

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DO SISTEMA
IMUNE DE BÚFALO

Mariana Maciel Borges

Bióloga

2014

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DO SISTEMA
IMUNE DE BÚFALO**

Mariana Maciel Borges

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral

Coorientadora: Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza

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

2014

Borges, Mariana Maciel
B732c Caracterização molecular de genes do sistema imune de búfalo /
Mariana Maciel Borges. – – Jaboticabal, 2014
x, 65 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Maria Elisabete Jorge Amaral
Coorientadora: Nedenia Bonvino Stafuzza
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, Poliana
Fernanda Giachetto
Bibliografia

1. Biblioteca genômica. 2. *Bubalus bubalis*. 3. MHC. 4. Predição
gênica. 5. Pirosequenciamento. 6. Sequências repetitivas I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.293.2:636.082

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DO SISTEMA IMUNE DE BÚFALO

AUTORA: MARIANA MACIEL BORGES

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA ELISABETE JORGE AMARAL

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

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

Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Pós-Doutoranda / Departamento de Biologia / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto

Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. POLIANA FERNANDA GIACHETTO

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Campinas/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA MACIEL BORGES – nascida em 16 de março de 1988, na cidade de Araxá-MG, Brasil, filha de Valeria Maria Maciel Borges e Jadir Eustáquio Borges. Iniciou em fevereiro de 2007 o curso de Ciências Biológicas no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto/SP, onde em janeiro de 2010 obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas. Nos anos de 2011 e 2012 desenvolveu projeto para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas sob orientação da Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral e coorientação da Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza, como bolsista PIBIC/CNPq. O trabalho de conclusão de curso intitulado “Caracterização de clones de uma biblioteca BAC de búfalo quanto à presença de marcadores do Complexo Principal de Histocompatibilidade”, foi defendido em junho de 2012. Ingressou no Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP como aluna de mestrado e bolsista CAPES, em março de 2012. Desenvolveu seu projeto de mestrado, intitulado “Caracterização molecular de genes do sistema imune de búfalo”, também sob a orientação da Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral e a coorientação da Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho a toda minha FAMÍLIA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabete Amaral por ter confiado no meu trabalho e por ter me recebido de braços abertos no mundo da Biologia Molecular. Agradeço os ensinamentos compartilhados, os conselhos e os momentos de descontração que vivemos nestes três anos de convivência. Obrigada por ter me ajudado a crescer tanto pessoal quanto profissionalmente.

À minha coorientadora Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza por ter acreditado no meu potencial o que contribuiu para que eu iniciasse essa jornada. Agradeço a dedicação incondicional e o apoio para que eu pudesse trilhar meu caminho até aqui. Obrigada por estar sempre presente e por ter compartilhado ensinamentos que contribuíram para que minha formação fosse também um aprendizado de vida. Meu carinho e minha admiração.

A todos os professores que fizeram parte da minha vida escolar, desde a infância até a conclusão do meu mestrado. Obrigada pelo incentivo para seguir o longo caminho na busca pelo aprimoramento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que foi de grande importância para o desenvolvimento das atividades relacionadas ao meu mestrado.

À FAPESP pelo auxílio concedido a pesquisa (Processo: 2011/11889-3) possibilitando a realização dos experimentos relacionados ao meu projeto de pesquisa.

Aos professores Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque e Dr. Humberto Tonhati pelas contribuições prestadas enquanto membros da banca examinadora do projeto de mestrado.

Aos professores Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e Dr. Humberto Tonhati pelas valiosas sugestões prestadas no Exame de Qualificação.

À Dra. Poliana Fernanda Giachetto e à Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério por terem aceitado de prontidão o convite para participar da comissão examinadora da presente dissertação de mestrado. Agradeço as valiosas sugestões e/ou correções prestadas para a melhoria do meu trabalho. Agradeço o carinho e a atenção!

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação da FCAV-UNESP, em especial a Gabriela Morello, por não medirem esforços para resolver questões burocráticas mesmo à distância. Obrigada pela constante atenção.

Ao coordenador do Programa de Genética e Melhoramento Animal, Prof. Dr. Danisio Prado Munari pela prontidão e dedicação demonstradas.

Aos colegas Elaine Dias e Auro Silva pela irrestrita disponibilidade em ajudar nos momentos de dúvidas.

Aos meus colegas de laboratório Daniela Bizari, Mariana Victoretti e Lucas Olivatto, que me acompanharam durante esta jornada, compartilhando momentos de ciência e diversão. Um agradecimento especial a Bruna Naressi que esteve ao meu lado durante todos os momentos vividos no laboratório, me transmitindo ensinamentos de companheirismo e me acolhendo sempre que precisei.

A todos os amigos que fiz em São José do Rio Preto durante estes sete anos, agradeço pelo apoio e carinho. Em especial aos amigos Raduan Soleman e Tatiana Barreto por terem sido a minha família enquanto eu estava longe de casa.

Aos amigos que conheci em Jaboticabal durante as inúmeras idas, obrigada pela acolhida e pelo carinho. Em especial às amigas Emília Barreto e Tatiane Chud por terem me recebido de braços abertos e me auxiliado durante os dias que passei em Jaboticabal. Obrigada por tudo.

Ao Alexandre, meu companheiro e meu grande amigo, por estar sempre ao meu lado, caminhando comigo na busca dos meus sonhos.

A todos os membros das Famílias Maciel e Borges pelo apoio e pelo carinho mesmo com a distância. Agradeço a cada um de vocês.

Aos meus pais Valeria e Jadir pelo apoio incondicional, pelos incentivos e pela confiança depositada em mim! Obrigada por tudo que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui! Amo muito vocês!

As minhas irmãs Marina e Marília que apesar da distância estão sempre ao meu lado! Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

A minha avó Rosa pelos momentos de paz e pelas conversas sempre cheias de saudades.

A todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta para que eu desenvolvesse este trabalho com a certeza de que este é só o começo de uma longa caminhada.

Simplemente obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Seleção dos clones positivos para marcadores da classe IIb.....	13
3.2. Avaliação dos clones selecionados.....	19
3.3. Análise dos dados.....	22
3.3.1. Análise das sequências obtidas por pirosequenciamento..	22
3.3.2. Identificação de sequências conservadas entre boi e búfalo.....	23
3.3.3. Identificação de sequências repetitivas.....	24
3.3.4. Predição de genes.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Seleção dos clones positivos para marcadores da classe IIb.....	27
4.2. Avaliação dos clones selecionados.....	31
4.3. Análise dos dados.....	32
4.3.1. Análise das sequências obtidas por pirosequenciamento..	32
4.3.2. Identificação de sequências conservadas entre boi e búfalo.....	38
4.3.3. Predição de genes.....	42
4.3.4. Identificação de sequências repetitivas.....	50
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICE.....	64

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DO SISTEMA IMUNE DE BÚFALO

RESUMO – Em mamíferos, os genes relacionados à resposta imune do hospedeiro à patógenos encontram-se organizados na região genômica denominada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Os genes da região MHC também estão envolvidos na escolha do parceiro para acasalamento, na ocorrência de abortamentos espontâneos e na manutenção da gestação. A disponibilidade de uma biblioteca genômica construída com o genoma de búfalo torna possível a caracterização molecular dos genes dessa região. Tal caracterização permitirá o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência/suscetibilidade à doenças e na reprodução em búfalos, além de contribuir para a anotação desses genes no genoma bubalino. Visando determinar a estrutura molecular dos genes do sistema imune de búfalo, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e a caracterização de clones da biblioteca genômica de búfalo contendo marcadores da classe IIb. A seleção dos clones foi realizada por meio da tecnologia de PCR, segundo o sistema de organização tridimensional (*superpool*, *singlepool* e sistema linha/coluna) no qual os clones da biblioteca se encontram organizados. As reações de PCR foram realizadas utilizando 21 marcadores da classe IIb mapeados no cromossomo 2 de búfalo. Dentre os 33.792 clones avaliados, foram identificados três clones positivos para quatro marcadores da classe IIb, sendo eles: 11.05, 12.05, 13.00 e DMA. Após a seleção, os clones foram purificados e sequenciados via pirosequenciamento, onde apresentaram tamanho de inserto variando de 26 a 117 Kb. As sequências obtidas para cada um dos clones foram alinhadas com as duas versões de anotação do genoma bovino (UMD_3.1 e Btau_4.6.1), onde os alinhamentos mais significativos foram identificados com as sequências correspondentes do cromossomo BTA23. Os resultados obtidos mostraram que as sequências de ambos os clones apresentaram uma maior cobertura na versão UMD_3.1. Foram preditos quatro genes para a sequência de DNA do clone A/17, (H2B, DMB, DMA e BRD2) e um gene (VPS52) para a sequência do clone I/09. Em ambos os clones os genes preditos foram caracterizados quanto ao número e o tamanho de éxons e íntrons. Os resultados obtidos com a identificação de sequências repetitivas mostraram que 49,3% e 46,6% das sequências de DNA dos clones A/17 e I/09, respectivamente, estão representados por elementos transponíveis. Além disso, foram identificados pequenos RNAs nas sequências de DNA de ambos os clones, assim como repetições em “tandem” do tipo microssátelites.

Palavras-chave: Biblioteca genômica, *Bubalus bubalis*, MHC, predição gênica, pirosequenciamento, sequências repetitivas

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF IMMUNE SYSTEM GENES IN BUFFALO

ABSTRACT - In mammals, genes related to immune response to pathogens are organized in a genomic region named Major Histocompatibility Complex (MHC). MHC genes are also involved in mate-choice, occurrence of spontaneous abortions and maintenance of pregnancy. The existence of a genomic library, constructed with buffalo genome, allows the characterization of MHC genes, providing sources for understanding the mechanisms involved in resistance/susceptibility to diseases and in reproduction, contributing for annotation of these genes on buffalo genome. To determine the molecular structure of buffalo immune system genes, the present study aimed to identify and characterize clones containing class IIb markers from a buffalo genomic library. Selection of clones was performed by PCR technique, according to three-dimensional system (superpool, singlepool, row/column system) in which clones are arranged. To identify the clones were used 21 class IIb markers, previously mapped on buffalo chromosome 2. Among the 33.792 clones evaluated, three clones were identified for the MHC markers 11.05, 12.05, 13.00 and DMA. These clones were then purified and sequenced by pyrosequencing, presenting insert size ranging from 26 to 117 Kb. Each clone sequence were aligned with two bovine genome assemblies (UMD_3.1 and Btau_4.6.1), where the most significant alignments were identified with the corresponding sequences to BTA23. Sequences of both clones showed a greater coverage in UMD_3.1 assembly. Four genes were predicted for clone A/17 DNA sequence (H2B, DMB, DMA and BRD2), and one gene (VPS52) was predicted for clone I/09 sequence. Each gene had the number and size of exons and introns determined. The identification of repetitive sequences showed that 49,3% of clone A/17 sequence and 46,3% of clone I/09 sequence are represented by transposable elements. Furthermore, small RNA sequences were identified in both clones, also microsatellites tandem repeats.

Key-words: *Bubalus bubalis*, gene prediction, genomic library, MHC, pyrosequencing, repetitive sequences

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O rápido crescimento populacional, observado principalmente nos países emergentes, tem elevado a demanda por proteína de origem animal, impulsionando o desenvolvimento de estratégias que permitam o aumento da produção visando à redução dos custos e a melhoria da qualidade dos produtos.

Diante desse cenário, a bubalinocultura tem despertado o interesse dos produtores brasileiros devido à produção de leite e carne de alta qualidade (MIHAIU et al., 2010; RANJHAN, 2012). A carne de búfalo preenche as exigências do mercado consumidor que busca uma alimentação saudável e ao mesmo tempo saborosa, apresentando baixos índices de gordura e um alto valor proteico. Já o leite de búfala é mais concentrado que o leite bovino, com maior quantidade de matéria seca e elevados teores de gordura, proteínas e minerais, representando uma atividade promissora para os investidores no setor rural (FIGUEIREDO; LOURENÇO JÚNIOR; TORO, 2010). Além disso, o temperamento dócil apresentado por esses animais facilita seu manejo (BASTIANETTO, 2009).

O Brasil apresenta o rebanho bubalino mais expressivo localizado fora do continente asiático, compreendendo cerca de 1,278 milhão de animais (FAO, 2011). Dados da produção pecuária nacional do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) mostram um crescimento do rebanho bubalino de 7,8% no ano de 2011 em relação ao ano anterior, onde a região Sudeste é a principal produtora de leite, voltado principalmente para fabricação da *mozzarella* de búfala e as demais regiões recebem destaque pela produção de carne bubalina.

Dentre as estratégias utilizadas para o aumento da produção animal, tais como, adequação das práticas de manejo, controle nutricional, programa de controle leiteiro e avaliação genética, a melhoria da saúde animal mostra-se como parte fundamental no sucesso da produção, já que certos patógenos podem influenciar a qualidade da carne e do leite, gerando grandes perdas econômicas para o setor (THORNTON, 2010). Segundo a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006), a atividade pecuária encontra-se fundamentada em três principais pilares: saúde animal, alimentação adequada e melhoramento genético. Caso haja desequilíbrio entre estes fatores, o sistema de produção não

proporcionará o retorno econômico almejado pelo produtor. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009) considera que a saúde animal envolve questões relacionadas às enfermidades dos mesmos, à saúde pública e ao controle dos riscos em toda cadeia alimentar, garantindo não só a oferta de alimentos seguros, como também o bem estar do animal.

A ocorrência de doenças infecciosas afeta a produtividade elevando os gastos com medicamentos e colocando o fornecimento de alimentos em risco, o que resulta em implicações comerciais negativas (THOMPSON et al., 2002). Além disso, cada animal doente representa prejuízo econômico devido à queda na produtividade, colocando em risco a saúde dos demais animais por meio de contaminação no rebanho (AGUIAR, 2007).

Animais doentes têm crescimento mais lento quando comparados aos sadios devido às alterações nos níveis hormonais, ao efeito direto das citocinas pró-inflamatórias sobre os tecidos metabólicos e à redução no consumo de alimentos (JOHNSON, 1997). Além disso, alterações no perfil endócrino causadas pela ativação imunológica levam à redução da produção de leite em vacas em lactação (RAJALA-SCHULTZ et al., 1999). Segundo Waldron et al. (2006) a produção de leite em vacas com mastite pode sofrer queda de até 70%. As lesões inflamatórias do epitélio mamário, observadas durante a doença, não são os únicos fatores responsáveis pela redução na produção de leite. A diminuição do desempenho de lactação é mediada por diversos fatores patofisiológicos, podendo ser causada, por exemplo, pelo escape de componentes do úbere para a circulação (SHUSTER et al., 1991).

