessa forma, o gene BoLA-DRB3, que possui 284 pares de base, tem sido mais amplamente estudado, uma vez que é extremamente polimórfico (Takeshima et al., 2009), apresentando 133 diferentes alelos identificados segundo dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Em vacas leiteiras, a maioria dos estudos focaram no exon 2 da classe BoLA-DRB3 (BoLA-DRB3.2) por causa de seu elevado polimorfismo (Sharif et al., 1998; Ledwige et al., 2001; Sharif et al., 2003), além de possuir associação com a CCS (Sharif et al., 1998; Ledwige et al., 2001).

Assim, a Tabela 1.2, apresenta a evolução das pesquisas realizadas atualmente no mundo voltadas ao estudo do gene BoLA-DRB3.

Tabela 1.2. Evolução dos estudos voltados a associação do gene BoLA-DRB3 e a resistência a mastite no mundo

REFERÊNCIA	RAÇA	PAÍS	OBJETIVO
Van Eijk et al. (1992)	168 animais de 10 raças	Estados Unidos	Identificação de polimorfismos por PCR-RFLP no gene BoLA-DRB3.2.
Dietz et al. (1997)	127 Holandesas	Estados Unidos	Associação entre os alelos do BoLA-DRB3.2 e 20 variáveis imunológicas medidas no periparto.
Sharif et al. (1998)	835 Holandês e 66 Jersey	Canadá	Associação entre alelos do BoLA-DRB3.2 e características de produção e resistência a mastite.
Trujillo-Bravo et al. (2005)	131 Holandesas	Colômbia	Associação dos polimorfismos do BoLA-DRB3.2 com a CCS e mastite.
Mohammadi et al. (2009)	65 Sistani	Irã	Estudo dos polimorfismos do BoLA-DRB3.
Firouzamandi et al. (2010)	75 animais Holandeses e 45 Sarabi	Irã	Descrição da variabilidade genética do BoLA-DRB3 em bovinos no Irã.
Wu et al. (2010)	629 Holandês	China	Estudo do polimorfismo do BoLA-DRB3.
Mosafer et al. (2011)	100 búfalos	Irã	Análise de polimorfismos do BoLA-DRB3 e identificação de alelos.

Apesar dos estudos realizados, verificou-se a presença de resultados conflitantes, necessitando de mais pesquisas que abordem o gene BoLA-DRB3 em populações maiores (Nascimento et al., 2006).

No Brasil, poucos trabalhos foram realizados (Mota et al., 2002; Machado et al., 2005; Nascimento et al., 2006). O primeiro estudo do gene BoLA-DRB3 em bovinos leiteiros da raça Gir foi realizado por Mota et al. (2002), que encontraram 17 alelos diferentes quando estudaram vinte e oito bovinos leiteiros da raça Gir da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), em Minas Gerais. No estudo realizado por Machado et al. (2005) houve associação entre os alelos do loco DRB3.2 com a produção de leite até 305 dias de lactação em 470 vacas Gir em Minas Gerais, onde identificaram 27 alelos, demonstrando elevado polimorfismo nessa raça. Nascimento et al. (2006) caracterizaram geneticamente os alelos do BoLA-DRB3 em 1076 fêmeas pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de leite Gir os associando com a produção de proteína, gordura e CCS.

Muito ainda está para ser conhecido sobre a interpretação biológica e relevância fenotípica de características relacionadas à resistência à mastite, sendo este assunto bastante estudado no mundo, enquanto que no Brasil muito ainda há para ser analisado. Estudos adicionais ainda são necessários para a confirmação das associações dos alelos do BoLA-DRB3.2 aos fenótipos e a resistência de doenças como a mastite, visando utilizar os resultados para a melhoria genética através da resistência a doenças na pecuária, sendo que no Estado de Pernambuco não existem informações a respeito da composição alélica dos rebanhos.

Portanto, objetivou-se com esse trabalho a identificação dos polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos de referência no estado de Pernambuco, proporcionando bases para a compreensão e auxílio no controle e no aumento da resistência à mastite nos rebanhos do estado, através de programas de melhoramento genético animal.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AARESTRUP, F.M.; JENSEN, N.E.; OSTERGARD, H. Analysis of associations between major histocompatibility complex (BoLA) class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.8, p.1684–1692, 1995.
- BATRA, T.R.; STEAR, M.J.; MACDONALD, P.A. Association of class I bovine lymphocyte antigens with profitability and lifetime yields in the Holstein breed. **Journal of Animal Science**, v.76, p.145-148, 1995.
- DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.
- DIETZ, A.B.; DETILLEUX, J.C.; FREEMAN, A.E. et al. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Alleles with Immunological Traits of Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.2, p.400-405, 1997.
- DUQUE, P.V.T.; BORGES, K.E.; PICCININ, A. Mastite bovina: descrição de doença e seus impactos na economia brasileira. In: II SIMPÓSIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DO CENTRO OESTE PAULISTA, 2005, São Paulo. **Anais... Garça: Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista, 2005.** p.1-6.
- FIROUZAMANDI, M.; SHOJA, J.; BARZEGARI, A. et al. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.15, p.2224-2228, 2010.
- FONSECA, I. **Perfil da expressão de genes relacionados à resistência à mastite em bovinos de leite.** 2008. 56f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- FONSECA, L. F. L., SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** 2.ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetics of Cattle.** 1.ed. Londres: CABI Publishing, 1999. 697p.
- HOLANDA JÚNIOR, B. M.; MADALENA, F. E.; HOLANDA, E. D. et al. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – Minas Gerais, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.13, n.2, p.63-69, 2005.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Censo Agropecuário.** 2010. Available at: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?t=2&z=t&o=1&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u8=1&u9=1&u10=1&u11=1&u12=3&u13=1&u14=26674&u15=1&u16=1>>. Accessed on: 10 mai., 2012.
- LEDWIGE, S. A.; MALLARD, B. A.; GIBSON, J. P. et al. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. **Animal Genetics**, v.32, p.219-221, 2001.
- MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L. et al. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.380-389, 2005.
- MAGALHÃES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L. et al. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.415-421, 2006.
- MILLER, G.Y.; BARTLETT, P.C.; LANCE, S.E. et al. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.8, p.15, 1993.

- MOHAMMADI, A.; NASSIRY, M.R.; MOSAFER, J. et al. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*). **Russian Journal of Genetics**, v.45, n.2, p.198-202, 2009.
- MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E. et al. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p.1-6, 2011.
- MOTA, A.F. **Descobrimos genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina**. 2003. 170p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOTA, A.F.; GABRIEL, J.E.; MARTINEZ, M.L. et al. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gyr cattle (*Bos indicus*). **European Journal of Immunogenetics**, v.29, p.223-227, 2002.
- NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. et al. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.641-647, 2006.
- National Center for Biotechnology Information – **NCBI**. 2012. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Accessed on: 10 jul., 2012.
- RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D. et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.810-812, 2007.
- RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v.34, p.671-688, 2003.
- SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. **Animal Genetics**, v.34, p.116-123, 2003.
- SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; DEKKERS, J. C. M.; LESLIE, K. E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.185-193, 1998.
- SHOOK, G. E.; SCHUTZ, M. M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.2, p.648-658, 1994.
- TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v.77, p.138-150, 2006.
- TAKESHIMA, S.N.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Short communication: Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. **Animal Journal of Dairy Science**, v.92, n.6, p. 2965-2970, 2009.
- TRUJILLO-BRAVO, E.; RODRÍGUEZ-Y, P.A.; CERON-MUÑOZ, M. Caracterización y análisis de asociación de BoLA-DRB3 con El conteo de células somáticas, em La raza Holstein en Antioquia, Colombia. **Actual Biol**, vol. 27, n.83, p.171-178, 2005.

- VAN EIJK, M.J.T.; STEWART-HAYNES, J.A.; LEWIN, H.A. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 23, p.483-496, 1992.
- WEIGEL, K.A.; FREEMAN, A.E.; KEHRLI, M.E.JR. et al. Association of class I Bovine Lymphocyte Antigen complex alleles with health and production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2538–2546, 1990.
- WU, X.X.; YANG, Z.P.; WANG, X.L.; et al. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, p. 221-225, 2010.

