

Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no estado de Pernambuco

Vilaça, L.F.¹*; Diniz, W.J.S.¹; Melo, T.F.¹; Oliveira, J.C.V.²; Guido, S.I.³; Brito, C.E.V.L.¹; Costa, N.A.⁴ e Santoro, K.R.¹

¹Unidade Acadêmica de Garanhuns. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns. PE. Brasil.

²Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA). Arcoverde. PE. Brasil.

³Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA). São Bento do Una. PE. Brasil.

⁴Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns. PE. Brasil.

RESUMO

A região BoLA (Bovine Lymphocyte Antigen) tem recebido atenção por seus alelos terem ação sobre funções imunológicas e características de produção. O presente estudo teve por objetivo a identificação e associação dos polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2 em 145 vacas leiteiras 5/8 Girolando e Holandês, em rebanhos de referência no Estado de Pernambuco. Identificaram-se 39 alelos com frequências alélicas variando entre 0,42 e 15,97%, sendo os alelos mais frequentes 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 5/8 Girolando, foi de 0,075. A heterozigosidade observada (Ho) apresentou valores menores que a heterozigosidade esperada (He). Observou-se um elevado polimorfismo do gene BoLA-DRB3.2 para os rebanhos estudados e um elevado número de alelos que desempenharam efeitos positivos na produção de leite, com destaque para os alelos 16 e 0101.

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

SUMMARY

The BoLA region (Bovine Lymphocyte Antigen), has been paid attention to because of its alleles having influence on immune functions and production traits. The present study aimed at the identification and association of BoLA-DRB3.2 gene polymorphisms in 145 5/8 Girolando and Holstein dairy cows, in reference herds in the state of Pernambuco. 39 alleles with frequencies ranging from 0.42 to 15.97% were identified, and the most common alleles were 0101 (6.13%), R (14.11%) and 1101 (14.72%). There were low similarity values, demonstrating a greater genetic variability among animals. The distance between the 5/8 Girolando and Holstein, was 0.075. Observed heterozygosity values (Ho) were lower than those for expected heterozygosity (He). There was a high BoLA-DRB3.2 gene polymorphism for the herds and a high number of alleles that had positive effects on milk production, especially for 16 and 0101 alleles.

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Bovino.
Complexo MHC.
Mastite.
Produção de leite.

ADDITIONAL KEYWORDS

Cattle.
MHC complex.
Mastitis.
Milk production.

INFORMACIÓN

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 12.09.2013
Aceptado/Accepted: 13.05.2015
On-line: 16.03.2016
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
luciana-vilaca@hotmail.com

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 do gado leiteiro destaca-se a mastite, que acarreta grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, pela redução da quantidade, pelo comprometimento da qualidade do leite e os gastos com medicamentos (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 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) é uma região do genoma bovino mapeado no braço curto do cromossomo 23 (BTA23) e que tem recebido atenção em relação à sua associação à resistência à

mastite (Sharif *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2003; Takeshima and Aida, 2006; Wu *et al.*, 2010), sendo alvo potencial na identificação de genes candidatos (Machado *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010).

Há duas classes de antígenos nesta região: a 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 o gene BoLA-DRB3 tem sido amplamente estudado por seu grande polimorfismo (Takeshima and Aida, 2006; Wu *et al.*, 2010), em especial no éxon 2 (BoLA-DRB3.2) por possuir associação com a contagem de células somáticas (CCS) (Sharif *et al.*, 1998) e alguns aspectos produtivos (Nascimento *et al.*, 2006).

Pouca informação está disponível sobre o BoLA-DRB3.2 em rebanhos nacionais (Mota *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2006), seja relacionado à sua distribuição populacional em diferentes raças e rebanhos, bem como seus polimorfismos e possíveis associações. Assim, este trabalho teve por objetivo a identificação e associação dos polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2 em vacas leiteiras 5/8 Girolando e Holandês, em rebanhos de referência no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 46 fêmeas puras da raça Holandesa e 99 fêmeas cruzadas 5/8 Girolando, provenientes de dois rebanhos de referência, 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.