A utilização de medicamentos mostra-se eficiente no combate e prevenção de doenças infecciosas em animais de produção. Contudo, à medida que os consumidores têm se tornado mais preocupados com a retenção de resíduos químicos nos produtos e com a aquisição de resistência dos patógenos aos fármacos, métodos alternativos têm sido utilizados para controle de doenças na pecuária. Fatores como manejo adequado, controle da qualidade da dieta e administração de vacinas aliada ao cuidado veterinário, podem tornar a resposta imune mais eficiente (FRISCH, 1981). Entretanto, uma porção considerável da capacidade de resposta dos animais aos patógenos é herdada geneticamente. De

acordo com banco de dados OMIA (*Online Mendelian Inheritance in Animals* - <http://omia.angis.org.au/>), existem 446 doenças/traços hereditários em bovinos, dos quais 92 já possuem seus mecanismos de mutação conhecidos e 162 representam potenciais modelos para estudos de doenças em humanos. Dessa forma, o controle da sanidade animal por meio de estudos genéticos permite a compreensão das variáveis envolvidas na resistência e suscetibilidade à doenças, o que contribui não só para a melhoria do manejo dos animais, mas fornece uma visão detalhada dos mecanismos responsáveis por tais variáveis (YANG et al., 2012). Além disso, o desenvolvimento de estratégias que permitam tanto a determinação das características relacionadas à saúde animal quanto à predição das mesmas, possibilita que a avaliação da resistência/suscetibilidade a determinadas doenças seja feita sem a realização de um teste de exposição do animal a um patógeno.

Apesar da reconhecida rusticidade dos bubalinos frente às condições ambientais adversas para a criação de bovinos, os búfalos são suscetíveis à grande parte das doenças infecciosas que acometem os bovinos. Dessa maneira, o conhecimento das diferenças entre as duas espécies no que diz respeito à suscetibilidade, epidemiologia, desenvolvimento da resposta imune, manifestações clínicas, especificidade dos testes de diagnóstico e tratamento de doenças como brucelose, mastite, febre aftosa, dentre outras, mostra-se de extrema importância para o desenvolvimento de um manejo sanitário específico para bubalinos (LEITE; BASTIANETTO, 2009).

Para que a resposta imune seja eficiente, o organismo precisa discriminar os antígenos próprios (do inglês “self”), daqueles não próprios (do inglês “non-self”), antes mesmo de ativar os mecanismos responsáveis pela eliminação do patógeno. Dentre os genes responsáveis pelo reconhecimento imunológico destacam-se aqueles localizados na região genômica conhecida como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês “Major Histocompatibility Complex”).

Os genes do MHC foram descobertos a partir de estudos sobre transplantes de tecidos em linhagens de camundongos e coelhos, realizados por Little e Tyzzer em 1916 (apud PENN et al., 2002). Nesses experimentos os pesquisadores observaram que transplantes realizados entre determinadas linhagens poderiam resultar em rejeição. Em 1927, Bover descobriu que os transplantes não eram

rejeitados se o doador e o receptor fossem gêmeos idênticos, indicando que a compatibilidade entre ambos poderia ser geneticamente controlada (apud PENN et al., 2002). A partir dessas observações surgiu o termo histocompatibilidade, que significa compatibilidade entre tecidos.

Além de estarem relacionados à compatibilidade de tecidos em transplantes, os genes do MHC em mamíferos também estão envolvidos nas respostas imune inata e adaptativa, na resistência e suscetibilidade à doenças infecciosas, na escolha do parceiro para acasalamento, na ocorrência de abortamentos espontâneos e no sucesso reprodutivo, o que faz com que esses genes sejam alvos de intensos estudos (PENN, 2002). Outras características da região MHC, como a alta densidade gênica, o elevado número de polimorfismos e a presença de variações estruturais, como as sequências de DNA denominadas CNVs (do inglês “Copy Number Variation”) (HOU et al., 2011), também contribuem para o interesse da comunidade científica nos estudos relacionados à essa região do genoma.

A seleção dirigida por patógeno e a seleção sexual têm sido consideradas as principais forças de manutenção do elevado grau de polimorfismo dos genes da região MHC (PENN; POTTS, 1999; HEDRICK, 2002). A maioria dos estudos relacionados à escolha do parceiro para o acasalamento, realizados principalmente com roedores, mostra uma preferência por parceiros que possuem genes do MHC relativamente diferentes, indicando uma associação negativa em relação a esse complexo gênico. A seleção de parceiros com diferente MHC aumenta a heterozigosidade desses genes na prole, elevando assim a resistência dos animais à patógenos. Outro aspecto seria a diminuição na ocorrência de endogamia, reduzindo assim o risco da prole ser homozigota para alelos recessivos deletérios (APANIUS et al., 1997; PENN; POTTS, 1999; PENN, 2002).

As moléculas do MHC estão presentes nos líquidos corporais como saliva, suor, urina e plasma. Segundo alguns estudos, o odor corporal pode ser influenciado por peptídeos que são transferidos por tais moléculas (WOBST et al., 1998). Contudo, trabalhos realizados com ratos têm mostrado que peptídeos ligantes de MHC não voláteis podem mediar respostas neurais nos órgãos olfatórios (SPEHR et al., 2006) e vomeronasal (LEINDERS-ZUFALL et al., 2004). O órgão vomeronasal dos mamíferos é essencial para o reconhecimento social, uma vez que seus

neurônios sensoriais detectam feromônios e outros sinais químicos que carregam informações sobre gênero, sexo, status social e hierarquia de dominância (LEINDERS-ZUFALL et al., 2004). Quando um complexo peptídeo-MHC é liberado no espaço extracelular e aparece na urina ou em outras secreções corporais, qualquer informação contida nesse complexo químico se torna uma propriedade do indivíduo, podendo ser utilizada na comunicação interindividual (BOEHM; BLEUL; SCHORPP, 2003). Outro trabalho sugere que as moléculas do MHC se ligam a componentes voláteis específicos e os carregam para as glândulas apócrinas, localizadas na região das axilas e das mamas. Segundo Rennie et al. (1990, 1991) as moléculas do MHC podem influenciar o espectro de microrganismos que vivem na superfície da pele, determinando assim o odor corporal do indivíduo.

Estudos mostraram que os genes do MHC também estão relacionados à gestação, uma vez que o sistema imune materno sofre alterações para adaptar-se a presença do feto. Em 1953, Peter Medawar foi o primeiro pesquisador a formular o conceito de que o embrião representa um corpo estranho ao sistema imune materno, já que possui 50% do material genético de origem paterna e expressa antígenos novos ao sistema imune da mãe (apud PENN et al. 2002). Dentre as estratégias utilizadas pelo feto para impedir um ataque imunológico, a diminuição na expressão de moléculas do MHC pelas células do trofoblasto tem recebido grande destaque (BAINBRIDGE et al., 2000). O trofoblasto é formado por um conjunto de células externas à blástula, as quais originam uma porção da placenta. Como a expressão das moléculas do MHC pode levar à rejeição do feto, existem alguns trabalhos na literatura demonstrando a diminuição da expressão desses genes em humanos (REDMAN et al., 1984), cavalos (DONALDSON et al., 1990), porcos (RAMSOONDAR et al., 1999), ovelhas (GOGOLIN-EWENS et al., 1989) e ratos (KANBOUR et al., 1987). O entendimento dos mecanismos de atuação das proteínas do sistema imune na gestação poderá reduzir a ocorrência de abortamentos de repetição, além de auxiliar a determinação da causa de esterilidade em animais de interesse econômico.

Os genes do MHC encontram-se organizados no genoma de acordo com a função que desempenham e estão divididos em três classes, denominadas classes I, II e III. Os genes da classe I codificam proteínas que apresentam peptídeos

próprios (“self”) aos linfócitos. Contudo, se uma célula for infectada por um vírus ou por algum parasito intracelular, as moléculas da classe I apresentarão os antígenos do patógeno aos linfócitos CD8⁺ que, por sua vez, destruirão as células infectadas (BEHL et al., 2012).

Os genes pertencentes à classe III codificam um diverso grupo de proteínas com funções variadas, destacando-se as interações com as células NK (do inglês “Natural Killer Cell”), além de codificar os chamados fatores de necrose tumoral (do inglês “Tumour Necrosis Factor”, TNF) os quais também estão associados à resposta imune, uma vez que causam a morte de células infectadas por apoptose (BEHL et al., 2012).

As proteínas codificadas pelos genes da classe II são expressas nas chamadas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, e têm como função apresentar antígenos extracelulares aos linfócitos CD4⁺. Os genes da classe II são altamente polimórficos, apresentando alto índice de polimorfismos no éxon 2, o qual codifica os sítios apresentadores de antígenos. A existência de uma grande variabilidade nesses genes aumenta o repertório de epítomos que o sistema imune de um indivíduo pode reconhecer, ampliando assim a resposta imune contra diversos tipos de patógenos.

Na maioria das espécies de mamíferos, os genes da classe II estão organizados em um único agrupamento, como por exemplo, em humano no cromossomo 6 (MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999), em cachorro no cromossomo 12 (WAGNER, 2003), em porco no cromossomo 7 (LUNNEY et al., 2009) e em cavalo no cromossomo 20 (GUSTAFSON et al., 2003). Uma notável diferença entre a região MHC dos bovídeos com relação aos demais mamíferos é a divisão dos genes da classe II em dois agrupamentos separados, denominados de classes IIa e IIb, os quais encontram-se distantes cerca de 20 cM (centiMorgans) em bovinos. Os genes da classe IIa encontram-se ligados aos genes da classe I e da classe III. Já os genes da classe IIb, encontram-se isolados das demais classes, posicionados mais próximos ao centrômero. A Figura 1 apresenta um esquema ilustrando a diferença na organização do MHC em humano (cromossomo 6 - HLA6) e em bovino (cromossomo 23 - BTA23).

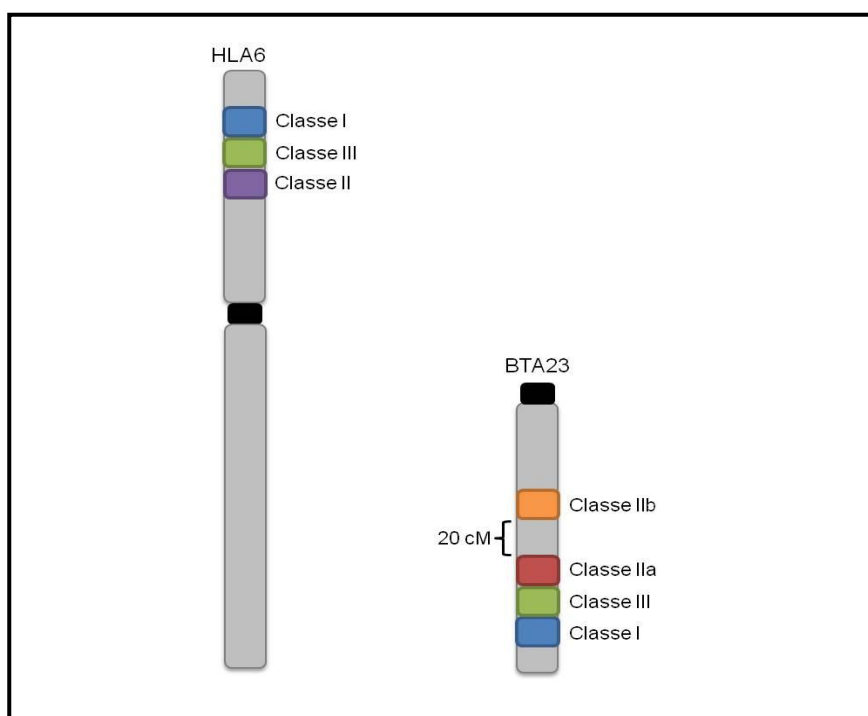


Figura 1. Esquema ilustrando a organização do MHC no cromossomo 6 de humano (HLA6) e no cromossomo 23 de bovino (BTA23) nas classes I (azul), III (verde), IIa (vermelho), IIb (laranja) em bovino e da classe II em humano (roxo). Nos bovídeos, as classes IIa e IIb encontram-se distantes cerca de 20 cM. O bloco em preto representa o centrômero.

Essa característica particular dos genes da classe II de bovídeos torna importante o estudo da região MHC nesses animais, permitindo a compreensão dos processos envolvidos na regulação gênica, na estrutura e na evolução deste agrupamento gênico.

Em búfalo (*Bubalus bubalis*) os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade recebem a denominação de BuLA (KLEIN et al., 1990) e estão localizados no braço curto do cromossomo 2 (BBU2p), o qual é homólogo ao cromossomo 23 bovino (BTA23) (IANNUZZI et al., 1993).

Quando comparada com outras espécies de interesse econômico, a região MHC de búfalo ainda é pouco estudada, apresentando um pequeno número de trabalhos disponíveis na literatura, onde a maioria está relacionada com polimorfismos de genes específicos (ARAVINDAKSHAN; NAINAR; SIVASELVAM, 2000; DE; SINGH; BUTCHAI AH, 2002; SENA et al., 2003; KUMAR; SANGWAN; RUPENDER, 2008; NIRANJAN et al., 2010; SHEIKHMOHAMMADI; HASHEMI; MARDANI, 2010; SUMATHI et al., 2010; DE; SINGH; BRAHMA, 2011; KUMAR et al., 2011; SENA et al., 2011). Nos trabalhos de Kumar et al. (2008, 2011), por

exemplo, a existência de polimorfismos no gene DRB3 de búfalo, o qual pertence à classe IIa, foi associada com a ocorrência de mastite em animais de diferentes raças. No caso dos búfalos da raça Murrah, os pesquisadores identificaram que animais sadios possuíam um número maior de polimorfismos nesse gene em relação aos animais que continham a doença (KUMAR et al., 2011).

Em outras espécies de ruminantes a ocorrência de polimorfismos nos genes da classe II também tem sido associada com a resistência/suscetibilidade à algumas doenças. Larruskain et al. (2010) relataram uma associação entre alelos do gene DRB1 com a suscetibilidade à doenças respiratórias crônicas causadas por retrovírus e que acometem ovinos em todo o mundo. Já no trabalho desenvolvido por Maillard et al. (2003) foi observada uma alta correlação entre a variação alélica encontrada no gene DQB em bovinos da raça Brahman e a suscetibilidade à dermatofilose. Tal doença é uma infecção severa da pele causada pela bactéria *Dermatophilus congolensis* e que ocorre em ruminantes dos trópicos, gerando perdas na produção e uma taxa de mortalidade de até 15% (MAILLARD et al., 2003).

Os estudos relacionados ao MHC bubalino avançaram em 2008 com a publicação do mapa genômico preliminar do MHC de búfalo, contendo 10 genes da classe II (RODRIGUES-FILHO et al., 2008). Esse mapa corroborou dados citogenéticos anteriores que mostravam a divisão dos genes da classe II em dois agrupamentos (IANNUZZI et al., 1993). Em 2013, a organização geral da região MHC de búfalo foi estabelecida por meio da construção de um mapa de alta resolução, onde 53 marcadores moleculares foram mapeados, incluindo aqueles das classes I, IIa, IIb e III (STAFUZZA et al., 2013). O mapa de alta resolução do MHC bubalino foi comparado ao mapa correspondente em bovino (BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009) evidenciando diferenças na ordenação dos genes entre as duas espécies.

Além do mapa de alta resolução, outra ferramenta genômica disponível a qual contribuirá para os avanços dos estudos da região MHC de búfalo, é a biblioteca genômica do tipo BAC. A biblioteca BAC (do inglês “Bacterial Artificial Chromosome”) recebe esta denominação devido ao vetor de clonagem utilizado (SHIZUYA et al., 1992). Em 2012, o grupo de pesquisa “Genômica de Búfalos”,

cadastrado junto ao CNPq, construiu a única biblioteca BAC de búfalo descrita na literatura até o momento (STAFUZZA et al., 2012).