2 CAPÍTULO 01

Otimização do protocolo de amplificação em PCR do gene BoLA-DRB3.2 em rebanhos do Estado de Pernambuco

Resumo: A mastite bovina é o fator que provavelmente acarreta maiores prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite. Assim, tem-se utilizado ferramentas da biologia molecular para promover o melhoramento genético permitindo critérios para seleção dos animais portadores de características de interesse comercial. Estudos com a região BoLA-DRB3.2 tem demonstrado efetiva participação na resistência à mastite, no entanto, apesar de descrito na literatura, o protocolo de amplificação é de difícil implementação, além da existência de poucos estudos no Brasil que descrevem a metodologia aplicada a rebanhos em condições nacionais. Portanto, objetivou-se ajustar o protocolo de PCR para o estudo do polimorfismo do gene BoLA-DRB3.2 associado a resistência à mastite, aplicado a rebanhos leiteiros nacionais de várias raças e em localidade e situações distintas. Observou-se uma maior quantidade e definição do material amplificado com aumento em dois graus na temperatura de anelamento para a primeira e segunda PCR, o que pode aumentar a detecção do polimorfismo através da utilização do método proposto.

Palavras-chave: biologia molecular, mastite, produção de leite, resistência.

Optimization of PCR amplification protocol to identify gene polymorphisms

BoLA-DRB3.2

Abstract: Bovine Mastitis is probably the factor that results in higher economic losses in milk production chain. Thus, we have used molecular biology tools to promote the breeding criteria for allowing selection of animals with traits of commercial interest. Studies with the region BoLA-DRB3.2 has demonstrated effective participation in the resistance to mastitis, However, although described in the literature, the amplification protocol is difficult to implementation, beyond there are few studies in Brazil that describe the methodology applied to herds in national conditions. Therefore, the goal should be adjusted PCR protocol for the study of gene polymorphism associated with BoLA-DRB3.2 resistance to mastitis, dairy cattle applied to several national races and in different situations and location. There was a greater amount of amplified and defining material with two degrees of increase in annealing temperature for the first and second PCR, which can enhance the detection of polymorphism using the proposed method.

Keywords: amplification, molecular biology, milk production, resistance.

2.1 Introdução

A mastite caracteriza-se como uma inflamação na glândula mamária, tendo origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica, de estresse e infecciosa (Theirs et al., 1999), e que pode ocasionar aumento nos custos de produção, redução da quantidade e comprometimento da qualidade do leite, e até perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Duque et al., 2005; Ribeiro et al., 2007). Dessa forma, o controle dessa doença em bovinos leiteiros constitui um importante passo para elaboração de produtos de boa qualidade, bem como a diminuição dos riscos à saúde da população.

Diante do exposto, a diminuição dos impactos causados pela mastite é uma busca constante de todos os setores envolvidos na cadeia produtiva, não apenas considerando-se os aspectos econômicos, mas também por que os animais que apresentam maior resistência a essa enfermidade fornecerão produtos de melhor qualidade e por maior tempo.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), também denominado de região BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*) na espécie bovina (Wu et al., 2010; Mosafer et al., 2011), caracteriza-se como alvo potencial na identificação de genes candidatos. Para que seja possível alcançar tais objetivos, se faz necessário a utilização de técnicas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo da amplificação da região desejada do gene, seguida do estudo dos seus polimorfismos e a sua associação com a variabilidade fenotípica encontrada nos animais. Estudos com a região BoLA-DRB3.2 tem demonstrado efetiva participação na resistência à mastite (Takeshima & Aida, 2006). Entretanto, apesar de descrito na literatura (Van Eijk et al., 1992), o protocolo de amplificação é de difícil implementação devido ao uso de diferentes

primers em etapas distintas, além da falta de trabalhos com animais cruzados e a existência de poucos trabalhos no Brasil que descrevem a metodologia aplicada a rebanhos em condições nacionais. Estes aspectos representam em suma grande dificuldade para o estudo do gene.

Objetivou-se com o presente trabalho ajustar o protocolo de PCR para o estudo do polimorfismo do gene BoLA-DRB3.2, associado a resistência à mastite, aplicado a rebanhos leiteiros de várias raças e em localidade e situações distintas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais e coleta das amostras

Foram coletados 4 (quatro) mL de sangue total (tubos para coleta de sangue à vácuo com EDTA) de 412 animais de diferentes raças, sendo 64 Holandês, 106 5/8 Girolando, 92 Guzerá e 150 Sindi, das cidades de São Bento do Una, Arcoverde, Serra talhada e Petrolina, respectivamente. As amostras foram acondicionadas em freezer a -20°C para posterior análise.

2.2.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada através de Kit de extração AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit, da empresa Axygen, seguindo protocolo disponibilizado pela empresa. Foram utilizados cinco tampões: tampão AP1 para lise celular, tampão AP2 para desnaturar as proteínas, tampão W1A para lavagem, tampão W2 para dessalinização e tampão Tris-EDTA para diluir o DNA.

A qualidade da extração do DNA e a especificidade das amostras de sangue foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, com marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), corado com *Syber Green*, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação da qualidade.

2.2.3 Amplificação do gene BoLA-DRB3

Após a extração do DNA das amostras de sangue, realizou-se a amplificação utilizando-se adaptações nos ciclos de temperatura da metodologia descrita por Van Eijk et al. (1992), descritas abaixo. Foi realizada para amplificação uma Nested-PCR, sendo os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a primeira amplificação do gene BoLA-DRB3.2: HL030 (5'-TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3') e HL031 (5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), sendo esta constituída de 3µL de DNA, 1X Tris-HCl pH 8,0, 100 µM de dNTP mix, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada *primer* e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Após a primeira etapa de amplificação, uma segunda reação de PCR foi realizada, utilizando para isso 3µL da solução da primeira reação de PCR com concentrações de reagentes conforme descrito para a primeira etapa, exceto os *primers* que foram os seguintes: HL030 e HL032 (5' – TCGCCGCTGCCACAGT –3'). O *primer* HL032 possui uma sequência interna em relação à sequência amplificada na primeira etapa de PCR, possuindo uma superposição de oito bases com o *primer* HL031.

A metodologia descrita por Van Eijk et al. (1992) apresentava o seguinte ciclo de temperaturas para a primeira reação: desnaturação inicial de quatro minutos a 94°C seguida de dez ciclos de um minuto a 94°C, dois minutos a 60°C e um minuto a 72°C, permanecendo em uma etapa de extensão final de cinco minutos a 72°C. Segundo esses

mesmo autores as condições térmicas da segunda reação foram: 25 ciclos com um minuto a 94°C e 30 segundos a 65°C, seguidos de cinco minutos a 72°C.

Para contornar o problema da não obtenção de resultados a partir da literatura, realizaram-se variações na temperatura de anelamento (Tabela 2.1), sendo os ciclos de temperatura utilizados, na primeira variação da reação: desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C seguida de dez ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos com variações de 59, 60, 61, 62, 63°C e um minuto a 72°C, permanecendo em uma etapa de extensão final de dez minutos a 72°C. As condições térmicas da segunda variação da reação foram: 25 ciclos com um minuto a 94°C e 30 segundos a 64, 65, 66, 67, 68°C, seguidos de cinco minutos a 72°C.

Tabela 2.1. Variações na temperatura de anelamento

TEMPERATURA	1ª PCR (°C)	2ª PCR (°C)
1º TESTE	59	64
2º TESTE	60	65
3º TESTE	61	66
4º TESTE	62	67
5º TESTE	63	68

Para conferir os produtos de amplificação do PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se fragmentos de peso molecular conhecido (100pb DNA ladder) sendo seguido de foto documentação.

2.3 Resultados e Discussão

As Figuras 2.1, 2.2 e 2.3 mostram as eletroforeses realizadas após PCR das amostras. A Figura 2.1, apresenta os resultados pela metodologia descrita por Van Eijk et al. (1992), onde observa-se que de acordo com as características dos produtos no presente estudo, não é a mais indicada apresentando bandas ausentes.

As modificações na temperatura de anelamento são apresentadas na Figura 2.2. Verifica-se a presença de banda nos poços 6 e 7, que correspondem a duas repetições quando utilizado a temperatura de anelamento de 62°C na primeira reação, seguida de uma segunda reação com temperatura de 67°C. Dessa forma, verifica-se que com a modificação na metodologia descrita na literatura pode-se aumentar a visualização das bandas e eliminar a presença de bandas inespecíficas (Figura 2.3).