Realizou-se a coleta de amostras individuais de 4 (quatro) mL de sangue total em tubos para coleta de sangue a vácuo com EDTA. A extração de DNA foi realizada com AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, Brasil), seguindo o protocolo da empresa, e a qualidade do DNA extraído avaliada em gel de agarose a 1%.

A amplificação utilizou o protocolo descrito em Vilaça *et al.* (2011), o qual é uma adaptação da metodologia de Van Eijk *et al.* (1992). Foi realizada uma NESTED-PCR, sendo os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a primeira amplificação: HL030 (5'-TCCTCTCTGCGACATTCC-3') e HL031 (5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), sendo esta constituída de 3 µL 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 do produto da primeira PCR com concentrações de reagentes conforme descrito para a primeira etapa, exceto os *primers* que foram: HL030 e HL032 (5'-TCGCCGCTGCCACAGT-3'), o qual possui uma sequência interna em relação à sequência amplificada na primeira etapa

de PCR, possuindo uma superposição de oito bases com o *primer* HL031.

O ciclo de temperaturas para a primeira reação foi: desnaturação 5 min a 94°C, dez ciclos: 45 seg a 94°C, 30 seg a 62°C e 1 min a 72°C, extensão final 10 min a 72°C. As condições térmicas da segunda etapa de PCR foram 25 ciclos de: 1 min a 94°C, 30 seg a 67°C, 5 min a 72°C e extensão final como a anterior. Os produtos amplificados foram sequenciados no Laboratório de Biotecnologia Animal na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP, Piracicaba - SP), em equipamento ABI 3130 (Applied Biosystems, Brasil).

A identificação dos alelos foi realizada por alinhamento aos alelos bovinos disponíveis no *Immuno Polymorphism Database* (IPD) (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tal como em Robinson *et al.* (2010) e Miyasaka *et al.* (2012).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg, diversidade alélica e a diferenciação entre os rebanhos, utilizou o software Arlequin versão 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005).

Foram coletadas 38.040 observações de produção de leite diária em litros (média 20,73±6,65) no período de janeiro/2008 a dezembro/2012, sendo estas associadas com os polimorfismos genéticos das 46 fêmeas do rebanho Holandês, com coeficiente de parentesco médio entre as fêmeas de 0,0125 e consanguinidade média 0,00. A associação não pode ser realizada para o rebanho 5/8 Girolando devido a problemas no controle zootécnico. Foi utilizado o procedimento MIXED do SAS 9.3, através de um modelo de substituição gênica, o qual pode ser representado matricialmente por:

$$y = Xh + Mm + Za + e$$

Em que:

y= vetor de dados da produção de leite;

X e Z= matrizes de incidência de efeitos fixos (estação: chuva= junho a setembro, seca= outubro a maio) e para os efeitos aleatórios;

h= vetor de soluções para os efeitos fixos, e residual, respectivamente;

a= vetor de soluções para os efeitos aleatórios;

e= vetor de soluções para os efeitos residuais;

m= vetor de soluções para os efeitos fixos de substituição gênica para os alelos, representados pelos coeficientes de regressão;

M= a matriz contendo 0, 1 ou 2 representando o número de cópias de determinado alelo do gene, em cada indivíduo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 39 alelos (**tabela I**), demonstrando o elevado polimorfismo para o loco BoLA-DRB3.2 em ambos rebanhos estudados, sendo que o IPD e NCBI descrevem 107 e 133 alelos, respectivamente. Estes resultados concordam com os elevados polimorfismos dos estudos realizados por Van Eijk *et*

Tabela I. Frequência de alelos identificados ou não (NI) para o gene BoLA-DRB3.2 (Frequency of alleles identified or not (NI) to the BoLA-DRB3.2 gene).

| 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 |

*Resistência à mastite: (-)= susceptibilidade, (+)= resistência, (-/+)= resultados contraditórios.