A Figura 2 mostra um esquema representativo do vetor de clonagem pBeloBAC11, o qual foi utilizado na construção dessa biblioteca. No esquema encontram-se ilustrados os genes, representados em vermelho e as principais sequências reguladoras representadas em azul.

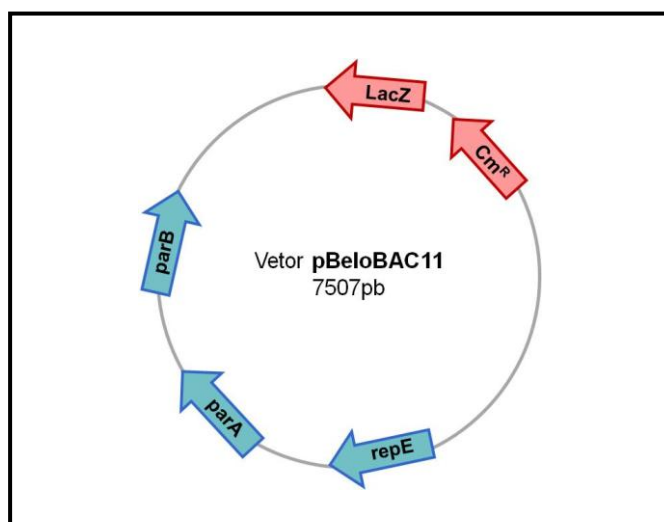


Figura 2. Esquema representativo do vetor de clonagem pBeloBAC11, ilustrando seus principais genes (vermelho) e suas principais regiões reguladoras (azul). **Cm^R**: gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; **LacZ**: gene que permite a identificação dos clones por meio do fenótipo das colônias; **repE**, **parA** e **parB**: genes regulatórios. Adaptado de KIM et al., 1996.

As etapas envolvidas na construção de uma biblioteca do tipo BAC estão esquematizadas de forma simplificada na Figura 3. O vetor de clonagem e o genoma de interesse são clivados com a mesma enzima de restrição, permitindo que os mesmos sejam ligados para formação das chamadas moléculas de DNA recombinante. A molécula resultante é então introduzida em linhagens específicas da bactéria *Escherichia coli*, formando o clone.

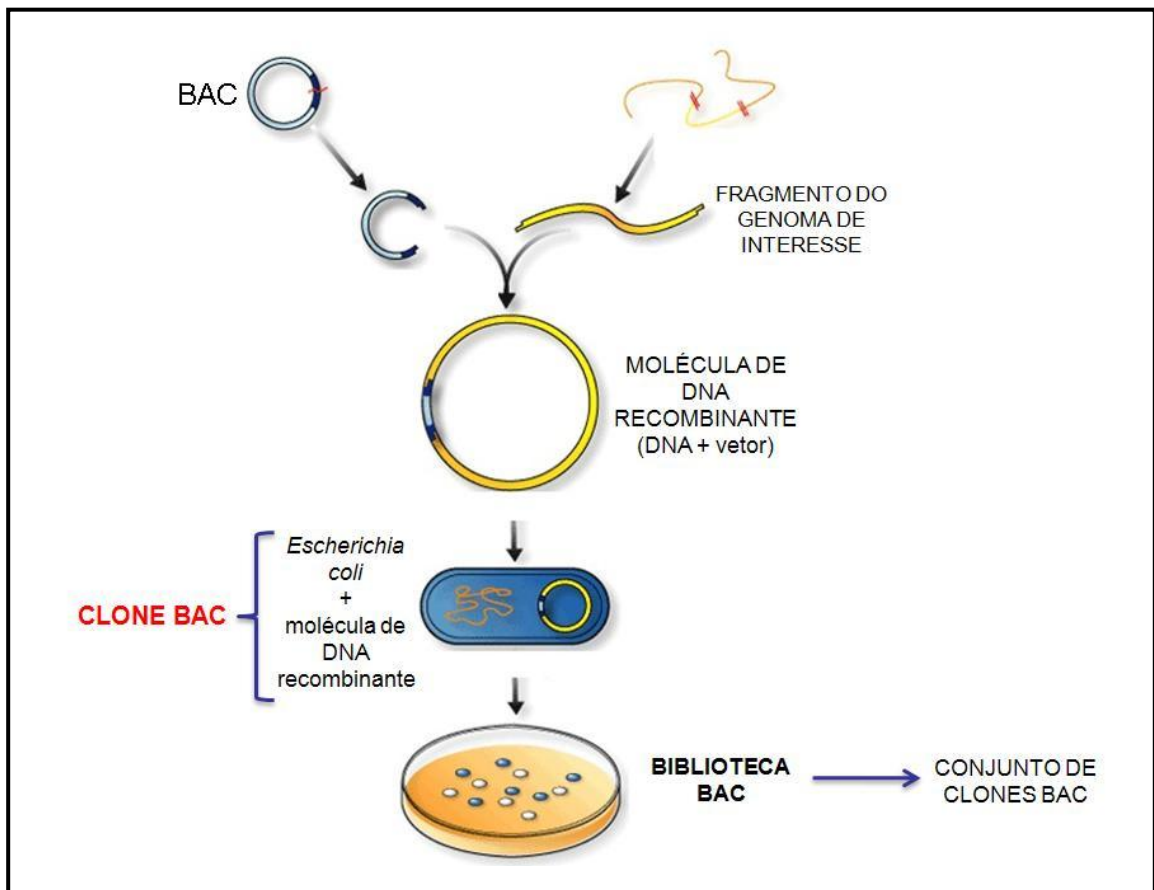


Figura 3. Esquema simplificado mostrando os passos realizados para construção de uma biblioteca BAC. Modificado de <http://www.scq.ubc.ca/the-big-bad-bac-bacterial-artificial-chromosomes/>.

Diferentes bibliotecas do tipo BAC foram construídas com o genoma dos principais mamíferos de interesse econômico, incluindo bovinos (CAI et al., 1995; ZHU et al., 1999; BUITKAMP et al., 2000; WARREN et al., 2000; EGGEN et al., 2001; FUJISAKI et al., 2002), caprinos (SCHIBLER et al., 1998), equinos (GODARD et al., 1998), suínos (ROGEL-GAILLARD et al., 1999; ANDERSON et al., 2000; SUZUKI et al., 2000; FAHRENKRUG et al., 2001; JEON et al., 2003; LIU et al., 2010) e ovinos (GILL et al., 1999; VAIMAN et al., 1999).

Bibliotecas desse tipo são consideradas uma ferramenta genômica indispensável para estudos de isolamento de genes específicos (LIU et al., 2010), mapeamento físico de regiões do genoma, de cromossomos únicos ou de genomas inteiros (CHEN et al., 2004), sequenciamento de genomas (KRZYSWINSKI et al., 2004) e identificação de elementos reguladores intra e inter-gênicos (SUMIYAMA; RUDLLE, 2003).

No caso dos búfalos, a seleção específica de clones contendo marcadores da classe IIb da região MHC, permite a realização de estudos relacionados à estrutura molecular dos genes dessa região. O sequenciamento e caracterização molecular da sequência de DNA contida nos clones, possibilita a elucidação da organização gênica, além da identificação de elementos regulatórios, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade à doenças e para a anotação desses genes no genoma bubalino.

A caracterização de genes do sistema imune de búfalo permitirá o entendimento da relação entre tais genes e os mecanismos de atuação das proteínas do MHC na escolha do parceiro para o acasalamento e na manutenção da gestação, tornando-se uma ferramenta que poderá ser utilizada na seleção de indivíduos para cruzamentos direcionados, permitindo um melhor controle sobre os níveis de endogamia, ampliando a resposta imune dos animais selecionados e auxiliando na determinação da causa de esterilidade em animais de interesse econômico.

2. OBJETIVOS

Visando realizar a caracterização molecular de genes da classe IIb do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de búfalo, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- ✓ Selecionar clones da biblioteca genômica de búfalo positivos para marcadores da classe IIb;
- ✓ Realizar a comparação *in silico* das sequências de DNA obtidas no pirosequenciamento com aquelas correspondentes em bovino, visando identificar possíveis regiões conservadas entre essas espécies;
- ✓ Caracterizar as sequências de DNA dos clones selecionados quanto à predição de genes e sua estrutura (número e tamanho de éxons e íntrons);
- ✓ Identificar possíveis sequências repetitivas do tipo elementos transponíveis, pequenos RNAs e repetições em “tandem” na sequência de DNA dos clones.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As soluções citadas no item Material e Métodos estão descritas em detalhe no Apêndice 1, em ordem alfabética.

3.1. Seleção dos clones positivos para marcadores da classe IIb

A seleção dos clones contendo marcadores da classe IIb foi realizada a partir da biblioteca genômica de búfalo, a qual encontra-se armazenada no Laboratório de Genômica Comparativa - IBILCE/UNESP, câmpus de São José do Rio Preto/SP, cuja construção dessa ferramenta está descrita em detalhes no trabalho realizado por Stafuzza et al. (2012).

A biblioteca genômica de búfalo contém um total de 52.224 clones, os quais se encontram organizados em 136 placas de 384 poços, armazenadas em freezer -80°C. A Figura 4 ilustra o esquema de uma placa de 384 poços e sua divisão em linhas e colunas.

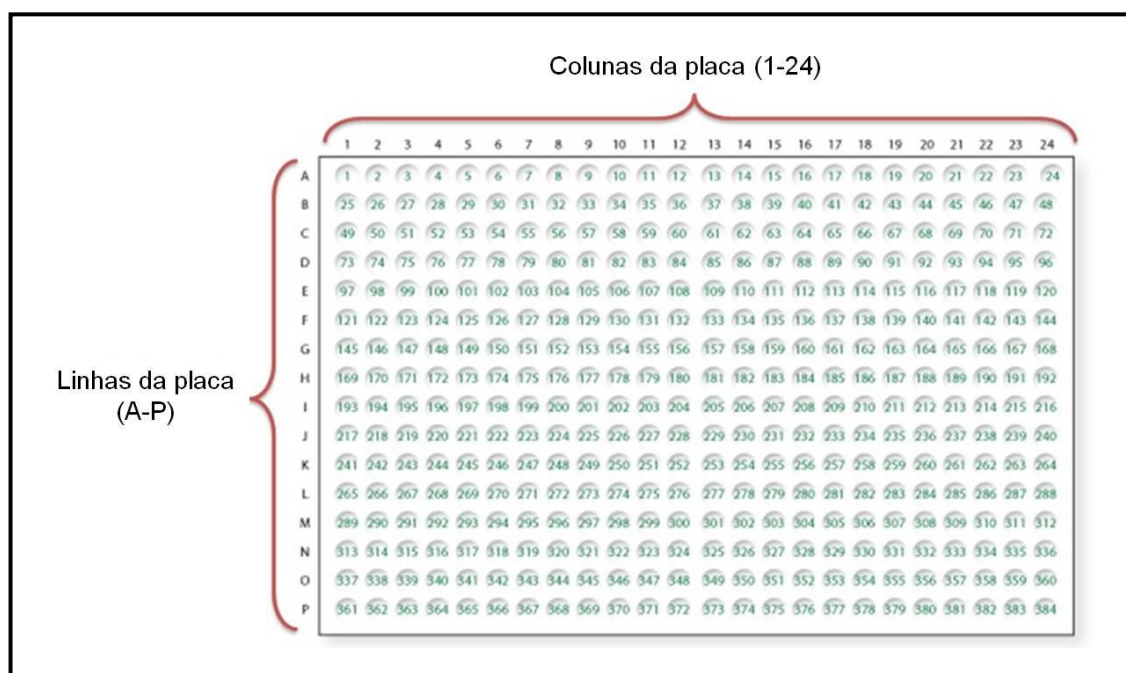


Figura 4. Esquema ilustrando uma placa de 384 poços nas quais os clones da biblioteca genômica de búfalo encontram-se organizados, e sua divisão em 16 linhas (A-P) e 24 colunas (1-24).

Os clones da biblioteca genômica de búfalo estão armazenados segundo o sistema de organização tridimensional utilizado por Stafuzza et al. (2012). Tal sistema, organizado em três partes (*singlepool*, *superpool* e linha/coluna), visa facilitar a identificação de clones específicos da biblioteca por meio de Reações em Cadeia de Polimerase (PCR).

O *singlepool* inclui todos os clones de uma única placa (384 clones), enquanto o *superpool* representa o conjunto de clones de oito placas (3.072 clones). Os clones referentes a cada *singlepool* e a cada *superpool* foram armazenados em microtubos de 2 mL.

O sistema linha/coluna de cada uma das placas de 384 poços consistiu em armazenar todos os clones de uma determinada linha em um único microtubo de 1,5 mL (16 linhas: A→P), assim como todos os clones presentes em uma determinada coluna em outro microtubo de 1,5mL (24 colunas: 1→24). Dessa maneira, o sistema de organização linha/coluna de cada placa foi organizado em 40 microtubos, onde um único clone se encontra representado duas vezes (uma vez na linha e outra na coluna).

Foram avaliados 33.792 clones da biblioteca genômica de búfalo, os quais se encontram armazenados em 88 placas (1–88) previamente organizadas em 11 *superpools* (S₁-S₁₁).

A seleção dos clones foi realizada por meio de reações PCR. Para otimizar a busca pelos clones, as reações de PCR foram realizadas de acordo com os seguintes passos:

- **1º passo:** reação de PCR com DNA do conjunto de clones que compõem os *superpools* (oito placas), visando identificar qual conjunto de oito placas mostrava-se positivo para o marcador específico;

- **2º passo:** reação de PCR com DNA dos clones de cada uma das oito placas (*singlepools*) visando identificar qual placa continha o clone com o marcador específico;

- **3º passo:** reação de PCR com DNA dos clones das linhas e colunas da placa de 384 poços positiva para o marcador específico, visando identificar a localização do clone (sistema linha/coluna).

A Figura 5 apresenta como exemplo, um esquema da sequência de experimentos de PCR realizados na avaliação de três *superpools*.