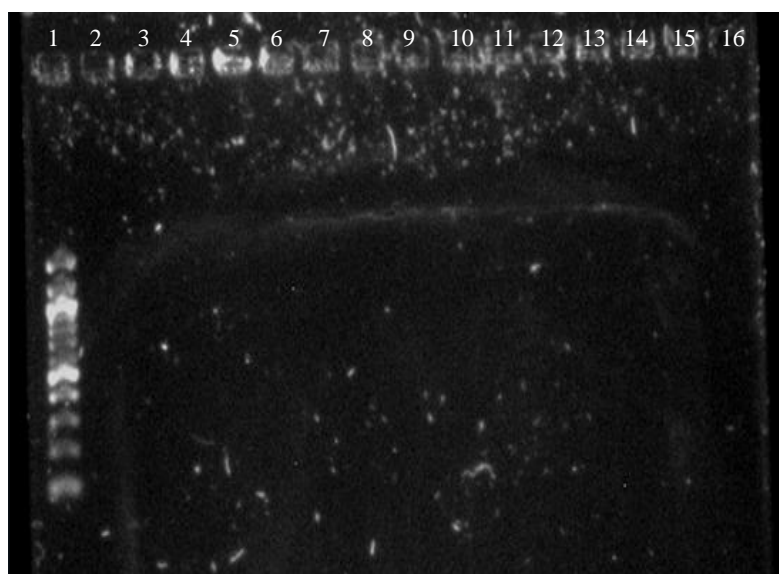


Figura 2.1 Eletroforese em gel de agarose a 1%, seguindo metodologia descrita na literatura

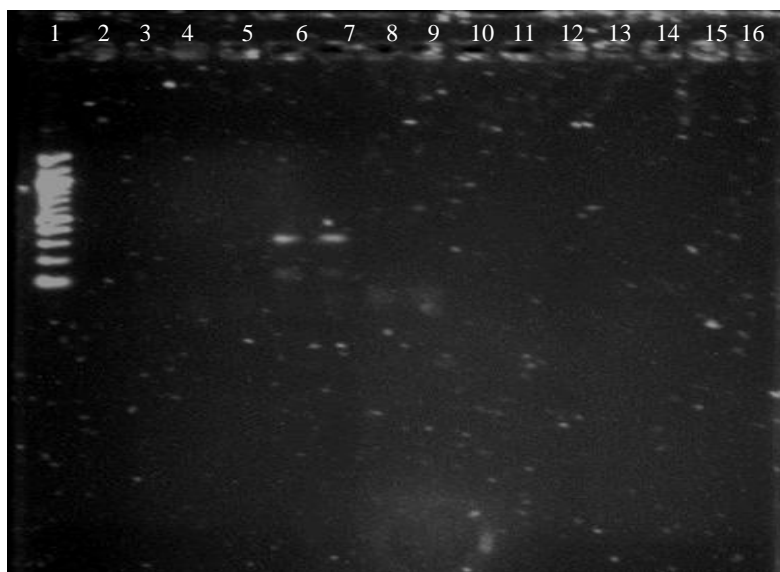


Figura 2.2. Eletroforese em gel de agarose a 1%, com variação de 2°C na temperatura de anelamento na primeira e segunda PCR

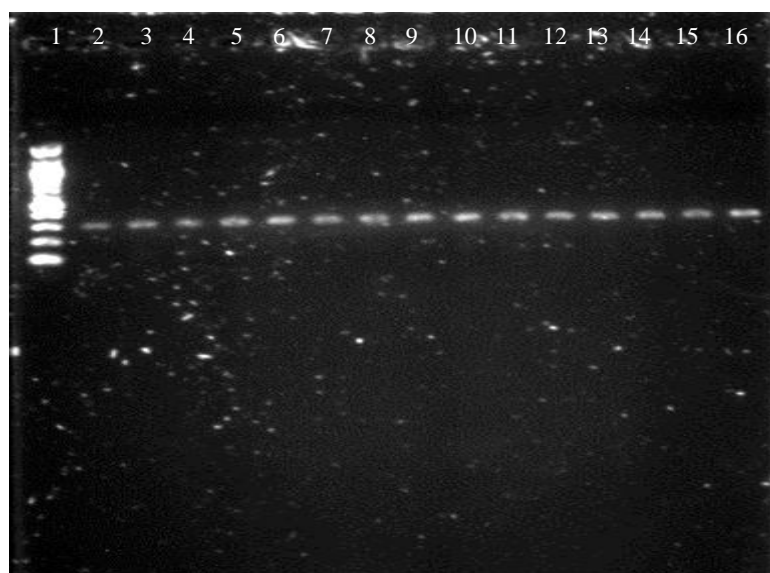


Figura 2.3. Eletroforese em gel de agarose a 1%, seguindo modificação na metodologia

2.4 Conclusões

Observou-se uma maior quantidade e definição do material amplificado com o aumento em dois graus na temperatura de anelamento para a primeira e a segunda PCR, o que pode aumentar a detecção do polimorfismo através da utilização do método proposto. Assim, a modificação da metodologia mostrou ser eficiente e necessária para o estudo do gene BoLA-DRB3.2 aplicada a rebanhos nacionais de diferentes raças.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- DUQUE, P.V.T.; BORGES, K.E.; PICCININ, A. Mastite bovina: descrição de doença e seus impactos na economia brasileira. In: II SIMPÓSIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DO CENTRO OESTE PAULISTA, 2005, São Paulo. **Anais...** Garça: Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista, 2005. p.1-6.
- MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E. et al. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p.1-6, 2011.
- RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Escherichia coli co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59 n.3, p. 810-812, 2007.
- THEIRS, F.O.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; COSTA, E.O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test” (CMT) no leite de vacas. **Revista Napgama**, v.4, p.9-12, 1999.
- TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v.77, p.138-150, 2006.
- VAN EIJK, M.J.T.; STEWART-HAYNES, J.A.; LEWIN, H.A. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 23, p.483-496, 1992.
- WU, X.X.; YANG, Z.P.; WANG, X.L.; et al. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, p. 221-225, 2010.

3 CAPÍTULO 02

Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8

Girolando e Holandês no estado de Pernambuco

Resumo: O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que na espécie bovina foi denominado de região BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*) têm recebido atenção por seus alelos terem ação sobre funções imunológicas e características de produção, sendo alvo potencial na identificação de genes candidatos. Estudos com a região BoLA-DRB3.2 tem demonstrado efetiva participação na resistência à mastite, no entanto, atualmente não existem trabalhos relacionados à identificação de alelos do BoLA-DRB3 em rebanhos do estado de Pernambuco. No presente estudo, foi investigada a distribuição dos alelos em 150 animais (Holandês e 5/8 Girolando) pertencentes a rebanhos estaduais, onde 39 alelos foram identificados, sendo três sequências (AV-141F, AV-18F e AV-133F) consideradas com maior probabilidade de serem novos alelos. As frequências alélicas variaram entre 0,42 e 15,97%, onde os alelos mais frequentes foram 0101 (6,13%), R (14,11%) e 1101 (14,72%). Verificaram-se valores baixos de similaridade, demonstrando maior variabilidade genética entre os animais. A estimativa de distância entre os rebanhos Holandês e Girolando, foi de 0,075, sendo a média da distância entre os rebanhos de 0,002. A heterozigosidade observada (H_o) apresentou valores menores que a heterozigosidade esperada (H_e), indicando que há menos heterozigotos na população do que esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. A divergência genética observada entre as sequências da população geral foi de 40,8792. Na análise filogenética verificou-se a formação de seis grupos entre todos os alelos encontrados. Dessa forma, observou-se o elevado polimorfismo do

gene BoLA-DRB3.2 para os animais estudados, sendo que alguns dos alelos encontrados foram relatados na literatura como conferindo maior resistência à mastite. Os animais do estudo revelaram alta variabilidade se caracterizando com um alto valor genético para a pecuária, devendo essas informações ser consideradas em programas de melhoramento genético animal.

Palavras-chave: bovinos, distância genética, frequência alélica, mastite, similaridade

Polymorphisms of gene BoLA-DRB3 in dairy cattle 5/8 Girolando and Holstein in the Pernambuco State

Abstract: The Major Histocompatibility Complex (MHC), which was named BoLA region (Bovine Lymphocyte Antigen) in bovine, have received attention in relation to their alleles have action on immune function and production characteristics, being a potential target for the identification of candidate genes. Studies with the region BoLA-DRB3.2 has demonstrated effective participation in the resistance to mastitis, however, currently there are no studies related to the identification of alleles of the BoLA-DRB3 in cattle in the state of Pernambuco. In the present study, we investigated the distribution of alleles in 150 animals (Holstein and Girolando) belonging to herds Brazilian, where 45 alleles were identified, 39 alleles first described, where three sequences (AV-141f, AV and AV-18F-133F) were considered more likely of be new alleles. The allele frequencies ranging between 0.42 and 15.97%, where the most common alleles were 0101 (6.13%), R (14.11%) and 1101 (14.72%). There were low of similarity values, demonstrating greater genetic variability among animals. The distance

estimated between the 5/8 Girolando and Holstein, was 0.075 and the average distance among the flocks of 0.002. The observed heterozygosity (H_o) had values lower than expected heterozygosity (H_e), indicating that there are fewer heterozygotes in the population than expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. The genetic divergence between the sequences of the general population was 40.8792. Phylogenetic analysis checks the formation of six groups found between all alleles. Thus, there was a high polymorphism BoLA-DRB3.2 for the animals studied, some of the alleles found in the literature have been reported conferring resistance to mastitis. The animals of the study show high variability characterized with a high genetic value for livestock, such information to be considered in breeding programs.