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 três 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%, e 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 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 2101 (7,6%), tal como Mota *et al.* (2002) que observaram frequência de 10,71%. Dietz *et al.* (1997) avaliando vacas Holandesas encontraram frequência de 7,9% para o alelo 1101 e Wu *et al.* (2010) encontraram uma frequência de 23,53% para a mesma raça na China. Os alelos mais frequentes no rebanho Holandês foram o 0101 (11,32%), 1101 (15,09%) e R (22,64%), sendo a soma de suas frequências de 49,05%. Dietz *et al.* (1997) e Wu *et al.* (2010), encontraram frequências elevadas para o alelo 0101 (8,3 e 9,22%, respectivamente). O alelo 1201 foi encontrado nos dois rebanhos analisados com uma frequência alélica de 1,84%. Segundo Behl *et al.* (2012), o que geralmente ocorre é que poucos genes (de quatro a nove) teriam frequência superior a cinco por cento e seriam responsáveis pela maior parte da composição genética dos rebanhos (53 a 88%), sendo um possível reflexo do programa de melhoramento.

Através do alinhamento das sequências foi possível observar pontos polimórficos com troca de nucleotídeos e similaridades, com a presença de diferentes participações dos homocigotos e heterocigotos nos rebanhos estudados. Dezoito animais 5/8 Girolando e três animais Holandês, não tiveram um ou ambos os alelos identificados (**tabela II**), sugerindo a possibilidade de se caracterizarem como novos alelos presentes nessa população, os quais serão sequenciados novamente para confirmação.

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 disponíveis 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 heterocigose. Foi observada na **tabela II**, uma menor proporção de animais heterocigotos nos dois rebanhos. Não foi observado equilíbrio de Hardy-Weinberg em nenhum dos rebanhos avaliados, e pela análise dos parâmetros de variabilidade genética observa-se que a heterocigose

Tabela II. Frequência dos genótipos homocigotos e heterocigotos identificados e não identificados e diversidade e divergência entre e dentro dos rebanhos para o gene BoLA-DRB3.2, cálculo baseado nos haplótipos (Frequency of homozygotes and heterozygotes identified and unidentified genotypes and diversity and divergence within and between herds for BoLA-DRB3.2 gene calculation based on haplotypes).

| Descrição | Genótipos | Rebanho | | | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | | 5/8 Girolando | | Holandês | |
| Situação | | N | % | N | % |
| Identificados | Homocigoto | 58 | 59,79 (72,50) | 38 | 82,61 (86,36) |
| | Heterocigoto | 22 | 22,68 (27,50) | 6 | 13,04 (13,64) |
| Não identificados | Homocigoto | 6 | 6,19 | 1 | 2,17 |
| | Heterocigoto | 11 | 11,34 | 1 | 2,17 |
| Índice de diversidade padrão | Heterocigosidade observada | | 27,50 | | 13,64 |
| | Heterocigosidade esperada | | 94,51 | | 88,40 |
| Índice de diversidade molecular | — | 0,945126 (0,720970) ^a | | 0,884013 (0,691949) | |
| Equilíbrio Hardy-Weinberg | — | <0,00001 ^b | | <0,00001 | |
| Diferenciação entre populações | — | 0,02614 (0,00327) | | | |

*Valores entre parênteses correspondem ao cálculo considerando somente os identificados. ^aErros padrões entre parênteses; ^bValor p.

sidade observada (H_o), apresentou valores menores que a heterocigosidade esperada (H_e) (tabela II), em ambos os rebanhos analisados, indicando que há menos heterocigotos na população do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa baixa quantidade de animais heterocigotos na população pode ocasionar endogamia, podendo fixar alelos com efeitos indesejáveis ou mesmo combinações heterocigóticas 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 H_e 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 II). 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).