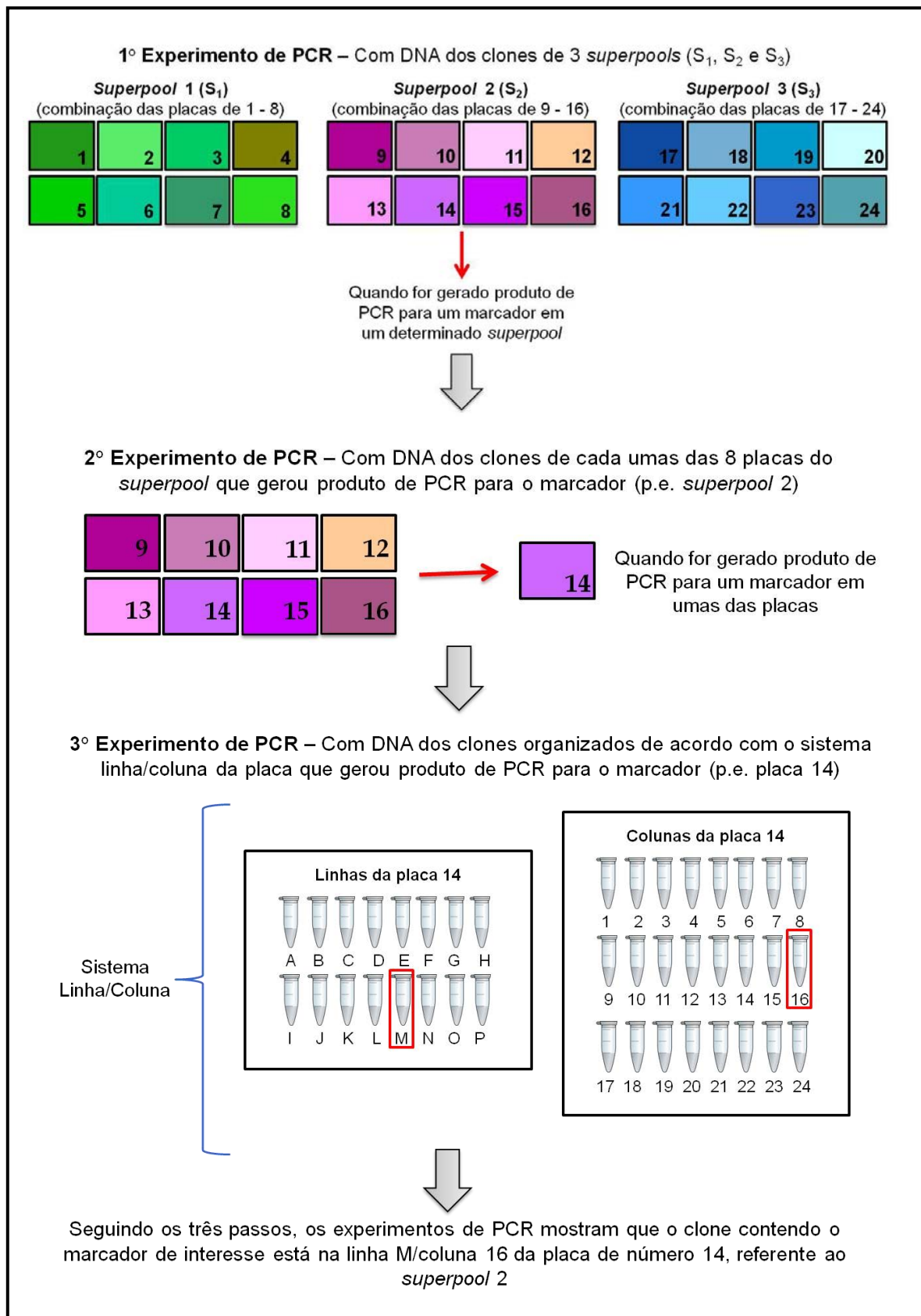


Figura 5. Sequência dos experimentos de PCR realizados na busca por clones contendo um marcador de interesse em três *superpools*.

Para seleção dos clones positivos para os marcadores da classe IIb foram utilizados 21 marcadores previamente mapeados no braço curto do cromossomo 2 de búfalo (BBU2p) (STAFUZZA et al., 2013). A Tabela 1 apresenta a relação dos iniciadores para PCR utilizados, assim como suas respectivas sequências (senso e anti-senso), temperatura de anelamento (°C) e referência bibliográfica.

Tabela 1. Informações sobre os marcadores utilizados, incluindo símbolo do marcador, as sequências senso (F) e anti-senso (R) dos iniciadores para PCR, temperatura de anelamento e referência bibliográfica.

Símbolo do marcador	Sequência senso (F) e anti-senso (R) dos iniciadores para PCR (5'→3')	Temperatura de anelamento	Referência Bibliográfica
10.00	F: TGTCTATCCTGTCCCAGAGCTA R: CGATTTCTCTCATGCTTACCTG	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.05	F: GTGCCTACGTTACAGCTCATTG R: CTCTCTTTTCTTGTCCCAGGT	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.20	F: CTGTAACATATCGCCATCAGGAG R: CTCAAGTAAGCTGCATCCATTG	56°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.25	F: ACAGCATGTGGGATGTTAGTTC R: GCCTTCACACTTAGAGCAACAC	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.30	F: CAGAAAGGAAAGCTGTTGACAC R: CAGTTTGAAGCCCATTACTCAG	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.40	F: TCAAGCTCTACCTGTCCAAGAA R: CATCTTCACTGTTGCTTTCCTC	58°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.45	F: AGTTTTCCAGGCTTCTTACAGG R: GTACACTCACCCACGATGTCTT	56°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.50	F: AAGTTGAAGACCACGACTCAGA R: CTGTGAGGTCAATGTTGAGGAT	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.55	F: ATGAGTTAGGGAAGAAGGGTCA R: TCACCGTCTATATCAAGCATCC	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
10.60	F: TCCCTACCTCACCAGATAGTT R: ACCCACTAGGAAGAAGGTTTCA	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
11.00	F: TAACCGCAGCAACTAGAGAGAG R: GAATAGGCAGGTGGGAGAATAC	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
11.05	F: GTTTCACCTCGGATGGAGATACA R: AGGCAGGATGTAGAGACACTGA	56°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
11.10	F: GGACAATATCATCAGTGGGCTA R: CAGGAGACTTGCGTAGAAGAGA	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
12.05	F: CTAAGGTGACAGATGTGGGTGT R: AAAGCGAAGTAGGGTAGTGAGG	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
13.00	F: CTCACCGTTTTAAGAGCTTCCT R: CTTTCCCATTAACTGTTCTC	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
13.05	F: CAAGCTCCACCACAGAACTAAC R: ATCAGCTATCCCAGAGGAAGAG	65°C	BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009
DNA	F: ACACAGCTGACCACATGGGC R: CCGTACCGTTGGGGGCTCTG	58°C	GenBank (UniSTS:519084)*
DYA	F: TCGAATTCGGCACTTACGGCACAAATG R: CAGGGCGCTCTGAACCTCAAG	65°C	VAN DER POEL et al., 1990
DYB	F: CACGGGCTCTCCGCGAGAGAATT R: CCACAAGGCTCTGTGTGAAGGCAT	65°C	GenBank (UniSTS:254144)*
DMA	F: TTTGTCTCCGCGTTGATGG R: CCAAGCCAACAATGATGCCC	65°C	HESS et al., 1999
PSMB9	F: TGCTGCCAACGTGGTGAG R: GCTGCATCCACGTAACCA	65°C	HESS et al., 1999

*UniSTS refere-se ao número de identificação da respectiva sequência de iniciadores para PCR depositada no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando 2 µL do material biológico dos clones, os quais foram previamente submetidos à 98°C por 15 minutos para a lise da parede celular. Em seguida, foram adicionados 0,2 mM de cada iniciador para PCR (senso e anti-senso); 100 mM de dNTPs; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂ e 0,05U/µL da DNA polimerase *AmpliTaqGoldTM* (*Life Technologies*). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C-65°C por 30 segundos (dependendo dos iniciadores para PCR) e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e submetidos à eletroforese horizontal a 120 V por 30 minutos, em tampão TBE 0,5X. Os resultados foram fotodocumentados com câmera digital (*DC290 KodakTM*) em luz ultravioleta.

Após a identificação dos clones positivos para os marcadores da classe IIb do MHC de búfalo, foram realizadas as etapas de multiplicação dos clones e purificação dos insertos de DNA dos mesmos.

Com o auxílio de um palito de dente, uma porção da solução contendo os clones selecionados foi transferida e espalhada em placas com meio LB-ágar acrescido de cloranfenicol (12,5 mg/mL - *SERVA*), 20 µL de IPTG a 20% (Isopropil-β-D-tiogalactosídeo - *Eppendorf*) e 100 µL de XGal a 2% (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside - *Life Technologies*), a qual foi mantida em estufa a 37°C por 12 horas para a multiplicação dos clones. Cada clone foi colocado em um Erlenmeyer contendo 80 mL de meio LB (*Luria-Broth* - *Sigma Aldrich*) acrescido de cloranfenicol (12,5 mg/mL), sendo mantido a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 21 horas para multiplicação celular. Após esse período, 75 mL da cultura foram transferidos para 10 tubos com fundo cônico de 15 mL (7,5 mL de cultura/tubo) para a realização da extração do DNA.

A extração de DNA dos clones foi realizada com o kit *PhasePrepTMBAC DNA* (*Sigma-Aldrich*), seguindo as indicações do fabricante, as quais estão descritas brevemente a seguir. Após a multiplicação dos clones, os mesmos foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 5.000 x g, onde o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 250 µL de Solução de Ressuspensão.

Posteriormente, os clones ressuspensos foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL, onde foi realizada a lise celular por meio da adição de 250 µL de Solução de Lise, seguida de incubação à temperatura ambiente por cinco minutos.

A neutralização da solução foi realizada pela adição de 250 µL de Solução de Neutralização, seguida de incubação em gelo por cinco minutos. O volume obtido foi submetido à centrifugação durante cinco minutos a 16.000 x g, a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL.

A etapa de precipitação do DNA foi realizada pela adição de 450 µL de isopropanol, seguida de centrifugação por 20 minutos a 16.000 x g e a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 100 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, seguido de centrifugação por cinco minutos com as mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi mantido à temperatura ambiente por cinco minutos para a secagem. Em seguida, o RNA residual foi removido pela adição de 500 µL de Solução de Eluição e 1 µL de Coquetel RNase ao precipitado, o qual foi mantido em banho-maria à 60°C por cinco minutos.

Para ajuste da concentração de sais, foram adicionados 40 µL de acetato de sódio (3M e pH 7.0). As endotoxinas e outras impurezas foram retiradas por meio de uma remoção mediada por temperatura. Para isso, foram adicionados 100 µL de Solução de Remoção de Endotoxinas e a solução obtida foi aquecida em banho-maria à 37°C por cinco minutos, sendo posteriormente centrifugada por três minutos à 16.000 x g em temperatura ambiente, para que ocorresse a separação em duas fases. A fase superior continha o DNA do clone e a fase inferior, as endotoxinas e impurezas. Dessa maneira, a fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e a fase inferior foi descartada.

A precipitação do DNA foi realizada pela adição de 540 µL de Solução de Precipitação, seguida de centrifugação por 20 minutos a 16.000 x g e a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 150 µL de etanol 70% em temperatura ambiente. A etapa de centrifugação foi repetida por mais cinco minutos e o sobrenadante obtido foi descartado. Foi realizada uma nova lavagem com 50 µL de etanol 70% em temperatura ambiente e mais uma etapa de centrifugação por 10

minutos. Ao final dessas etapas todo o sobrenadante foi removido, e o precipitado mantido em temperatura ambiente para a secagem.

Após a secagem, o DNA extraído foi eluído em tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) e sua concentração foi medida em espectrofotômetro (*Nanodrop ND1000TM* - *Thermo Scientific*) e ajustada para 100 ng/μL. Para verificar a integridade do DNA extraído, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, contendo 100 ng de cada amostra de DNA. A eletroforese horizontal foi realizada a 120V por 50 minutos, em tampão TBE 0,5X. Os géis foram fotodocumentados com câmera digital (*DC290 KodakTM*) em luz ultravioleta.

3.2. Avaliação dos clones selecionados

Para verificar se os clones identificados não eram falsos positivos, foram realizadas reações de PCR com o DNA extraído dos mesmos. As reações foram realizadas em um volume total de 25 μL utilizando 1 μL de DNA extraído do clone, 0,2 mM de cada iniciador para PCR (senso e anti-senso); 100 mM de dNTPs; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂ e 0,05U/μL da DNA polimerase *AmpliTaqGoldTM* (*Life Technologies*). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial à 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C-65°C por 30 segundos (dependendo dos iniciadores para PCR) e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e submetidos à eletroforese horizontal a 120 V por 30 minutos, em tampão TBE 0,5X. Os resultados foram fotodocumentados com câmera digital (*DC290 KodakTM*) em luz ultravioleta.

Após a verificação de que o DNA extraído de cada clone continha o inserto almejado, as amostras de DNA foram então enviadas para o sequenciamento, o qual foi realizado por meio da plataforma de pirosequenciamento *GS FLX Titanium* (*Roche 454*) via serviço de terceiros no *454 Sequencing Center*, em Connecticut (EUA).

A plataforma 454 realiza o sequenciamento baseado em síntese, chamado de pirosequenciamento, no qual a leitura das sequências é feita a partir da combinação de reações enzimáticas que se iniciam com a incorporação de um nucleotídeo à cadeia de um desoxinucleotídeo, seguida da liberação de um pirofosfato. Em seguida, o pirofosfato é convertido em ATP, pela ação da enzima ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera acoplada ao sistema (CARVALHO; SILVA, 2010).

Para construção da biblioteca de sequenciamento, o DNA precisa ser mecanicamente quebrado em fragmentos de 300 a 800 bp, que são ligados a adaptadores específicos. A biblioteca de DNA da amostra é ligada aos adaptadores A e B nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos, respectivamente, os quais são utilizados nas etapas posteriores de isolamento dos fragmentos, na amplificação e nas reações de sequenciamento. O adaptador B possui biotina ligada à extremidade 5', o que permite o isolamento dos fragmentos ligados ao adaptador A. Os fragmentos são ligados às microesferas que carregam várias cópias da sequência complementar ao adaptador B. O adaptador A é o local onde o *primer* que inicia a reação de sequenciamento irá se ligar. A Figura 6 representa um esquema da reação de pirosequenciamento descrita anteriormente.

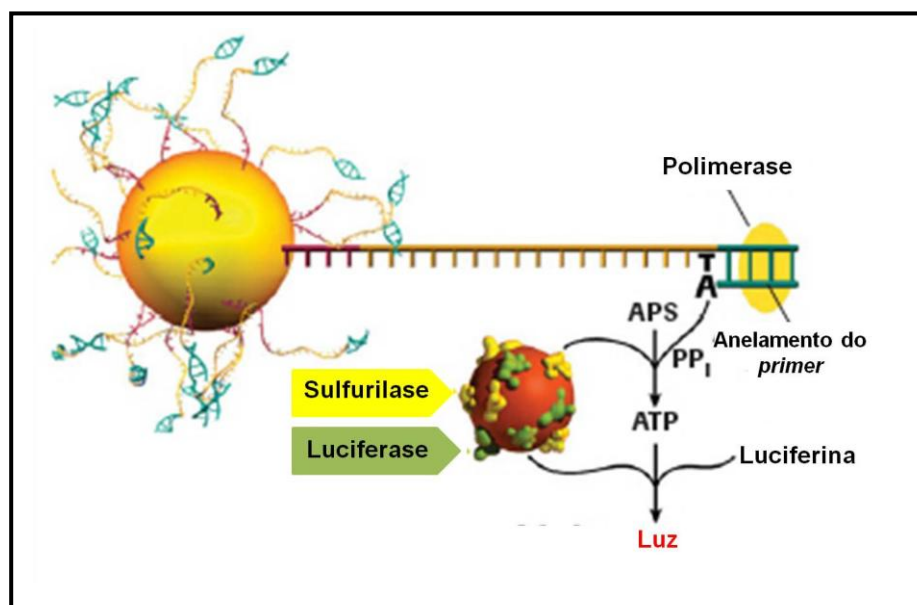


Figura 6. Esquema da reação de pirosequenciamento, realizada pela plataforma de sequenciamento 454 (Roche). Modificado de <http://www.dkfz.de/gpcf/223.html>.

As microesferas ligadas aos fragmentos únicos de fita simples sofrem um processo de emulsão em uma mistura de água e óleo, contendo reagentes de PCR para amplificação clonal de cada fragmento fita simples em cerca de um milhão de cópias. Na PCR em emulsão, são formadas micelas que capturam as microesferas, funcionando como um microrreator, produzindo várias cópias idênticas de um mesmo fragmento.