Keywords: cattle, genetic distance, allelic frequency, mastitis, similarity

3.1 Introdução

Problemas na sanidade animal prejudicam o desempenho produtivo, tendo impacto sobre o resultado econômico, tanto aumentando os custos de produção, quanto diminuindo a produtividade (Miller et al., 1993). Dentre as doenças mais comuns destaca-se a mastite por ser um dos fatores que acarreta grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite, e até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Duque et al., 2005; Ribeiro et al., 2007).

Dessa forma, tem-se dedicado grande atenção na identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência à mastite, de modo a selecionar animais superiores, mais produtivos e resistentes (Mota, 2003).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que na espécie bovina foi denominado de região BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*) (Wu et al., 2010; Mosafer et al., 2011) é uma região do genoma bovino mapeado no braço curto do cromossomo 23 (BTA23) e que tem recebido atenção em relação a sua associação a resistência à mastite (Sharif et al., 1998; Sharif et al., 2003; Takeshima & Aida, 2006; Wu et al., 2010), sendo alvo potencial na identificação de genes candidatos (Machado et al., 2005; Wu et al., 2010).

O gene BoLA está envolvido nos processos celulares relacionados ao sistema imunológico dos animais, sendo altamente polimórfico nas diferentes espécies e responsável por codificar as proteínas presentes na superfície das células e envolvidas na relação entre antígeno e anticorpos (Mota, 2003), tendo influência sobre as características produtivas e às relacionadas à saúde animal (Machado et al., 2005).

Dentre os produtos dos genes localizados nessa região, há duas classes de antígenos: Classe I que são encontrados na superfície das células do organismo, e a Classe II que são expressos em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos (Mota, 2003). Na Classe II, em bovinos, há predominância do loco DR, relacionados com a ação imunológica específica, sendo que os genes BoLA-DRB3 tem sido o mais amplamente estudado por ser extremamente polimórfico (Takeshima & Aida, 2006; Wu et al., 2010).

Em vacas leiteiras, a maioria dos estudos focaram no éxon 2 da classe BoLA-DRB3 (BoLA-DRB3.2) por seu polimorfismo (Sharif et al., 1998; Ledwige et al., 2001; Sharif et al., 2003), além de sua associação com a CCS (Sharif et al., 1998; Ledwige et al., 2001).

Pouca informação está disponível sobre os polimorfismos genéticos em rebanhos nacionais (Mota et al., 2002; Machado et al., 2005; Nascimento et al., 2006), enquanto que no Estado de Pernambuco não existem dados relacionados ao gene citado.

Desta forma, esse trabalho teve por objetivo a identificação dos alelos do gene BoLA-DRB3 em vacas leiteiras 5/8 Girolando e Holandês, em rebanhos de referência no Estado de Pernambuco.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais

Foram selecionadas 46 fêmeas puras da raça Holandesa e 104 fêmeas cruzadas 5/8 Girolando, provenientes de rebanhos de referência e controlados, localizados na bacia leiteira do Estado de Pernambuco, pertencentes ao Instituto Agrônomo de

Pernambuco (IPA), nas Estações Experimentais de São Bento do Una e Arcoverde, respectivamente.

3.2.2 Coleta e extração de DNA

Realizou-se a coleta de amostras individuais de 4 (quatro) mL de sangue total em tubos para coleta de sangue à vácuo com EDTA. A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns. Utilizou-se o kit de extração AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen), seguindo protocolo disponibilizado pela empresa. A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de Agarose a 1%, corado com *Syber Green*, junto ao marcador de peso molecular com 100pb (*DNA ladder*), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado.

3.2.3 Amplificação do gene BoLA-DRB3

A amplificação utilizou uma adaptação da metodologia descrita por Van Eijk et al. (1992), conforme descrito por Vilaça et al. (2011) e duas adaptações nos ciclos de temperatura, descritas abaixo. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a primeira amplificação foram: HL030 (5'-TCCTCTCTCTGCAGCACATTCC-3') e HL031 (5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), sendo esta constituída de 3µL de DNA; 1X Tris-HCl pH 8,0; 100 µM de dNTP mix; 2,5 mM de MgCl₂; 0,5 mM de cada *primer* e uma unidade de Taq DNA polimerase. Após a primeira etapa de amplificação, uma segunda reação de PCR foi realizada, utilizando para isso 3µL da solução da primeira reação de PCR com concentrações de reagentes conforme descrito

para a primeira etapa, exceto os *primers* que foram: HL030 e HL032 (5'-TCGCCGCTGCCACAGT-3'). O *primer* HL032 possui uma sequência interna em relação à sequência amplificada na primeira etapa de PCR, possuindo uma superposição de oito bases com o *primer* HL031.

Os ciclos de temperatura para a primeira reação foram: desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C seguida de dez ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos com variações de 62°C e um minuto a 72°C, permanecendo em uma etapa de extensão final de dez minutos a 72°C. As condições térmicas da segunda variação da reação foram: 25 ciclos com um minuto a 94°C e 30 segundos a 67°C, seguidos de cinco minutos a 72°C. Para conferir os produtos de amplificação do PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com *Syber Green*, junto ao marcador de peso molecular conhecido (100pb DNA *ladder*) sendo seguido de fotodocumentação.

3.2.4 Sequenciamento do gene BoLA-DRB3

Após a amplificação por PCR, os produtos foram sequenciados no Laboratório de Biotecnologia Animal na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, pertencente à Universidade de São Paulo – USP, na cidade de Piracicaba (SP).

A purificação inicial das amostras de PCR foi realizada pelo kit Agencourt AMPure XP (Agencourt Bioscience) com utilização de 10µL da reação e 18µL das esferas magnéticas. Após o preparo da reação, as amostras foram levadas ao termociclador com desnaturação inicial a 95°C por um minuto; desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 50°C por 15 segundos; e extensão a 60°C por dois minutos. A etapa de sequenciamento das amostras amplificadas foi realizada em equipamento ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.2.5 Identificação dos alelos

A identificação dos alelos que compõem o genótipo dos animais foi realizada por comparação aos alelos bovinos disponíveis no *Immuno Polymorphism Database* (IPD) relativos ao MHC (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.2.6 Ocorrência de homozigose e Equilíbrio Hardy-Weinberg

A ocorrência de homozigose foi verificada pela observação direta dos *strands* direto e reverso usando o software Geneious versão 5.5.6. (Drummond et al., 2011).

Após a identificação e atribuição dos alelos aos animais (genótipos), o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi testado com o software Arlequin versão 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

3.2.7 Diversidade, divergência e filogenia

Para determinação da diversidade, divergência e filogenia utilizou-se o software MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011). A diversidade e a divergência foram calculadas segundo Nei e Kumar, 2000. Para as árvores filogenéticas, foi utilizado o Coeficiente de Jaccard, com agrupamento pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) com 1.000 repetições para o *bootstrap*. O método UPGMA utiliza para a formação dos grupos a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo (Telles et al., 2001).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Frequência alélica

Cinco amostras do grupo 5/8 Girolando ficaram impossibilitadas de serem avaliadas. Os sequenciamentos sem problemas foram avaliados comparativamente aos alelos descritos nos bancos de dados mencionados, sendo que 80 animais 5/8 Girolando e 44 animais da raça Holandesa tiveram seus genótipos completamente identificados, sendo os demais não identificados (NI).

Foram identificados um total de 39 alelos, o que demonstra o elevado polimorfismo para o loco BoLA-DRB3.2 (Tabela 3.1) nos rebanhos estudados, dados do IPD e NCBI descrevem atualmente 107 e 133 alelos, respectivamente. Elevados números de alelos também foram verificados em estudo realizados por Van Eijk et al. (1992) com 54, Sharif et al. (1998) com 27, Machado et al. (2005) com 41 e Nascimento et al. (2006) com 37 alelos.

Os alelos mais frequentes observados na população total foram 0101 (6,13%), R (14,11%) e 1101 (14,72%), sendo 13 alelos comuns aos dois rebanhos. No rebanho 5/8 Girolando observaram-se 32 alelos, com variação de 0,77 a 12,31%. Já no rebanho Holandês foram observados 20 alelos com frequências que variaram entre 1,89 e 22,64%.