No presente estudo, observou-se que os alelos 16 e 0101 apresentaram os maiores valores na estimativa de produção de leite, enquanto que os alelos 0902 e 1701 seriam os de menores valores (tabela III). Segundo Rupp *et al.* (2007), os alelos que apresentam efeitos de resistência à mastite, tendem a estar associados com uma menor produção de leite, enquanto os alelos associados a efeitos de susceptibilidade à mastite se associariam a uma maior produção. Esses autores, associaram os alelos do gene BoLA DBR3.2 e a resistência a mastite em 328 animais Holandesas, e propuseram

Tabela III. Frequência alélica (%) e estimativa do efeito médio da substituição alélica para o gene BoLA-DRB3.2 na produção de leite (litros) em animais da raça Holandesa (Allele frequencies (%) and estimated average effect of allelic substitution for BoLA-DRB3.2 gene on milk production (liters) in Holstein cows).

| Alelo | Frequência (%) | Estimativa (erro padrão) |
|---------|----------------|-----------------------------|
| 0101 | 14,7481 | 0,1249 ($\pm 0,2121$)* |
| 0801 | 1,1991 | -0,3675 ($\pm 0,4459$)** |
| 0902 | 1,3020 | -4,4891 ($\pm 0,4285$)*** |
| 1001 | 1,3038 | -0,2621 ($\pm 0,4165$)NS |
| 1101 | 19,8020 | -1,0264 ($\pm 0,2067$)** |
| 1201 | 1,3038 | -0,2621 ($\pm 0,4165$)NS |
| 16 | 2,1677 | 0,1965 ($\pm 0,3289$)*** |
| 1701 | 0,9791 | -3,4452 ($\pm 0,4076$)*** |
| 1801 | 2,9943 | -2,5544 ($\pm 0,3218$)*** |
| 2 | 0,3228 | 0,0077 ($\pm 1,3642$)NS |
| 2703 | 3,6329 | -0,1602 ($\pm 0,2931$)* |
| 2709 | 0,3228 | 0,0077 ($\pm 1,3642$)NS |
| 2710 | 4,4578 | -2,9564 ($\pm 0,2626$)*** |
| 3 | 3,7748 | -0,1219 ($\pm 0,2842$)*** |
| 3-1 | 5,6676 | -1,1441 ($\pm 0,2566$)*** |
| 50021 | 0,8656 | -1,2619 ($\pm 0,4507$)*** |
| R | 23,6389 | -1,2209 ($\pm 0,2021$)*** |
| R-161 | 5,4547 | -2,9289 ($\pm 0,2540$)*** |
| YA97sp3 | 6,0596 | 0,0000 |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS= não significativo para o teste *t*.

que o alelo 1101 estaria associado a maior CCS e os alelos 0101 e 1201 com um maior risco a mastite clínica, mas o alelo 0101 obteve efeito positivo, corroborando com o resultado da estimativa de produção encontrado no presente estudo. Em estudo com animais Holandês \times Zebu, Duangjinda *et al.* (2009), associou o alelo 1101 com resistência em populações mestiças.

O estudo de alelos que desempenham efeitos para o aumento da produção leiteira e resistência a mastite, por meio de associação à marcadores moleculares, permite explorar a diversidade alélica para que, essas

informações venham a ser utilizadas em programas de melhoramento genético animal, permitindo que esses alelos sejam mais difundidos na população, aumentando o ganho geral e promovendo um ganho consolidado.

CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o gene BoLA-DRB3.2 apresentou um elevado número de alelos que desempenharam efeitos na produção de leite. O alelo 16 apresentou maior estimativa positiva para a produção e o alelo 0902 a menor estimativa. A descoberta de alelos com efeitos positivos na produção é de fundamental importância no auxílio a programas de melhoramento genético, elevando sua acurácia e acelerando seus resultados, pela identificação dos animais portadores dos polimorfismos desejados.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); a Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG/UFRPE). Às agências de fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq e a UFRPE pelas bolsas de iniciação científica e ao CNPq pelo financiamento do projeto (505912/2008-2).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Experimento aprovado (Processo nº 23082.004484/2009) pelo Comitê de Ética e Uso de Animais. CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE.