Após a PCR em emulsão, as microesferas ligadas aos fragmentos de DNA fita simples são depositadas em poços distintos em uma placa de sílica, onde os reagentes para a reação de sequenciamento são distribuídos. As reações de sequenciamento ocorrem em cada poço, para um único tipo de fragmento ligado à microesfera, não havendo, portanto, competição por reagentes com outros fragmentos da biblioteca. A placa de sequenciamento é dividida em poços com diâmetro suficiente para alojar uma única microesfera, a qual é inserida junto ao sistema óptico de leitura do equipamento, onde os reagentes e as soluções de sequenciamento são distribuídos. O sequenciamento é realizado em ciclos, onde a cada ciclo é adicionado um determinado tipo de nucleotídeo à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal o reflexo do número de nucleotídeos específicos que foram sucessivamente incorporados na molécula de DNA, desde que não sejam homopolímeros. Como o nucleotídeo adicionado a cada ciclo é conhecido, o sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação da sequência de DNA.

Os fragmentos sequenciados passam por análise de qualidade, onde as sequências distintas oriundas do sequenciamento de uma única microesfera são eliminadas, bem como leituras em que a sequência inicial TCGA (quatro primeiros nucleotídeos dos adaptadores) não aparece. As sequências geradas pelo sistema *GS FLX Titanium* apresentaram um tamanho médio de 700 bp (ROCHE) as quais foram montadas por sobreposição, para que fosse determinada a sequência correspondente de cada um dos clones.

3.3. Análise dos dados

3.3.1. Análise das sequências obtidas por pirosequenciamento

Blast2seq

Foi realizada uma avaliação da presença dos marcadores nos clones selecionados com auxílio da ferramenta BLAST2seq (*Basic Local Alignment Search Tool of Two Sequences* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde o parâmetro BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool of Nucleotide*) foi utilizado. A ferramenta BLAST2seq realiza o alinhamento entre duas ou mais sequências de interesse e o BLASTn realiza a busca por sequências homólogas nos bancos de dados. Desse modo, foram realizados os alinhamentos das sequências oriundas dos clones com seus respectivos iniciadores para PCR, onde foram utilizados os parâmetros padrões do BLASTn.

Foram considerados os alinhamentos que apresentaram maiores valores de “score”, cobertura e identidade. O “score” é o valor numérico que descreve a qualidade do alinhamento, sendo calculado a partir de uma matriz que considera as penalidades dadas aos alinhamentos errôneos (do inglês “mismatch”) e aos “gaps” (lacunas), os quais são inseridos quando ocorrem alterações na sequência de nucleotídeos causadas por substituições e deleções/inserções, respectivamente. A cobertura da sequência (do inglês “query cover”) é representada pela porcentagem da sequência de interesse que está incluída no alinhamento. Já a identidade é medida pelo número de nucleotídeos idênticos resultantes do alinhamento entre as sequências, sendo este valor expresso em porcentagem.

ClustalW

Para verificar a sobreposição das sequências de DNA de clones positivos para o mesmo marcador foi realizado alinhamento das sequências de tais clones utilizando a ferramenta ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Para essa análise, foram utilizados os parâmetros padrões do *ClustalW*.

BLASTn

Com o objetivo de obter informações sobre regiões de homologia entre as sequências dos clones selecionados e o genoma bovino, foram realizados alinhamentos das sequências de DNA de cada um dos clones com as duas anotações do genoma bovino (UMD_3.1 e Btau_4.6.1), disponíveis no banco de dados americano NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=bos+taurus>). A versão de anotação do genoma bovino UMD_3.1 (GCA_000003055.3) foi realizada pelos pesquisadores do *Center for Bioinformatics and Computational Biology*, da Universidade de Maryland (EUA) em 2009, enquanto que a versão Btau_4.6.1 (GCA_000003205.4) foi montada pelos pesquisadores do *Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium - Baylor College of Medicine* (EUA), no ano de 2011.

Os alinhamentos foram realizados com auxílio da ferramenta BLASTn, sendo utilizados os parâmetros padrões. Os resultados dos alinhamentos que apresentaram maiores valores de “score”, cobertura e identidade foram considerados os mais significativos.

3.3.2. Identificação de sequências conservadas entre boi e búfalo

A identificação de sequências conservadas entre os clones selecionados e o genoma bovino foi realizada com auxílio do programa *MAUVE* (DARLING et al., 2004), utilizando a ferramenta *ProgressiveMAUVE* (DARLING; MAU; PERNA, 2010). Foram realizados os alinhamentos das sequências dos clones selecionados com as duas versões de anotação disponíveis para o cromossomo 23 bovino (BTA23), UMD_3.1 (AC_000180.1) e Btau_4.6.1 (NC_007324.5). A ferramenta *ProgressiveMAUVE* considera como sequências conservadas aquelas que possuem similaridade maior que 60%, onde a similaridade é definida pelo grau de relação entre duas sequências de nucleotídeos, medida pela porcentagem de identidade. O método de alinhamento identifica e alinha regiões conservadas entre as sequências por meio da construção de matrizes de penalidades que determinam maiores valores de “score” para essas regiões. Os resultados são ilustrados na forma de blocos colineares, onde cada bloco corresponde a uma região de homologia entre as

sequências analisadas. Dessa maneira, as sequências internas aos blocos encontram-se livres de possíveis rearranjos genômicos (DARLING et al., 2004).

3.3.3. Identificação de sequências repetitivas

A identificação de sequências repetitivas foi realizada com auxílio do programa *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>), o qual utiliza o banco de dados *RepBase Update* (JURKA et al., 2005), mantido pelo *Genetic Information Research Institute* (GIRI). Este programa permite a identificação de elementos transponíveis, pequenos RNAs e repetições em “tandem”.

Os elementos transponíveis são fragmentos de DNA que possuem a capacidade de se mover entre regiões de um genoma (CORDAUX; BATZER, 2009). Tais elementos são classificados com base no mecanismo de transposição, de acordo com o intermediário utilizado para a replicação e inserção no genoma hospedeiro (FINNEGAN, 1989).

Os retrotransposons, classificados como elementos de classe I, recebem esta denominação por utilizarem um intermediário de RNA, o qual sofre ação da enzima transcriptase reversa, produzindo uma cópia de DNA complementar que será inserida em outro local do genoma. Já os transposons são inseridos no genoma por meio de cópias do seu próprio DNA, sem que haja um intermediário de RNA, sendo denominados elementos de classe II. A classe dos retrotransposons pode ainda ser subdividida entre os chamados retrotransposons LTR (do inglês, “long terminal repeat”) e os retrotransposons não-LTR. Dentre os retrotransposons não-LTR, encontram-se os elementos transponíveis conhecidos como LINE (do inglês, “long interspersed element”) e SINE (do inglês, “short interspersed element”), os quais estão presentes no genoma de todos os organismos eucariotos e juntos compreendem cerca de 25% do genoma bovino (ADELSON; RAISON; EDGAR, 2009).

As classes de pequenos RNAs identificadas pelo programa *RepeatMasker* são os RNAs transportadores (tRNA), pequenos RNAs nucleares (do inglês, “small nuclear RNA” - snRNA), RNAs ribossômicos (rRNA), srpRNA (do inglês, “signal recognition particle RNA”) e scRNA (do inglês, “small cytoplasmatic RNA”). As

moléculas de RNAs transportadores atuam no transporte de aminoácidos para o RNA mensageiro durante a síntese de proteínas, enquanto que os snRNA estão envolvidos no processamento das moléculas de RNA mensageiro. Já os RNAs ribossômicos são constituintes estruturais e funcionais dos ribossomos. Tanto os srpRNA quanto os scRNA são moléculas que atuam no processo denominado “signal recognition particle”, o qual atua no transporte de proteínas dos ribossomos para a membrana do retículo endoplasmático (NAKAMURA et al., 2005).

As repetições em “tandem” são formadas pela repetição de um ou mais nucleotídeos de forma adjacente na molécula de DNA. O programa *RepeatMasker* identifica repetições denominadas de microssatélites, as quais possuem unidade de repetição composta por dois a cinco nucleotídeos (VIEIRA, VELLO, SILVA FILHO, 2004).

Os parâmetros utilizados para a identificação desses elementos repetitivos com o programa *RepeatMasker* foram os seguintes:

- “cross_match” para a opção “search engine”;
- “slow sensibility”, a qual permite uma busca mais sensível;
- “mammal other than below” para especificar a fonte de DNA da sequência de interesse;
- “show alignments in query sequence orientation” para obter o alinhamento dos elementos identificados na sequência de interesse;
- “mask repetitive sequences replaced by strings of N”, onde as sequências dos elementos repetitivos identificados foram substituídas pela letra N;
- “mask interspersed and simple repeats”, para que as sequências de pequenos RNAs e repetições em “tandem” identificadas também fossem substituídas pela letra N;
- “skip bacterial insertion element check”, onde não foi verificada a presença de elementos pertencentes às sequências de DNA de bactérias.

3.3.4. Predição de genes

O programa *GENSCAN* (BURGE; KARLIN, 1997 - <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) foi utilizado para a predição de genes a partir das sequências de DNA obtidas no presente trabalho. Esse programa realiza a

predição dos genes por meio da identificação de propriedades gerais e específicas de unidades funcionais de um gene em organismos eucariotos, tais como éxons, íntrons e região promotora, permitindo assim que a identificação seja realizada sem a necessidade de uma busca por sequências homólogas em banco de dados, denominada predição *ab initio*.

Para predição dos genes nas sequências de DNA dos clones selecionados foram utilizadas as sequências obtidas nas análises realizadas com auxílio do programa *RepeatMasker*. Porém, o parâmetro “mask interspersed and simple repeats” foi substituído pelo “don’t mask simple repeats and low complexity DNA”, uma vez que repetições em “tandem” podem estar presentes em regiões de éxon dos genes preditos. Segundo os autores do programa *GENSCAN* (BURGE; KARLIN, 1997), a presença de determinados elementos repetitivos na sequência pode, em alguns casos, distorcer os resultados obtidos, uma vez que tais elementos podem ser erroneamente preditos como genes.

As sequências codificantes (CDs) dos genes preditos para cada um dos clones foram avaliadas com a ferramenta BLASTn, utilizando o banco de dados referência de RNA de *Bos taurus* (*RefSeq RNA*) para identificação de sequências de RNAs homólogas em bovino.

Em seguida, as sequências de aminoácidos preditas pelo programa *GENSCAN* foram avaliadas com a ferramenta BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool* of Protein), utilizando o banco referência de proteínas de bovino (*RefSeq Protein*), para identificação de sequências de aminoácidos homólogas entre as sequências de búfalo e bovino.

Por fim, as sequências de DNA dos genes preditos nas sequências dos clones foram alinhadas com a sequência do gene correspondente em bovino, utilizando a ferramenta BLAST2seq. As sequências dos genes em bovino foram obtidas no banco de dados *UCSC Genome Bioinformatics – University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/>), onde a versão de anotação Btau_4.6.1 foi selecionada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos clones para marcadores da classe IIb

A partir das reações de PCR foram identificados três clones positivos para quatro marcadores da classe IIb da região MHC de búfalo, sendo eles: 11.05, 12.05, 13.00 e DMA. Um mesmo clone, localizado na linha A e coluna 17 da placa 2 (*singlepool* 2), mostrou-se positivo para três desses marcadores (11.05, 12.05 e DMA). Outro clone contendo o marcador 12.05 foi identificado na linha K e coluna 3 da placa 10. No caso do marcador 13.00, o clone positivo foi localizado na linha I e coluna 9 da placa 60.

A Tabela 2 apresenta os marcadores selecionados, os respectivos *superpools* e os *singlepools* nos quais cada clone foi localizado, assim como sua localização específica na placa (linha/coluna).

Tabela 2. Marcadores identificados na avaliação da biblioteca genômica de búfalo e a respectiva localização dos clones no *superpool*, *singlepool* e linha/coluna.

Símbolo do Marcador	<i>Superpool</i>	<i>Singlepool</i>	Posição do clone na placa (Linha/Coluna)
11.05			
DMA	1	2	A/17
12.05			
12.05	2	10	K/03
13.00	8	60	I/09

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos nas reações de PCR realizadas para seleção de clones positivos para o marcador 11.05. Na Figura 7A, estão representados os experimentos realizados com os 11 *superpools*, onde o *superpool* 1 continha o clone positivo, indicado pela seta azul. Como pode ser observado na parte B, dentre as oito placas que compõem o *superpool* 1, a placa 2 (*singlepool* 2) mostrou-se positiva, a qual está indicada pela seta verde. Os resultados obtidos com as reações de PCR do sistema linha/coluna estão representados Figura 7C, onde o clone positivo para o marcador 11.05 foi localizado na linha A e coluna 17 da placa, indicadas pelas setas vermelhas.

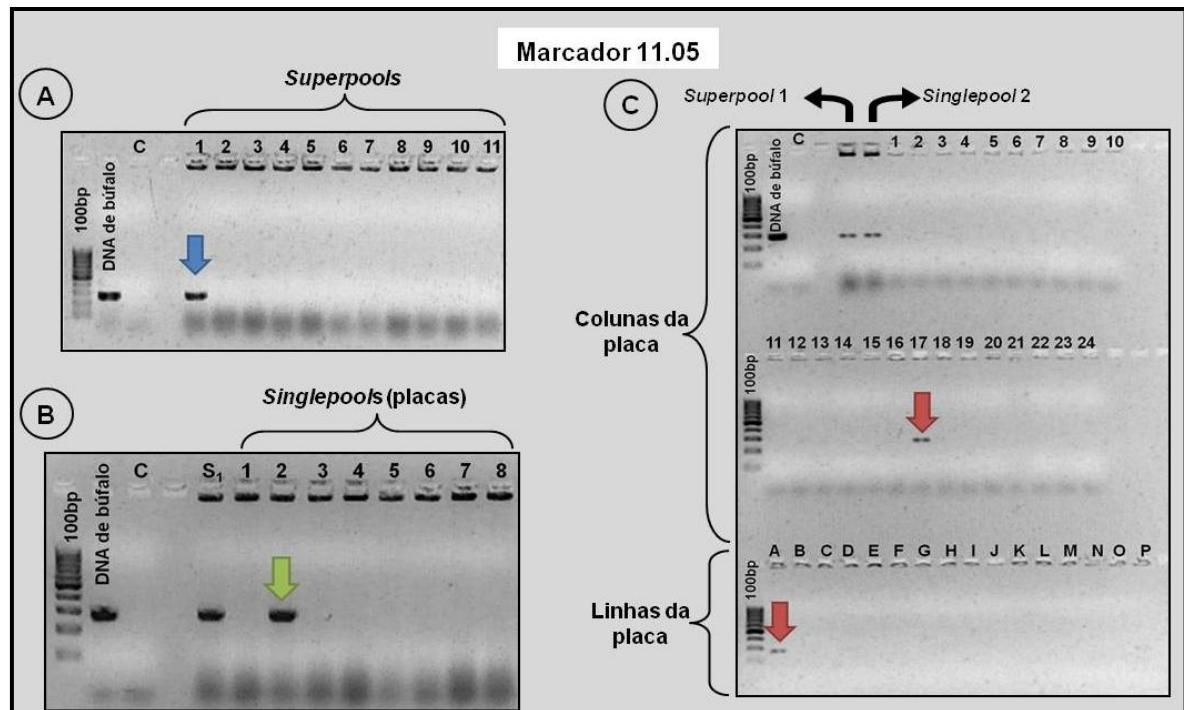


Figura 7. Representação de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, mostrando o resultado das reações de PCR realizadas para identificação de clones positivos para o marcador 11.05. **(A)** Reação de PCR com 11 *superpools*. A seta azul indica que o *superpool* 1 é positivo. **(B)** Reação de PCR com os *singlepools* que compunham o *superpool* 1. A seta verde indica que o *singlepool* 2 é positivo. **(C)** Reação de PCR do sistema linha/coluna do *singlepool* 2. **A-P**: linhas da placa 2; **1-24**: colunas da placa 2. As setas vermelhas indicam que o clone da linha A e coluna 17 é positivo. **DNA de búfalo**: controle positivo da reação; **C**: controle negativo da reação (sem DNA); **100bp**: marcador molecular (*Fermentas*).