No rebanho 5/8 Girolando, a soma das frequências dos alelos mais comuns foi de 26,92%, sendo eles 2101 (6,15%), R (8,46%) e 1101 (12,31%). Em estudos realizados utilizando a nomenclatura descrita por Van Eijk et al. (1992) e Gelhaus et al. (1995) e a técnica de PCR-RFLP, Machado et al. (2005) trabalhando com animais da raça Gir no Brasil, também verificaram entre os alelos mais presentes o alelo 35 (7,6%) que

corresponde ao 2101 (<http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/drbtabs.html>), tal como Mota et al. (2002) que também observaram alta frequência para este alelo (10,71%). Não foi encontrada na literatura associação do alelo 2101 com características de produção ou resistência a doenças. Dietz et al. (1997) avaliando a associação entre os alelos do BoLA-DRB3.2 com variáveis imunológicas em vacas Holandesas encontraram altas frequências para o alelo 22 (7,9%), que corresponde ao alelo 1101, o que também foi observado por Wu et al. (2010) descrevendo a variabilidade genética do gene BoLA-DRB3 em vacas Holandesas na China, com uma frequência de 23,53% para este alelo. Duangjinda et al. (2009) no estudo com animais Holandês x Zebu associou os alelos 15, 51 e 22 com resistência em populações mestiças.

Os alelos mais frequentes no rebanho Holandês foram 0101 (11,32%), 1101 (15,09%) e R (22,64%), sendo a soma das frequências para esses alelos de 49,05%. Dietz et al. (1997) e Wu et al. (2010), encontraram frequências elevadas para o alelo 24 (8,3 e 9,22%, respectivamente), correspondente ao alelo 0101 do presente estudo. Rupp et al. (2007) reavaliando a associação dos alelos do gene BoLA-DRB3 e a resistência a mastite em 328 animais Holandesas no Canadá, associaram os alelos 24 e 8 com maior risco de mastite clínica e o alelo 22 com maior CCS. O alelo 1201, que corresponde ao alelo 8, foi encontrado nos dois rebanhos analisados com uma frequência alélica total de 1,84%. Dentre as seqüências analisadas, 18 de animais 5/8 Girolando e três de animais Holandês, não tiveram um ou ambos os alelos identificados, sugerindo a possibilidade de se caracterizarem como novos alelos presentes nessa população (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Frequência de alelos identificados e não identificados (NI) para o gene BoLA-DRB3.2

Alelos	Rebanho				TOTAL (%)
	5/8 Girolando		Holandês		
	N	%	N	%	
0101	4	3,08	6	11,32	6,13
0201	1	0,77			0,61
0801			1	1,89	0,61
0901	2	1,54			1,22
0902	5	3,85	1	1,89	3,68
1	5	3,85			3,07
1001	1	0,77	1	1,89	1,22
1101	16	12,31	8	15,09	14,72
1103	1	0,77			0,61
1201	2	1,54	1	1,89	1,84
13	1	0,77			0,61
16			1	1,89	0,61
14011	2	1,54			1,22
1501	6	4,62			3,68
1701	6	4,62	1	1,89	4,29
1801	1	0,77	1	1,89	1,22
2			2	3,77	1,22
2101	8	6,15			4,90
2703	1	0,77	3	5,66	2,45
2709			1	1,89	0,61
2710	2	1,54	2	3,77	2,45
2801	1	0,77			0,61
2802	5	3,85			3,07
3			1	1,89	0,61
3-1	4	3,08	3	5,66	4,29
3001	2	1,54			1,22
31	1	0,77			0,61
3202			1	1,89	0,61
3601	6	4,62			3,68
50021	1	0,77	1	1,89	1,22
R	11	8,46	12	22,64	14,11
R-148	2	1,54			1,22
R-154	1	0,77			0,61
R-156	3	2,31			1,84
R-161			2	3,77	1,22
R-164	4	3,08			2,45
R-172	1	0,77			0,61
YA97sp3	5	3,85	2	3,77	4,29
qbb	1	0,77			0,61
Total parcial	112	86,15	51	96,23	
NI	18	13,85	3	3,77	
Total	130	100,00	54	100,00	100,00

3.3.2 Identificação de SNP

Através do alinhamento das sequências foi possível observar pontos polimórficos com troca de nucleotídeos e similaridades, com a presença de diferentes participações dos homozigotos e heterozigotos nos rebanhos estudados (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Frequência dos genótipos homozigotos e heterozigotos identificados e não identificados

Situação	Genótipos	Rebanho*			
		5/8 Girolando		Holandês	
		N	%	N	%
Identificados	Homozigoto	58	59,79 (72,50)	38	82,61 (86,36)
	Heterozigoto	22	22,68 (27,50)	6	13,04 (13,64)
Não identificados	Homozigoto	6	6,19	1	2,17
	Heterozigoto	11	11,34	1	2,17
Total		97	100,00	46	100,00

*Valores entre parênteses correspondem ao cálculo considerando somente os identificados

Na Figura 3.1 pode-se observar picos uniformes sem a presença de duplos picos o que caracteriza um animal homozigoto, e na Figura 3.2 tem-se o alinhamento de um animal heterozigoto com a presença de dois picos para cada base nitrogenada, característica de polimorfismo nessa região, sendo que a presença do polimorfismo demonstra a possibilidade de alteração no RNA (transcrição) e conseqüentemente no aminoácido formado no processo de tradução, sendo que um grande número de variações de bases encontrado está de acordo com Ledwige et al. (2001) e Sharif et al. (2003).