BIBLIOGRAFIA

- Behl, J. D.; Verma, N.K.; Tyagi, N.; Mishra, P.; Behl, R. and Joshi, B.K. 2012. The major histocompatibility complex in bovines: a review. *ISRN Vet Sci*, 2012: 1-12.
- Dietz, A.B.; Detilleux, J.C.; Freeman, A.E.; Kelley, D.H.; Stabel, J.R. and Kehrl, M.E. 1997. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci*, 80: 400-405.
- Duangjinda, M.; Buayai, D.; Pattarajinda, V.; Phasuk, Y.; Katawatin, S.; Vongpralub, T. and Chaiyotvittayakul, A. 2009. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. *J Anim Sci*, 87: 469-476.
- Egito, A.A.; Paiva, S.R.; Mamani, E.M.; Albuquerque, M.; McManus, C.; Castro, S.; Mariante, A.S. e Grattapaglia, D. 2004. Variabilidade genética de raças bovinas baseadas em marcadores STR. Pirassununga. SP. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. 2004. Anais... Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga. pp.1-4.
- Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Hořin, P.; Rychlík, I.; Templeton, J.W. and Adams, L.G. 1999. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMPI gene. *Eur J Immunogenet*, 26: 311-313.
- Immuno Polymorphism Database – IPD. 2012. MHC Acessado em: 10 jul., 2012. Online. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html> (10/04/2013).
- Machado, M.A. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zoo*, 57: 380-389.

- Miller, G.Y. 1993. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc*, 202: 15.
- Miyasaka, T.; Takeshima, S.N.; Sentsui, H. and Aida, Y. 2012. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *J Dairy Sci*, 95: 420-431. <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030211007132.pdf> (10/04/2013).
- Mota, A.F. 2003. Descobrimos genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina. 170 f. 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. and Coutinho, L.L. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gyr cattle (*Bos indicus*). *Eur J Immunogenet*, 29: 223-227.
- Nascimento, C.S.; Machado, M.A.; Martinez, M.L.; Silva, V.G.B.; Guimarães, M.F.M.; Campos, A.L.; Azevedo, A.L.S.; Teodoro, R.L.; Verneque, R.S.; Guimarães, S.E.F. and Oliveira, D.A.A. 2006. 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*). *Genet Mol Biol*, 29: 641-647. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v29n4/32114.pdf> (14/07/2012).
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (10/07/2012).
- Ribeiro, M.G.; Lara, G.H.B.; Bicudo, S.D.; Souza, A.V.G.; Salerno, T.; Siqueira, A.K. and Geraldo, J.S. 2007. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arq Bras Med Vet Zoo*, 59: 810-812. <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n3/a37v59n3.pdf>. (10/04/2013).
- Robinson, J.; Halliwell, J.A.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Parham, P. and Marsh, S.G.E. 2010. IPD - The immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res*, 38 (Database issue): D863-D869. http://nar.oxfordjournals.org/content/38/suppl_1/D863.full.pdf+html. (10/04/2013).
- Rupp, R.; Hernández, A. and Mallard, B.A. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci*, 90: 1029-1038.
- Sánchez, C.F.B. 2008. Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética. 95f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- Serrano, G.M.; Egito, A.A.; McManus, C. and Mariante, A.S. 2004. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesqui Agropecu Bras*, 39: 543-549.
- Sharif, S.; Mallard, B.A. and Wilkie, B.N. 2003. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. *Anim Genet*, 34: 116-123.
- Sharif, S.; Mallard, B.A.; Wilkie, B.N.; Sargeant, J.M.; Scott, H.M.; Dekkers, J.C. and Leslie, K.E. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet*, 29: 185-193.
- Takeshima, S.N. and AIDA, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J*, 77: 138-150.
- Van Eijk, M.J.T.; Stewart-Haynes, J.A. and Lewin, H.A. 1992. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet*, 23: 483-496.
- Vilaça, L.F.; Diniz, W.J.S.; Melo, T.F.; Paz, A.V.S.; Souza Júnior, C.G.; Lima, C.S. e Santoro, K.R. 2011. Otimização do método de amplificação em PCR para identificação de polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2. In: Congresso Internacional do Leite, 10., Congresso Internacional do Leite. Maceió. pp. 10: 1-3.
- Wu, X.X. et al. 2010. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. *J Biomed Sci Eng*, 3: 221-225.