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam os resultados obtidos para seleção de clones contendo os marcadores DMA, 12.05 e 13.00, respectivamente. O clone contendo o marcador DMA é o mesmo selecionado para o marcador 11.05 (Figura 7), sendo o clone A/17 localizado na placa 2.

Na seleção de clones contendo o marcador 12.05, foram identificados dois *superpools* positivos, sendo eles os *superpools* 1 e 2, como pode ser observado na Figura 9A. Além do clone A/17 localizado na placa 2, o clone localizado na linha K e coluna 3 da placa 10 também mostrou-se positivo para tal marcador, como pode ser observado na Figura 9C.

Para o marcador 13.00 (Figura 10), o clone positivo foi localizado na linha I e coluna 9 da placa 60, a qual compõe o *superpool* 8.

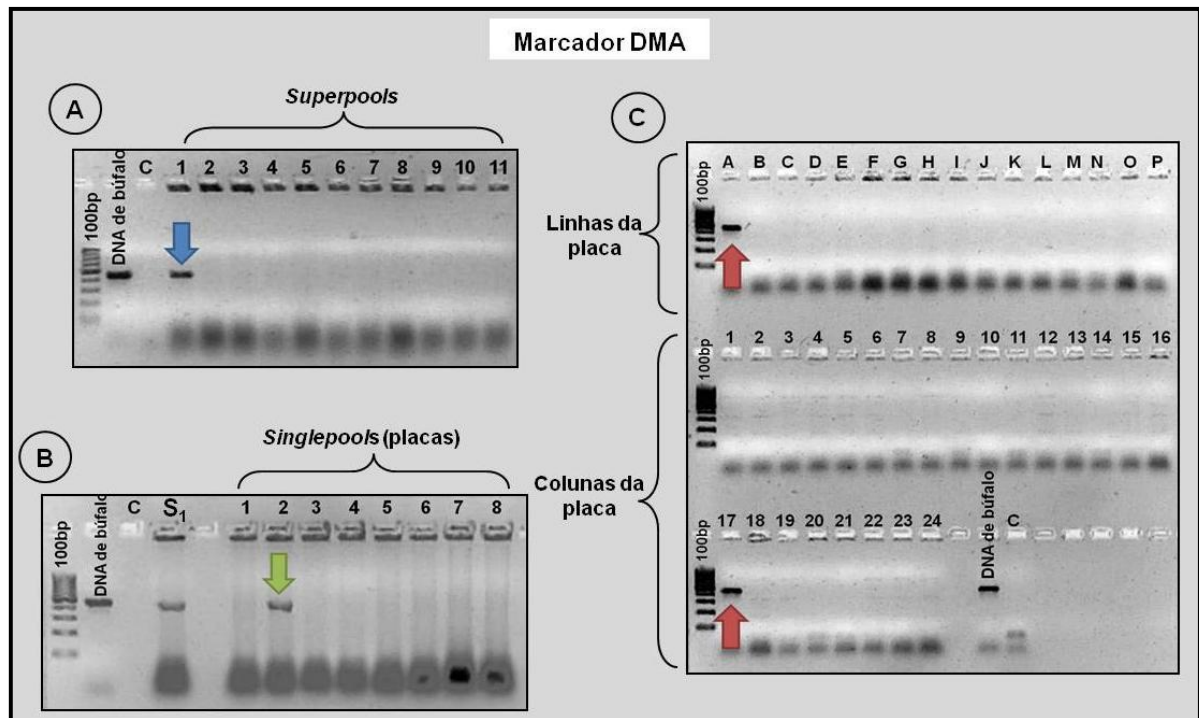


Figura 8. Representação de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, mostrando o resultado das reações de PCR realizadas para identificação de clones positivos para o marcador DMA. **(A)** Reação de PCR com 11 *superpools*. A seta azul indica que o *superpool* 1 é positivo. **(B)** Reação de PCR com os *singlepools* que compunham o *superpool* 1. A seta verde indica que o *singlepool* 2 é positivo. **(C)** Reação de PCR do sistema linha/coluna do *singlepool* 2. **A-P:** linhas da placa 2; **1-24:** colunas da placa 2. As setas vermelhas indicam que o clone da linha A e coluna 17 é positivo. **DNA de búfalo:** controle positivo da reação; **C:** controle negativo da reação (sem DNA); **100bp:** marcador molecular (*Fermentas*).

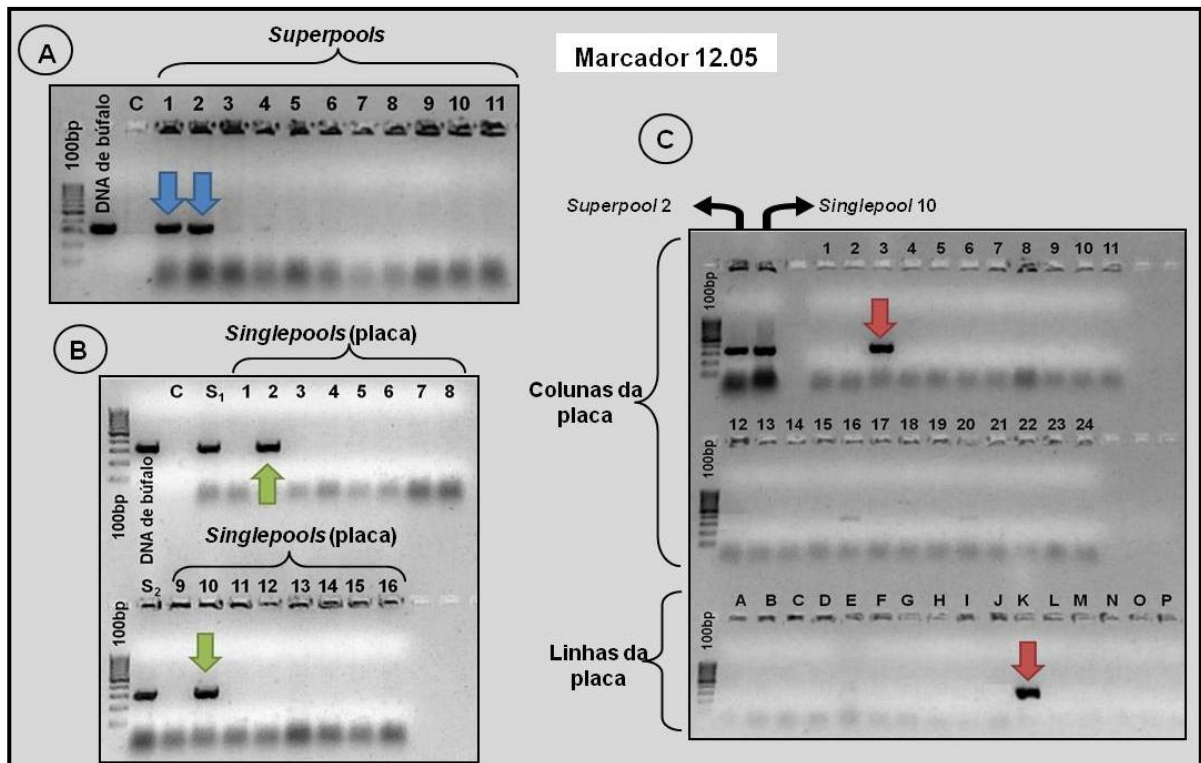


Figura 9. Representação de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, mostrando o resultado das reações de PCR realizadas para identificação de clones positivos para o marcador 12.05. **(A)** Reação de PCR com 11 *superpools*. As setas azuis indicam que os *superpools* 1 e 2 são positivos. **(B)** Reação de PCR com os *singlepools* que compunham os *superpools* 1 e 2. As setas verdes indicam que os *singlepools* 2 e 10 são positivos. **(C)** Reação de PCR do sistema linha/coluna do *singlepool* 10. **A-P**: linhas da placa 10; **1-24**: colunas da placa 10. As setas vermelhas indicam que o clone da linha K e coluna 3 é positivo. **DNA de búfalo**: controle positivo da reação; **C**: controle negativo da reação (sem DNA); **100bp**: marcador molecular (*Fermentas*).

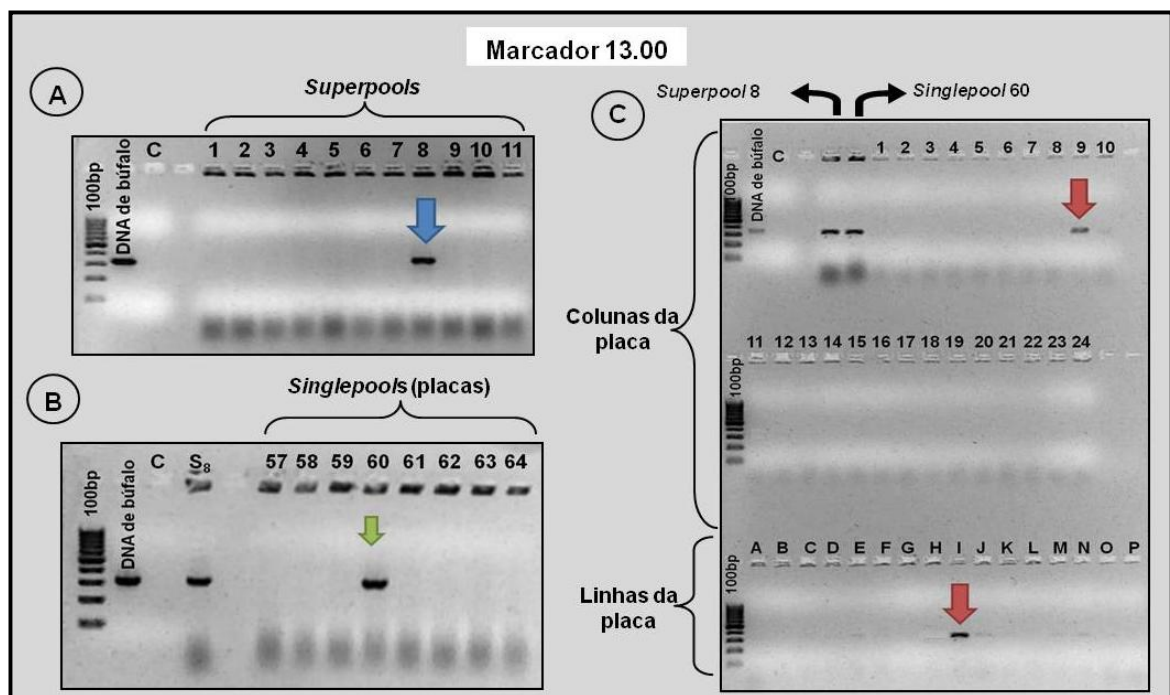


Figura 10. Representação de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, mostrando o resultado das reações de PCR realizadas para identificação de clones positivos para o marcador 13.00. **(A)** Reação de PCR com 11 *superpools*. A seta azul indica que o *superpool* 8 é positivo. **(B)** Reação de PCR com os *singlepools* que compunham o *superpool* 8. A seta verde indica que o *singlepool* 60 é positivo. **(C)** Reação de PCR do sistema linha/coluna do *singlepool* 60. **A-P**: linhas da placa 60; **1-24**: colunas da placa 60. As setas vermelhas indicam que o clone da linha I e coluna 9 é positivo. **DNA de búfalo**: controle positivo da reação; **C**: controle negativo da reação (sem DNA); **100bp**: marcador molecular (*Fermentas*).

4.2. Avaliação dos clones selecionados

Após a seleção dos clones positivos para marcadores da classe IIb, os mesmos tiveram seus insertos de DNA purificados com o *kit PhasePrepTMBAC DNA* (*Sigma-Aldrich*). Posteriormente, as reações de PCR com o DNA extraído dos clones confirmaram que os três clones selecionados eram positivos.

A Figura 11 representa um gel contendo os resultados obtidos com o experimento de avaliação da integridade do DNA extraído dos três clones selecionados neste trabalho. Como pode ser observado, os clones A/17 (marcadores 11.05, 12.05 e DMA), K/03 (marcador 12.05) e I/09 (marcador 13.00) apresentaram insertos de DNA totalmente íntegros.

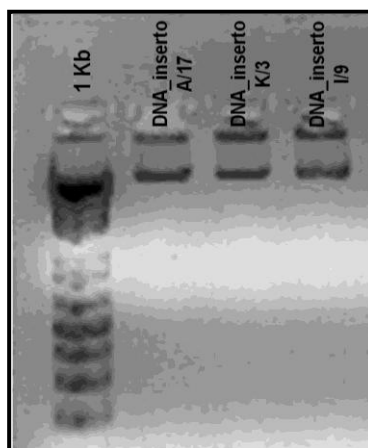


Figura 11. Representação de gel de agarose mostrando os resultados obtidos com o experimento para avaliação da integridade dos insertos de DNA extraídos dos clones positivos para marcadores da classe IIb da região MHC de búfalo. **1Kb:** marcador molecular (*InvitrogenTM*)

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos nas reações de PCR para confirmação da presença do inserto de DNA dos clones A/17 (marcadores 11.05, 12.05 e DMA), K/03 (marcador 12.05) e I/09 (marcador 13.00).

Confirmada a presença dos insertos de DNA nos clones, as concentrações dos mesmos foram medidas em espectrofotômetro (*Nanodrop ND1000TM* - *Thermo Scientific*), cujos DNAs apresentaram as seguintes concentrações: 56,0 ng/μL para o

inserto de DNA do clone A/17 (marcadores 11.05, 12.05 e DMA), 59,0 ng/ μ L para o K/03 (marcador 12.05) e de 62,3 ng/ μ L para o I/09 (marcador 13.00).