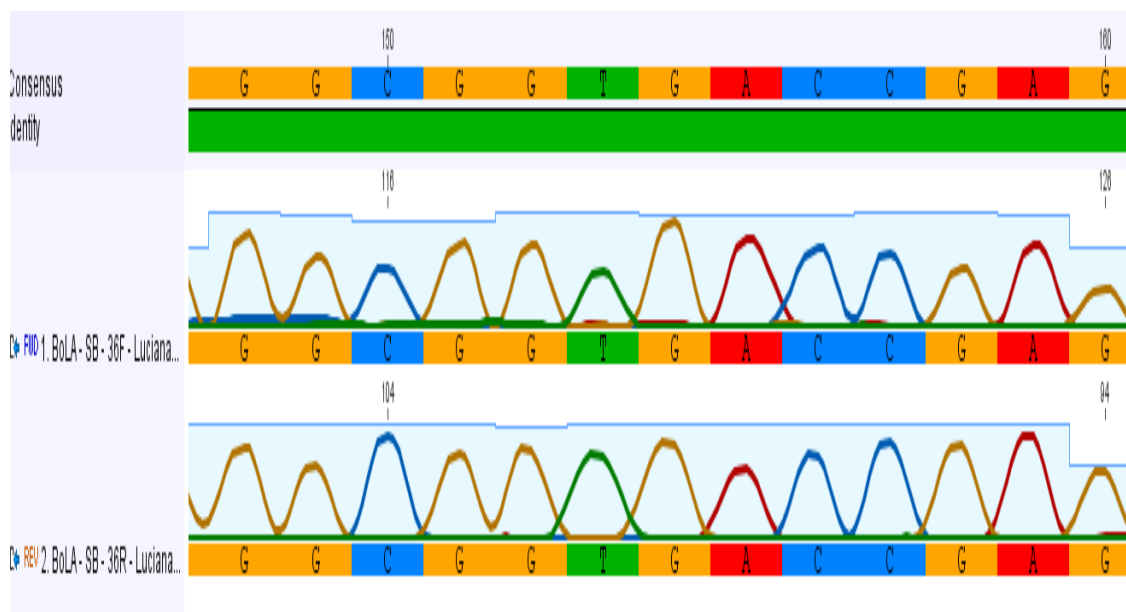


Figura 3.1. Alinhamento de um indivíduo homocigoto

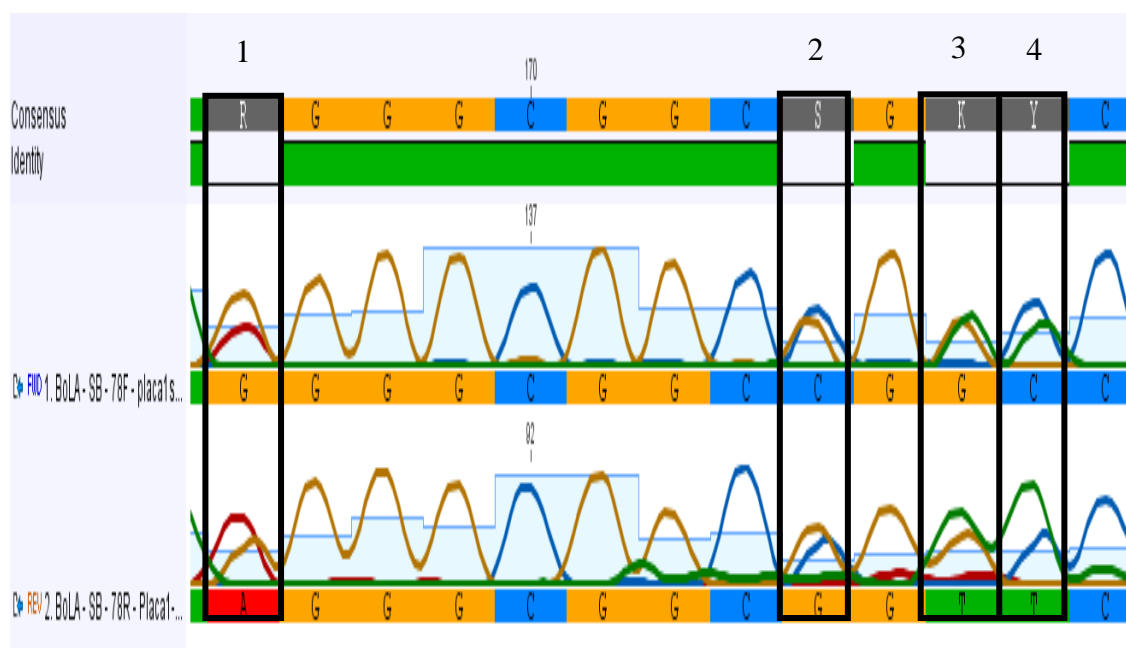


Figura 3.2. Identificação dos SNPs em um indivíduo heterocigoto

Uma vez realizado o alinhamento e a verificação dos pontos polimórficos é possível observar a relação de proximidade entre os diferentes rebanhos e dentro de cada rebanho. Assim, verificaram-se de forma geral, valores baixos de similaridade, demonstrando maior variabilidade genética entre os animais, sendo o menor percentual de similaridade encontrado para o rebanho 5/8 Girolando (6,97%). É importante também a avaliação das distâncias genéticas entre e dentro das populações, uma vez que estas podem ser utilizadas para direcionar estratégias de cruzamentos, conservação de recursos genéticos e detectar doenças geneticamente importantes (Horín et al., 1999), além de transformar todas as informações disponível sobre as populações avaliadas em um único número (Serrano et al., 2004). A estimativa de distância entre os rebanhos Holandês e Girolando, foi de 0,075, com um erro padrão de 0,011, o pequeno valor de distância encontrado evidencia menores chances de combinações genéticas mais promissoras.

Uma medida importante para a determinação da diversidade genética é a avaliação da heterozigose. Foi observado na Tabela 3.2, uma menor proporção de animais heterozigotos nos dois rebanhos. Pela análise dos parâmetros de variabilidade genética observa-se que a heterozigosidade observada (H_o), apresentou valores menores que a heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 3.3), em ambos os rebanhos analisados, indicando que há menos heterozigotos na população do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa baixa quantidade de animais heterozigotos na população pode ocasionar endogamia, podendo fixar alelos com efeitos indesejáveis ou mesmo combinações heterozigóticas que produzem resultados favoráveis (Sánchez, 2008). Valores elevados de H_e , também foi constatado por Egito et al. (2004) realizando estudo da variabilidade genética baseada em marcadores microssatélites em diferentes

raças bovinas, com índices de He para animais Holandês e Gir de 58,9 e 64,1, respectivamente.

O índice de diversidade molecular revelou maior diversidade entre os animais cruzados, com nível de diferenciação entre rebanhos de 0,02614 (Tabela 3.3). Verifica-se que a diversidade entre os rebanhos foi menor que a diversidade entre os animais do mesmo rebanho, já que existe uma maior variabilidade genética dentro de uma população do que entre populações distintas, além de tratarmos de rebanhos contendo animais puros e cruzados. Em estudo realizado por Serrano et al. (2004) sobre a distância e a variabilidade genética entre e dentro das raças verificou que a maior parte da variabilidade genética (70,04%) também foi devido a diferenças entre indivíduos dentro da mesma população, enquanto o restante (29,96%) estava relacionada às diferenças entre raças (Caracu, Crioulo Lageano, Curraleiro, Mocho Nacional, Pantaneiro, Holandês e Nelore).

Para aproveitar as vantagens fornecidas pela heterose, a utilização de informações de divergência genética é importante em sistemas de cruzamento, uma vez que genitores divergentes, que apresentam alelos de interesse, são mais indicados para promover combinações gênicas favoráveis (Chiorato, 2004). A divergência genética observada entre as sequências da população geral foi de 40,8792 (Tabela 3.3), sendo que quanto maior a divergência encontrada dentro de uma população maior será o número de alelos diferentes presentes, o que é interessante quando se objetiva cruzamentos superiores. Encontraram-se valores de divergência maior quando se observou a sequência dos animais cruzados (44,7189), que se caracterizaram por apresentar um maior número de alelos, sendo a divergência dentro da população total de 40,8792.

Tabela 3.3. Diversidade e divergência entre e dentro dos rebanhos para o gene BoLA-DRB3

Descrição		
Cálculos baseados nos haplótipos	5/8 Girolando	
	Holandês	
Índice de diversidade padrão	27,50	13,64
Ho ^a		
He ^b	94,51	88,40
Índice de diversidade molecular	0,945126 (0,720970) ^c	0,884013 (0,691949)
Equilíbrio Hardy-Weinberg	< 0,00001 ^d	< 0,00001
Diferenciação entre populações		0,02614 (0,00327)
Cálculos baseados nas sequências^s	Distância	
	Distância	
Diversidade interpopulacional média	0,025516	(0,028530)
Diversidade média dentro dos rebanhos	0,383275	(0,322849)
Coefficiente de diferenciação evolutiva	0,062419	(0,003811)
Divergência média sobre todos os pares de sequências	0,408792	(0,444617)
Divergência média sobre todos os pares de sequências dentro dos rebanhos		
5/8 Girolando	0,447189	(0,396681)
Holandês	0,319361	(0,273715)
Divergência sobre os pares de sequências entre rebanhos		
5/8 Girolando		0,279278
Holandês	0,393859	
Divergência líquida sobre os pares de sequências entre rebanhos		
5/8 Girolando		0,007677
Holandês	0,010584	

^aHeterozigosidade observada^bHeterozigosidade esperada^cErros padrões entre parênteses^dValor *p*^sÉ apresentado o número de substituições por sítio à partir da ponderação sobre todos os pares de sequências dentre de cada grupo. Erros padrões das estimativas são mostrados entre parênteses. Todas as posições contendo lacunas e dados faltando foram eliminadas, restando no total 128 posições.

Utilizando as sequências dos alelos identificados na amostra estudada, a árvore filogenética da Figura 3.3 demonstra a homologia entre os diferentes alelos, onde verificou-se a presença de seis grupos principais (*clusters*) com o corte da árvore em torno de 0,04 de similaridade. Verifica-se a formação de um cluster contendo apenas o alelo 0801. A maior similaridade foi verificada em cinco grupos: 1 (2, R e 1501), 2 (3001 e 31), 3 (2703 e 3), 4 (1 e 14011) e 5 (1101 e 3-1).

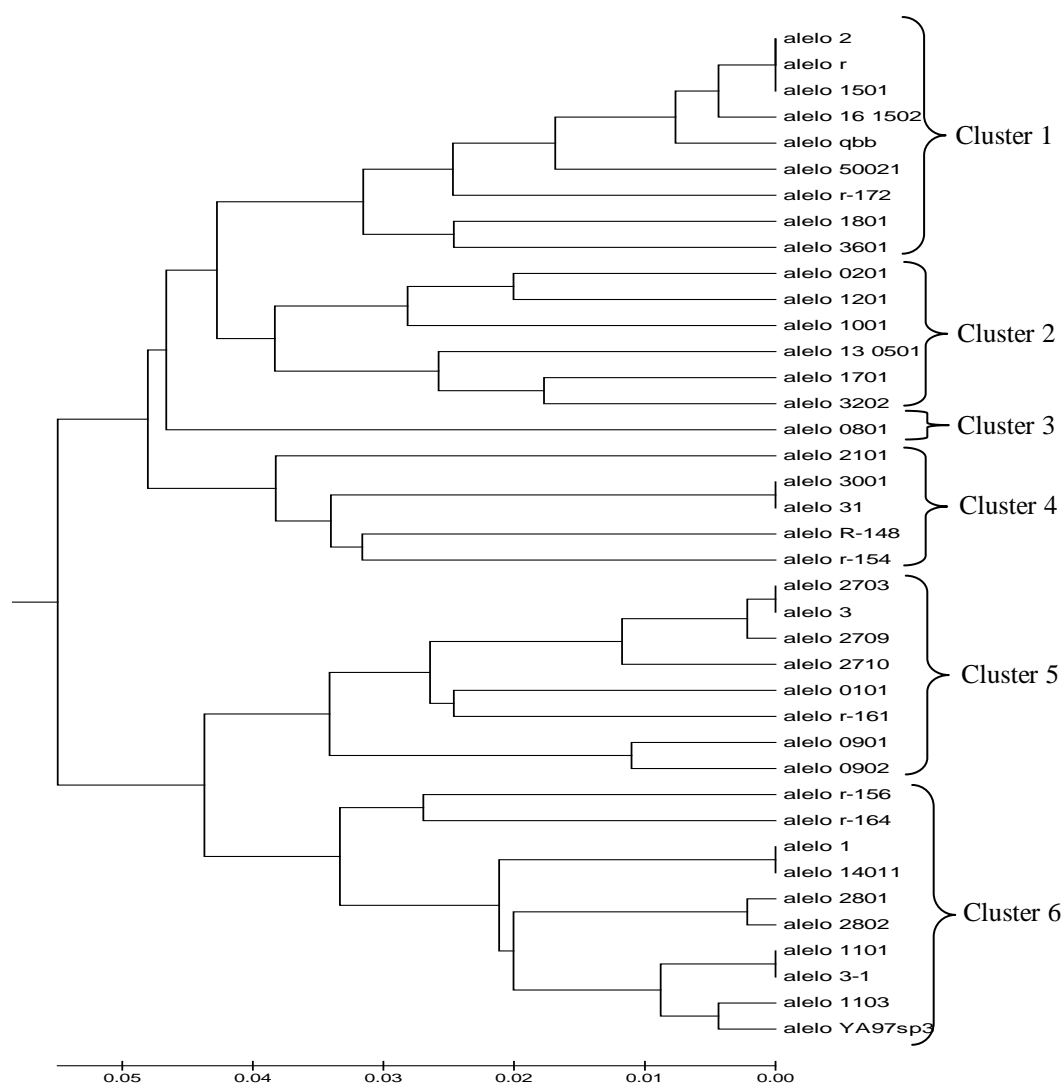


Figura 3.3. Relação evolutiva entre alelos identificados, a árvore ótima com soma de ramos igual a 0,81161061 é mostrada (cálculo de distâncias por Máxima Verossimilhança composta, com agrupamento UPGMA sobre 231 posições de nucleotídeos final)

Em relação aos alelos que não puderam ser identificados junto ao EBI e NCBI, foi avaliada a possibilidade de os mesmos pertencerem ou não a região de interesse neste estudo. O julgamento foi através do alinhamento com as sequências dos alelos identificados, onde nove não possuíam qualquer identidade ou região de conservação em comum com a região de interesse, sequer eram apresentadas nos bancos de dados de referência como pertencentes à região de interesse, sendo descartadas. As 12 sequências restantes, que possuíam regiões de conservação em comum, e obtiveram alinhamento aos alelos para a região de interesse (Figura 3.4), com particularidades polimórficas (Figura 3.5), foram comparadas evolutivamente (Figura 3.6).

Foi possível observar a presença de pontos polimórficos com troca de nucleotídeos, adição e deleções de nucleotídeos para as 12 sequências avaliadas, sendo essas consideradas potencialmente como novos alelos, uma vez que não foram descritos anteriormente (Figuras 3.5). No entanto, a árvore filogenética na Figura 3.6 mostra a presença de três sequências (AV-141F, AV-18F e AV-133F) que não participaram de nenhum grupo formado, apresentando baixas homologias com os demais alelos e entre eles (Figura 3.6), sendo esses considerados apresentar maior probabilidade de serem novos alelos.

Alelo					1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1														
	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5							
	0	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9	0	3	4	5	6	7	8	2	3	4	8	9	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2				
alelo 0101	T	T	T	C	A	C	C	G	A	G	C	G	T	G	C	G	G	T	C	T	G	A	G	A	T	A	A	T	G	G	A	G	A	A	G	A	G				
SB-88C-NI		
AV-158C-NI			
AV-170C-NI			
AV-173C-NI			
AV-178C-NI			
AV-194C-NI			
AV-200C-NI			
SB-52C-NI			
AV-133F-NI			
AV-141F-NI			
AV-18F-NI			
AV-188F-NI			
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9			
	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	
alelo 0101	G	C	G	C	T	T	C	G	A	C	A	G	C	G	A	C	T	G	G	C	G	A	G	T	C	C	G	G	G	C	G	T	G	A	C	C	G	A	C	T	G
SB-88C-NI	
AV-158C-NI	
AV-170C-NI	
AV-173C-NI	
AV-178C-NI	
AV-194C-NI	
AV-200C-NI	
SB-52C-NI	
AV-133F-NI	
AV-141F-NI	
AV-18F-NI	
AV-188F-NI	
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	7	7	7	9	9	9	9	9	9	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	
	5	6	7	8	8	9	0	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	4	5	6	7	8	9	0	8	9	0	1	2	3	5	6	7	9	0	1	2	3		
alelo 0101	C	G	C	C	A	A	C	G	C	C	A	G	C	T	G	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G	C	T	G	T	G	C	G	C	G	C	G	A	G			
SB-88C-NI	
AV-158C-NI	
AV-170C-NI	
AV-173C-NI	
AV-178C-NI	
AV-194C-NI	
AV-200C-NI	
SB-52C-NI	
AV-133F-NI	
AV-141F-NI	
AV-18F-NI	
AV-188F-NI	

Figura 3.4. Identificação de regiões de conservação com identidade total para os *strands* não identificados, mas pertencentes à região de interesse. Alinhamento com todos os alelos identificados, sendo apresentado apenas o alelo 0101 para posicionamento e referência. São apresentados somente as regiões com mais de três bases

Alelo	3	5	5	5	7	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	0	1	1	1	1	2	2	2	2							
	9	2	3	5	0	1	5	6	8	2	4	6	8	9	4	5	7	2	1	2	7	8	0	7	7							
alelo 0101	-	G	C	G	T	A	T	A	G	G	G	G	C	A	T	T	A	G	G	G	G	G	A	G	A							
SB-88C-NI	-							
AV-158C-NI	-							
AV-170C-NI	-							
AV-173C-NI	-							
AV-178C-NI	-							
AV-194C-NI	-							
AV-200C-NI	A							
SB-52C-NI	-	T							
AV-133F-NI	-	.	.	.	A	G							
AV-141F-NI	-	.	.	.	C	A							
AV-18F-NI	-	C	T	T	T	C	A	A	G	A							
AV-188F-NI	-	T	.	T	A							
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3							
	4	4	5	5	6	6	6	6	7	7	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5		
	0	1	0	1	1	2	3	6	3	6	1	8	1	3	5	6	4	8	3	4	5	6	3	5	7	8	9	0	1	2		
alelo 0101	G	A	G	A	C	G	G	C	G	-	G	G	A	T	T	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
SB-88C-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	
AV-158C-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	
AV-170C-NI	A	G	T	G	A	A	A	A	A	C	
AV-173C-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	
AV-178C-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	
AV-194C-NI	A	G	T	G	A	A	A	A	A	-	-
AV-200C-NI	A	G	T	G	A	A	A	A	A	-	-
SB-52C-NI	A	G	T	G	A	A	A	A	A	-	-
AV-133F-NI	A	T	C	G	G	C	C	.	A	T	C	A	T	C	C	T	G	A	G	T	C	G	A	A	A	A	A	A	-	-		
AV-141F-NI	G	T	G	A	A	A	A	A	-	-
AV-18F-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	
AV-188F-NI	G	T	G	A	A	A	A	-	-	

Figura 3.5. Identificação de regiões únicas (*singletons*) para os *strands* não identificados, mas pertencentes à região de interesse. Alinhamento com todos os alelos identificados, sendo apresentado apenas o alelo 0101 para posicionamento e referência