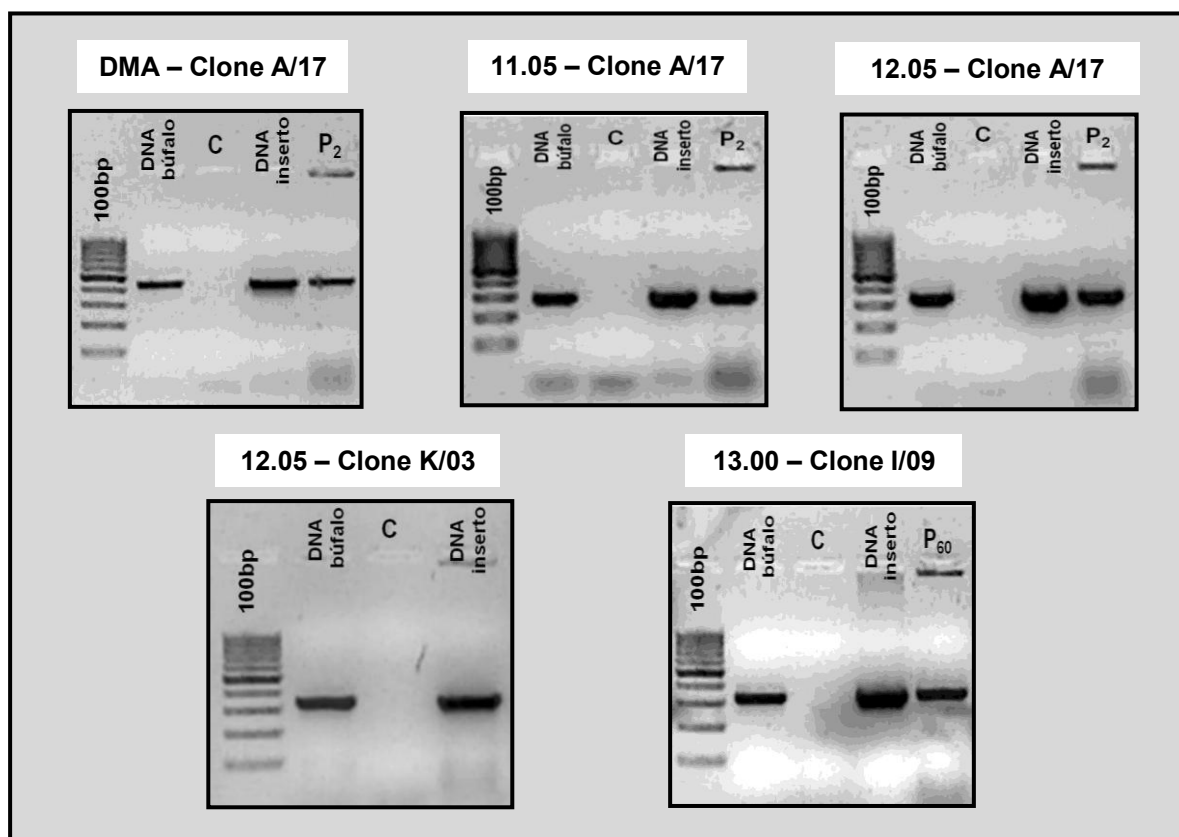


Figura 12. Representação de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, mostrando o resultado das reações de PCR realizadas para confirmar se os clones identificados eram positivos para os marcadores selecionados. **100bp:** marcador molecular (*Fermentas*); **DNA de búfalo:** controle positivo da reação; **C:** controle negativo da reação (sem DNA); **DNA_inserto:** DNA extraído do clone; **P_x:** placa que continha o respectivo clone.

Após a avaliação da qualidade do DNA extraído, os três clones selecionados foram sequenciados por meio da plataforma de pirosequenciamento *GS FLX Titanium* (ROCHE), via serviço de terceiros.

4.3. Análise dos dados

4.3.1. Análise das sequências obtidas no pirosequenciamento

Para a construção da biblioteca de sequenciamento, os insertos de DNA dos clones foram clivados em fragmentos de aproximadamente 660 bp, os quais foram sequenciados pela tecnologia de pirosequenciamento ou sequenciamento em síntese. A leitura desses fragmentos gera as denominadas *reads*, que são as

sequências de nucleotídeos que serão alinhadas por sobreposição para montagem da sequência de DNA consenso de cada clone, realizada pela metodologia *de novo*. O número de *reads* gerado para cada um dos clones foi de: 3.935 *reads* para o clone A/17, 4.010 *reads* para o clone K/03 e 4.054 para o clone I/09. O tamanho médio das *reads* obtidas no pirosequenciamento foram de 626 bp para o clone A/17, 679 bp para o clone K/03 e 681 bp para o clone I/09. Já as coberturas obtidas para cada um dos clones foram de: 20,47X para o clone A/17, 92,68X para o clone K/03 e 66,53X para o clone I/09, onde a cobertura representa o número médio de *reads* em que um nucleotídeo encontra-se representado.

Os tamanhos das sequências consenso obtidas para os clones foram de: 117.211 bp para o clone A/17 (marcadores 11.05, 12.05 e DMA), 26.569 bp para o clone K/03 (marcador 12.05) e de 42.891 bp para o clone I/09 (marcador 13.00).

Blast2seq

A validação da presença dos marcadores do MHC nos clones selecionados, realizada com auxílio da ferramenta BLAST2seq, resultou no alinhamento completo das sequências senso e anti-senso de cada iniciador de PCR com a sequência de seu respectivo clone. Tais alinhamentos permitiram a determinação dos tamanhos dos produtos de PCR obtidos para cada par de iniciadores, os quais foram de 286 bp para o marcador 11.05, 344 bp para o marcador 12.05, 321 bp para o 13.00 e de 431 bp para o marcador DMA.

ClustalW

O alinhamento realizado com a ferramenta *ClustalW* permitiu identificar que a sequência do clone K/03 encontra-se inteiramente representada no clone A/17. A Figura 13 apresenta um esquema ilustrativo do alinhamento das sequências desses dois clones, onde os nucleotídeos que se encontram no intervalo de 6.547 a 34.048 da sequência do clone A/17, representado na Figura 13 pelo retângulo hachurado, são correspondentes à sequência completa do clone K/03.

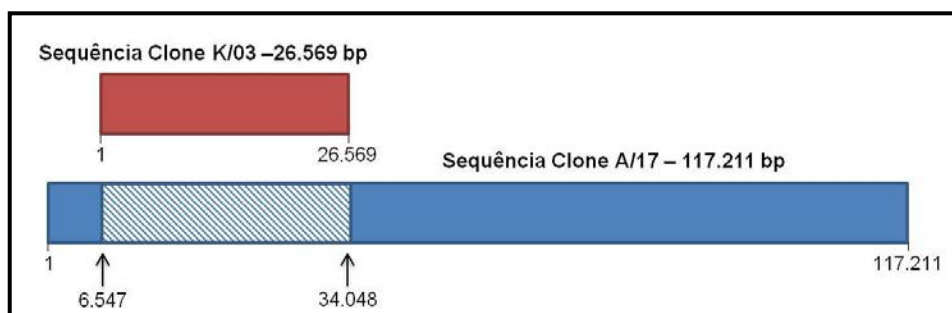


Figura 13. Esquema ilustrando o resultado obtido no alinhamento das seqüências dos clones K/03, representada pelo retângulo em vermelho e A/17, representada pelo retângulo em azul, com auxílio da ferramenta *ClustalW*. O retângulo hachurado representa o intervalo de nucleotídeos da seqüência do clone A/17 correspondente a seqüência do clone K/03.

Uma vez que a seqüência do clone K/03 encontra-se totalmente representada no clone A/17, as demais análises foram realizadas apenas com as seqüências dos clones A/17 e I/09.

BLASTn

As análises realizadas com as seqüências de DNA dos clones selecionados e as versões de anotação do genoma bovino UMD_3.1 e Btau_4.6.1, por meio da ferramenta BLASTn, apresentaram os alinhamentos mais significativos com as seqüências correspondentes do cromossomo 23 bovino AC_000180.1 e NC_007324.5, respectivamente. Esse resultado está de acordo com o descrito na literatura, uma vez que a região MHC de bovino encontra-se localizada neste cromossomo (BTA23), o qual é homólogo ao braço curto do cromossomo 2 bubalino (BBU2p) (STAFUZZA et al., 2013).

O alinhamento da seqüência do clone A/17 com a versão UMD_3.1 apresentou 95% de cobertura, 96% de identidade e “score” de 32.703, com um “e-value” de 0.0. Nesta versão de anotação do genoma bovino, a seqüência de DNA do clone foi alinhada no intervalo entre os nucleotídeos 7.145.257 e 7.258.905 da seqüência correspondente do BTA23 (Figura 14A). Já o alinhamento da seqüência do mesmo clone com a versão Btau_4.6.1 apresentou 92% de cobertura, 96% de identidade e “score” de 32.009, com um “e-value” de 0.0. Na versão Btau_4.6.1, a seqüência de DNA do clone foi alinhada no intervalo entre os nucleotídeos 7.431.121 e 7.593.570 da seqüência correspondente do cromossomo BTA23 (Figura 14B).

A Figura 14 representa um esquema dos resultados obtidos com o alinhamento da sequência do clone A/17 com a sequência do cromossomo BTA23, em ambas as versões de anotação. Na parte A da Figura 14, encontra-se ilustrado o alinhamento com a versão UMD_3.1, onde a sequência correspondente do cromossomo bovino está representada pelo retângulo em laranja. Já na parte B, encontra-se representado o resultado do alinhamento da sequência do clone A/17 com a versão Btau_4.6.1, onde a sequência correspondente do cromossomo bovino está representado pelo retângulo em verde. A sequência do clone A/17 encontra-se representada pelos retângulos em azul, onde os retângulos na cor azul escuro representam as regiões de alinhamento da sequência do clone com a correspondente versão do cromossomo bovino. As setas em vermelho indicam a sequência senso ($5' \rightarrow 3'$ - setas voltadas para a direita) ou anti-senso ($3' \rightarrow 5'$ - setas voltadas para a esquerda) na qual a sequência de DNA do clone foi alinhada à sequência do cromossomo BTA23 em cada uma das versões.

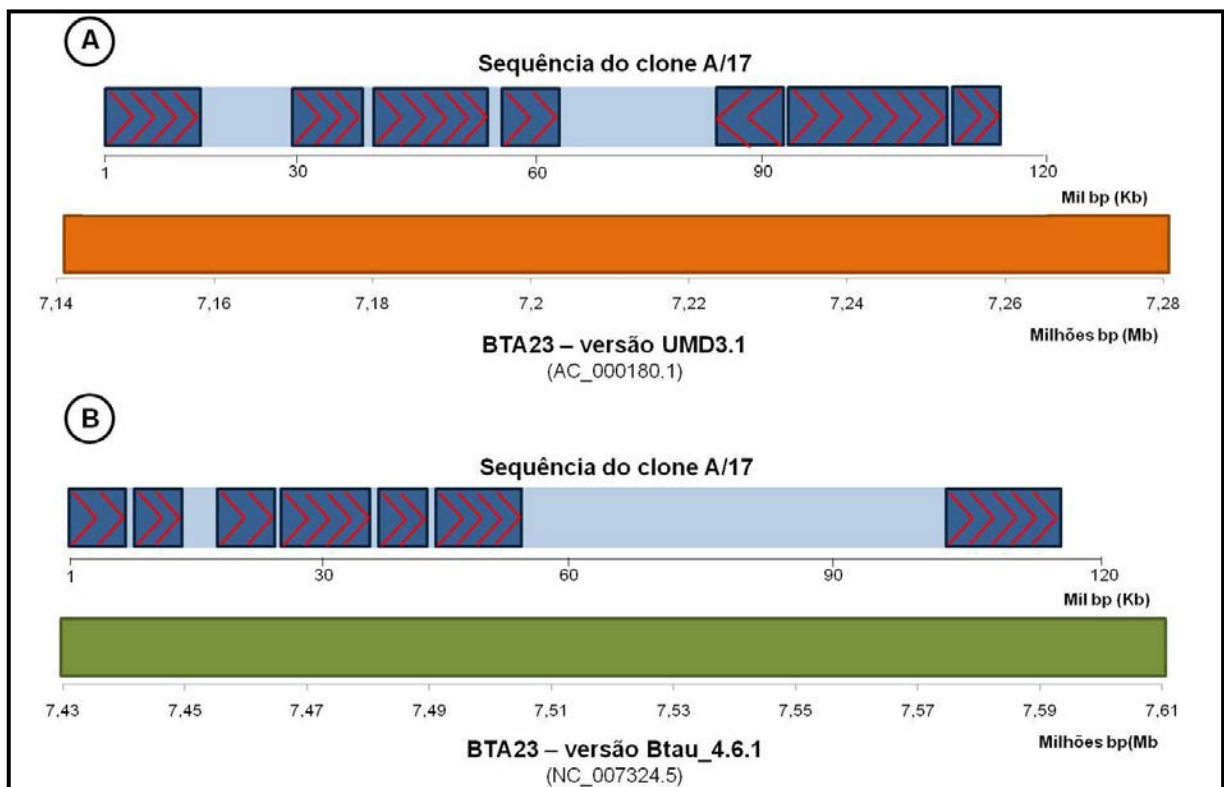


Figura 14. Esquema representando os resultados obtidos com o alinhamento da sequência do clone A/17 (retângulos em azul) com cromossomo BTA23. **A:** Alinhamento do clone com a versão UMD3.1 (retângulo em laranja). **B:** Alinhamento do clone com a versão Btau_4.6.1 (retângulo em verde). Os retângulos em azul escuro representam as regiões de alinhamento da sequência do clone com a correspondente versão do cromossomo bovino. As setas em vermelho indicam o sentido senso ($>$) ou anti-senso ($<$) do alinhamento das sequências. Os retângulos em azul claro indicam as regiões da sequência do clone que não apresentaram homologia com o cromossomo bovino. Foi utilizada escala em mil pares de bases (Kb) para a sequência do clone e em milhões de pares de bases (Mb) para a sequência do cromossomo.

Em ambas as versões de anotação do genoma bovino, o alinhamento da sequência de DNA do clone A/17 com o BTA23 resultou em fragmentos homólogos, representados nas partes A e B da Figura 14 pelos retângulos em azul escuro. Foram identificados sete fragmentos homólogos em cada um dos alinhamentos, onde apenas um deles foi alinhado com a sequência anti-senso do cromossomo BTA23 na versão UMD_3.1, como pode ser observado na Figura 14A. Com base na cobertura dos fragmentos homólogos identificados com cada uma das versões de anotação do genoma bovino, foi observado que a sequência do clone A/17 apresenta uma maior cobertura quando alinhada com a versão UMD_3.1 do que com a versão Btau_4.6.1.

O alinhamento da sequência do clone I/09 com a versão UMD_3.1 apresentou 98% de cobertura, 95% de identidade e “score” de 13.838, com um “e-value” de 0.0. Nesta versão de anotação do genoma bovino, a sequência de DNA do clone foi alinhada no intervalo entre os nucleotídeos 7.341.811 e 7.389.146 do BTA23 (Figura 15A). Já o alinhamento da sequência do mesmo clone com a versão Btau_4.6.1 apresentou 97% de cobertura, 95% de identidade e “score” de 8.821, com um “e-value” de 0.0. Nesta versão, a sequência de DNA do clone foi alinhada no intervalo entre os nucleotídeos 7.714.271 e 7.760.034 do BTA23 (Figura 15B).

A Figura 15 representa um esquema dos resultados obtidos com o alinhamento da sequência de DNA do clone I/09 com a sequência do cromossomo BTA23 nas duas versões de anotação do genoma bovino. Na parte A da Figura 15 encontra-se representado o alinhamento com a versão UMD_3.1, onde a sequência correspondente do cromossomo bovino está representada pelo retângulo em laranja. Já na parte B, o retângulo em verde representa a sequência correspondente da versão Btau_4.6.1 do BTA23, onde podem ser observados os resultados obtidos para o alinhamento da sequência do clone I/09 com esta versão. A sequência do clone está representada pelos retângulos em cinza, onde os retângulos na cor cinza escuro representam as regiões de alinhamento da sequência do clone com a correspondente versão do cromossomo BTA23. As setas em vermelho indicam a sequência anti-senso (<) na qual a sequência do clone foi alinhada com o BTA23 nas duas versões. Os retângulos em cinza claro representam as regiões da sequência do clone que não apresentaram homologia com o cromossomo bovino.