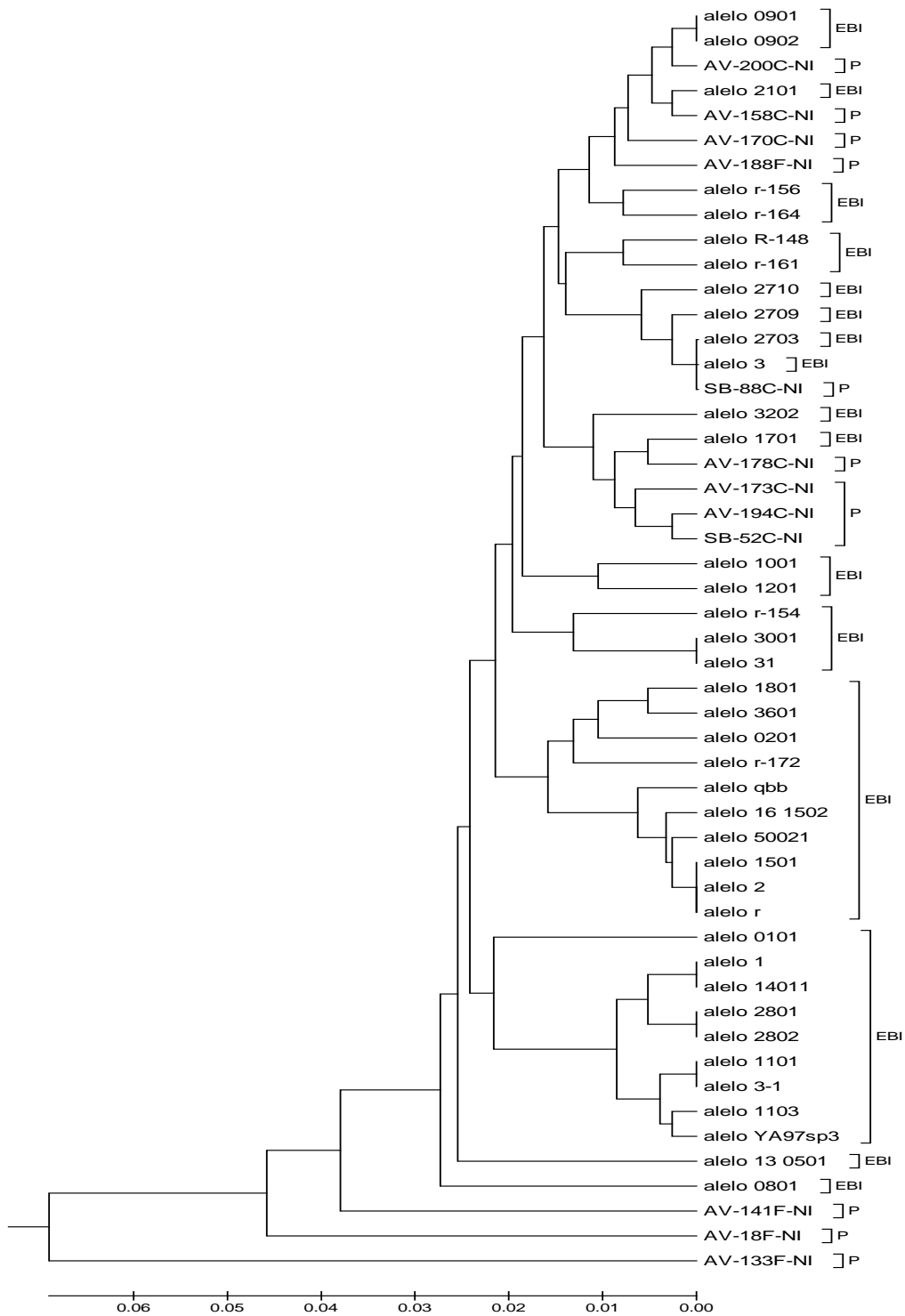


Figura 3.6. Relação evolutiva entre alelos identificados e não identificados, a árvore ótima com soma de ramos igual a 0,62059115 é mostrada, onde EBI são os identificados (EBI e NCBI) e P os não identificados (cálculo de distâncias por Máxima Verossimilhança composta, com agrupamento UPGMA sobre 194 posições de nucleotídeos final)

3.4 Conclusões

Foram identificados 39 alelos, sendo que os mais frequentes para o rebanho 5/8 Girolando foram 2101, R e 1101, enquanto para o rebanho Holandês foram 0101, 1101 e R. Foi verificada variabilidade genética nos rebanhos avaliados, os quais divergiram, sendo o rebanho 5/8 Girolando o que apresentou maior variabilidade.

Dentre doze sequências avaliadas e não reconhecidas nos bancos de dados, três foram consideradas com grande possibilidade de serem novos alelos.

Alguns dos alelos encontrados foram relatados como conferindo maior resistência à mastite, conferindo aos animais que os possuíam com maior valor genético para a pecuária leiteira, podendo essas informações serem consideradas em programas de melhoramento genético animal.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- CHIORATO, A.F. **Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico-IAC**. 2004. 98p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento vegetal) – Instituto Agronômico de Campinas- IAC, Campinas - SP.
- DIETZ, A.B.; DETILLEUX, J.C.; FREEMAN, A.E. et al. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Alleles with Immunological Traits of Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.2, p.400-405, 1997.
- DUQUE, P.V.T.; BORGES, K.E.; PICCININ, A. Mastite bovina: descrição de doença e seus impactos na economia brasileira. In: II SIMPÓSIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DO CENTRO OESTE PAULISTA, 2005, São Paulo. **Anais... Garça: Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista**, 2005. p.1-6.
- DRUMMOND, R.A.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y. et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**, v.41, p.276–281, 2011.
- DUANGJINDA, M.; BUAYAI, D; PATTARAJINDA, V. et al. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. **Journal of Animal Science**, v.87, p.469-476, 2009.
- EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; MAMANI, E.M. et al. Variabilidade genética de raças bovinas baseadas em marcadores STR. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2004, São Paulo. **Anais... Pirassununga: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2004. p.1-4.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, n.3, p.564–567, 2010.
- GELHAUS, L.; SCHNITTGER, L.; MEHLITZ, D. et al. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. **Animal Genetics**, v. 26, p.147, 1995.
- HOŘÍN, P.; RYCHLÍK, I.; TEMPLETON, J. W. et al. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. **European Journal of Immunogenetics**, v. 26, p 311-313, 1999.
- Immuno Polymorphism Database – IPD. 2012. **MHC** Available at: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html>>. Accessed on: 10 jul., 2012.
- LEDWIGE, S. A.; MALLARD, B. A.; GIBSON, J. P. et al. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. **Animal Genetics**, v.32, p.219-221, 2001.
- MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L. et al. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.380-389, 2005.
- MILLER, G.Y.; BARTLETT, P.C.; LANCE, S.E. et al. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.8, p.15, 1993.
- MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E. et al. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p.1-6, 2011.
- MOTA, A.F. **Descobrendo genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina**. 2003. 170p. Tese (Doutorado em

- Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOTA, A.F.; GABRIEL, J.E.; MARTINEZ, M.L. et al. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gyr cattle (*Bos indicus*). **European Journal of Immunogenetics**, v.29, p.223-227, 2002.
- NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. et al. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.641-647, 2006.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. 2012. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Accessed on: 10 jul., 2012.
- RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D. et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.810-812, 2007.
- RUPP, R.; HERNANDEZ, A.; MALLARD, B.A. Association of Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) DRB3.2 with Immune Response, Mastitis, and Production and Type Traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.90, n. 2, p.1029-1038, 2007.
- SÁNCHEZ, C.F.B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.
- SERRANO, G.M.; DO EGITO, A.A.; McMANUS, C. et al. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.6, p.543-549, 2004.
- SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. **Animal Genetics**, v.34, p.116-123, 2003.
- SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; DEKKERS, J. C. M.; LESLIE, K. E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.185-193, 1998.
- TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v.77, p.138-150, 2006.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.
- TELLES, M.P.C.; MONTEIRO, M.S.R.; RODRIGUES, F.M. et al. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.87-95, 2001.
- VAN EIJK, M.J.T.; STEWART-HAYNES, J.A.; LEWIN, H.A. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 23, p.483-496, 1992.

- VILAÇA, L.F.; DINIZ, W.J.S.; DE MELO, T.F. et al. Otimização do método de amplificação em PCR para identificação de polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2. In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2011, Alagoas. **Anais...** Maceió: X Congresso Internacional do Leite, 2011. p.1-3
- WU, X.X.; YANG, Z.P.; WANG, X.L.; et al. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, p. 221-225, 2010.

4 CONCLUSÃO GERAL

Atualmente são poucos os trabalhos realizados no Brasil relacionados à identificação de genes possivelmente ligados a resistência à mastite, e à distribuição de seus alelos e genótipos, sendo desconhecidas informações do possível distanciamento entre animais oriundos de diferentes cruzamentos e a frequência de seus alelos. Esta é uma área que tem muito a investigar e descobrir, e que pode trazer grandes contribuições.

Alteração nas condições da PCR possibilitou a amplificação do DNA de animais puros e cruzados da região e permitiu a identificação de 39 alelos sendo doze sequências consideradas potencialmente novos alelos.

Problemas ligados à mastite nos rebanhos podem ser minimizados com o auxílio do conhecimento dos genes relacionados e com posterior seleção de animais mais resistentes, sendo necessária uma maior quantidade de estudos direcionados a esse enfoque.