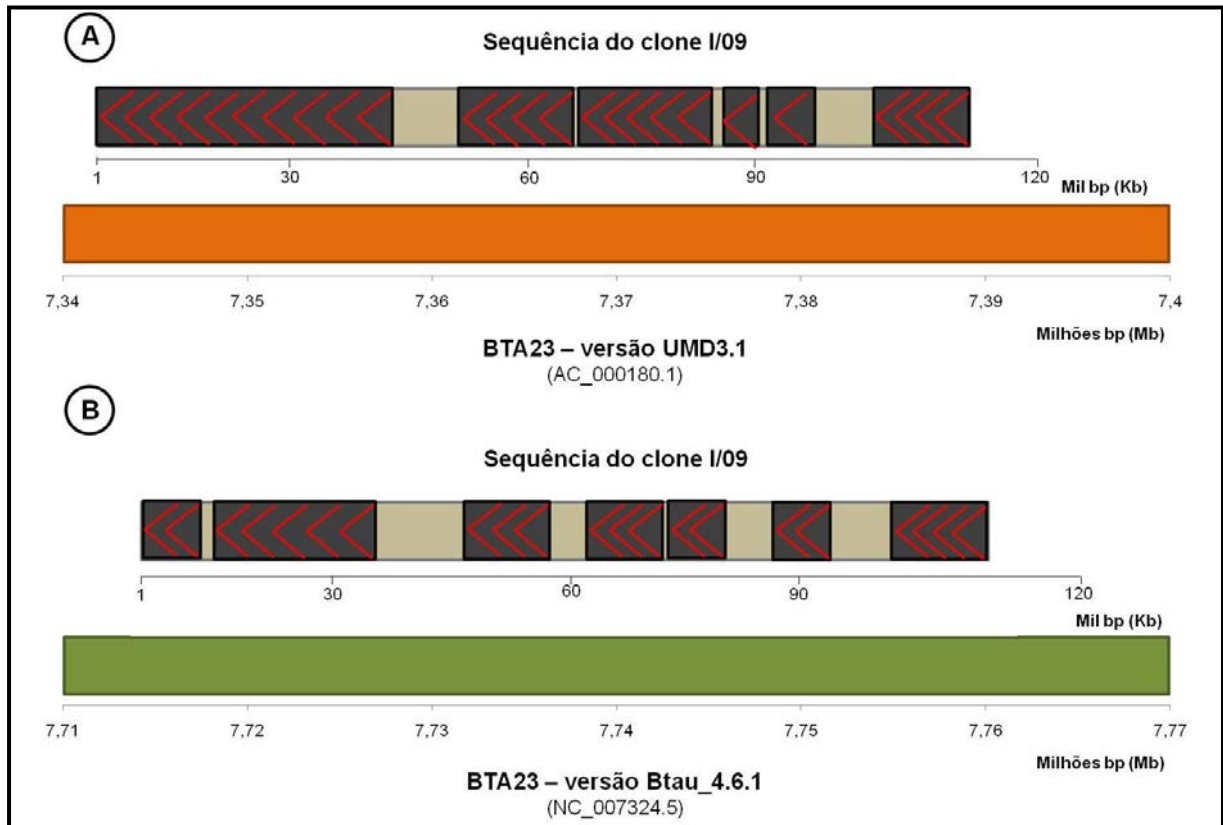


Figura 15. Esquema representando os resultados obtidos no alinhamento da sequência do clone I/09 com o cromossomo BTA23. **Parte A:** Alinhamento com a versão UMD3.1, onde o retângulo em laranja representa a sequência do cromossomo. **Parte B:** Alinhamento do clone com a versão Btau_4.6.1. O retângulo em verde representa o cromossomo BTA23 nesta versão. Nas duas partes da figura, os retângulos em cinza representam a sequência do clone. Os retângulos em cinza escuro representam as regiões de alinhamento da sequência do clone com a correspondente versão do cromossomo bovino. As setas em vermelho indicam o sentido senso (>) ou anti-senso (<) do alinhamento das sequências. Os retângulos em cinza claro indicam as regiões que não apresentaram homologia com o cromossomo bovino. Foi utilizada a escala em mil pares de bases (Kb) para a sequência do clone e em milhões de pares de bases (Mb) para o cromossomo.

Foram identificados seis e sete fragmentos homólogos com os alinhamentos realizados com as versões UMD_3.1 e Btau_4.6.1, respectivamente. Todos os fragmentos homólogos identificados foram alinhados com a sequência anti-senso do cromossomo BTA23. Com base na cobertura dos fragmentos homólogos identificados em cada uma das versões avaliadas, foi observado que a sequência do clone I/09 apresenta uma maior cobertura quando alinhada com o BTA23 da versão UMD_3.1.

A identificação de fragmentos de DNA que não apresentaram regiões de homologia com a sequência correspondente do cromossomo BTA23 em ambos os

clones, pode indicar a existência de sequências de DNA específicas da região MHC de búfalo, as quais não se encontram presentes no genoma bovino. Por outro lado, tais fragmentos considerados específicos do genoma bubalino podem representar sequências de DNA que ainda não foram anotadas no genoma bovino, devido à complexidade que a região MHC apresenta no genoma de mamíferos. Além disso, não pode ser descartada a ocorrência de erros no sequenciamento e na montagem das sequências realizados por terceiros, ao menos que seja realizado um re-sequenciamento desses clones.

Em uma comparação das versões de anotação do genoma bovino UMD_3.1 e Btau_4.0 com os resultados obtidos na construção do mapa de alta resolução da região MHC de bovino (BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009), o mapa construído mostrou que a disposição dos marcadores ao longo do cromossomo apresentava uma maior concordância com a versão Btau_4.0 do que com a versão UMD_3.1. A versão de anotação do genoma bovino Btau_4.0 foi publicada em 2009 pelo mesmo grupo de pesquisadores que construíram a versão Btau_4.6.1, onde esta apresenta um aumento no tamanho total do genoma e no número de cromossomos anotados, além de uma redução no número de “gaps” quando comparada à versão Btau_4.0.

Os resultados encontrados no presente trabalho diferem do observado por Brinkmeyer-Langford et al. (2009), uma vez que a versão UMD_3.1 apresentou uma maior cobertura com as sequências de DNA dos respectivos clones. Tal diferença pode ser explicada devido ao fato de que no trabalho mencionado acima foram realizadas análises entre o mapa de alta resolução da região MHC de bovino (método estatístico) com as sequências de DNA das duas versões de anotação do genoma bovino, enquanto que no presente trabalho, foram comparadas sequências de DNA de búfalo com sequências de DNA do genoma bovino, ou seja, foi realizada uma comparação das sequências de DNA de duas espécies diferentes.

4.3.2. Identificação de sequências conservadas entre boi e búfalo

O alinhamento das sequências de DNA dos clones com a versão UMD_3.1 do cromossomo BTA23, realizado com auxílio da ferramenta *ProgressiveMAUVE*, identificou oito blocos colineares para a sequência de DNA do clone A/17 (Figura

16A) e apenas um bloco colinear para a sequência de DNA do clone I/09 (Figura 16B). A Figura 16 apresenta os resultados obtidos, onde o alinhamento das sequências de DNA dos clones A/17 e I/09 com a versão UMD_3.1 do cromossomo bovino encontra-se representado na parte C da Figura.

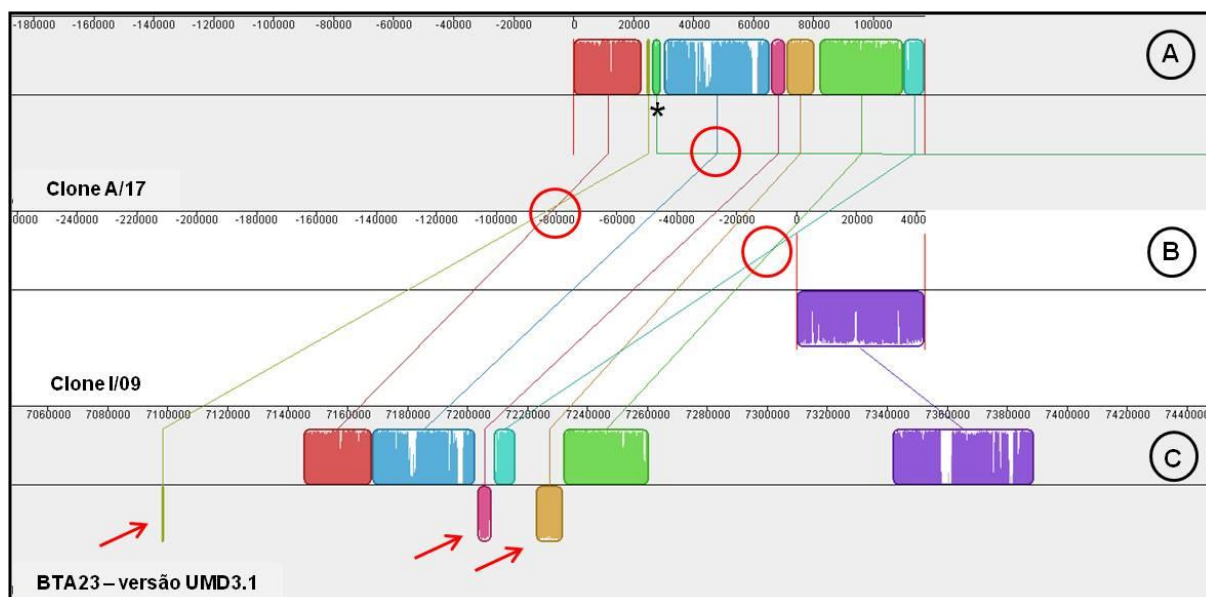


Figura 16. Resultados obtidos com o alinhamento entre as sequências de DNA dos clones A/17 (A) e I/09 (B) com o cromossomo BTA23 - versão UMD_3.1 (C). Os círculos em vermelho destacam os blocos que apresentaram posição invertida na sequência do BTA23 em relação à sequência do clone A/17. As setas em vermelho indicam os blocos colineares que foram alinhados na sequência anti-senso do BTA23. O asterisco indica o bloco colinear no qual não foi possível visualizar o alinhamento com o BTA23, devido a limitações da ferramenta *ProgressiveMAUVE*.

Dentre os blocos colineares identificados na sequência de DNA do clone A/17, três deles apresentaram uma inversão em relação àquela observada no BTA23, as quais estão indicadas na Figura 16A pelos círculos em vermelho.

As posições do alinhamento entre as sequências dos clones e o cromossomo bovino foram semelhantes àsquelas encontradas nos alinhamentos realizados por meio da ferramenta BLASTn, descritos anteriormente. Entretanto, um bloco colinear da sequência de DNA do clone A/17 (indicado por um asterisco na Figura 16A) apresentou o alinhamento no cromossomo bovino próximo ao nucleotídeo de posição 52.470.000, o que não condiz com os resultados obtidos com a ferramenta BLASTn. A posição de alinhamento desse bloco colinear não se encontra representada no mesmo plano visual dos resultados apresentados na Figura 16 devido às limitações apresentadas pela ferramenta *ProgressiveMAUVE*.

Foram identificados três blocos colineares relativos à sequência do clone A/17 alinhados com a sequência anti-senso do BTA23, os quais estão indicados pelas setas em vermelho na Figura 16C. Este resultado também difere daquele observado com o alinhamento realizado utilizando a ferramenta BLASTn, onde apenas um fragmento homólogo do clone A/17 foi alinhado na sequência anti-senso do BTA23. Além disso, a identificação de apenas um bloco colinear entre o clone I/09 e o BTA23 também difere dos resultados encontrados anteriormente, onde foram identificados seis fragmentos homólogos, como pode ser observado na Figura 15A. Os resultados obtidos com a ferramenta BLASTn também indicaram que os fragmentos homólogos da sequência do clone I/09 foram alinhados com a sequência anti-senso do BTA23, o que não foi observado nos resultados obtidos com a ferramenta *ProgressiveMAUVE*.

O alinhamento entre as sequências de DNA dos clones com a versão Btau_4.6.1 do cromossomo bovino resultou na identificação de quatro blocos colineares para a sequência do clone A/17 e apenas um bloco colinear para a sequência do clone I/09. A Figura 17 apresenta os resultados obtidos com a ferramenta *ProgressiveMAUVE*, onde o alinhamento das sequências dos clones A/17 e I/09 com a versão Btau_4.6.1 encontra-se representado na parte C da Figura.



Figura 17. Resultados obtidos com o alinhamento entre as sequências de DNA dos clones A/17 (A) e I/09 (B) com o cromossomo BTA23 - versão Btau_4.6.1 (C). Os círculos em vermelho destacam os blocos que apresentaram posição invertida na sequência do BTA23 em relação à sequência do clone A/17. A seta em vermelho indica o bloco colinear que foi alinhado na sequência anti-senso do BTA23. O asterisco indica o bloco colinear no qual não foi possível visualizar o alinhamento com o BTA23, devido a limitações da ferramenta *ProgressiveMAUVE*.

Dentre os blocos colineares identificados na sequência de DNA do clone A/17, dois deles apresentaram uma inversão em relação à posição observada no BTA23, os quais estão indicados por círculos vermelhos na Figura 17A.

As posições do alinhamento entre as sequências dos clones e o cromossomo BTA23, identificadas pela ferramenta *ProgressiveMAUVE*, foram semelhantes às aquelas encontradas nos alinhamentos realizados por meio da ferramenta BLASTn, como descrito previamente. Entretanto um bloco colinear relativo à sequência de DNA do clone A/17 (indicado por um asterisco na Figura 17A) apresentou alinhamento próximo ao nucleotídeo de posição 13.280.000 no BTA23, o que não condiz com os resultados obtidos com a ferramenta BLASTn.

Um bloco colinear relativo à sequência de DNA do clone A/17 apresentou um alinhamento com a sequência anti-senso do BTA23, o qual está indicado na Figura 17C pela seta vermelha. Tal resultado não foi observado no alinhamento realizado com a ferramenta BLASTn. Além disso, a identificação de apenas um bloco colinear para a sequência do clone I/09 também difere dos resultados encontrados anteriormente, onde foram identificados seis fragmentos homólogos entre a sequência do clone I/09 e o BTA23, como pode ser observado na Figura 15B.

Os resultados obtidos com a ferramenta BLASTn indicaram o alinhamento da sequência do clone I/09 com a sequência anti-senso do BTA23 na versão Btau_4.6.1, o que não foi observado com a ferramenta *ProgressiveMAUVE*.

A identificação de um menor número de blocos colineares no alinhamento das sequências de DNA de ambos os clones com a sequência do BTA23 na versão Btau_4.6.1 demonstrou que as sequências de DNA de búfalo utilizadas no presente trabalho são mais similares à esta versão de anotação do cromossomo bovino. Este resultado difere do observado com a ferramenta BLASTn, onde a versão UMD_3.1 apresentou uma maior cobertura com as sequências de DNA dos respectivos clones.

Apesar das ferramentas BLASTn e *ProgressiveMAUVE* permitirem análises complementares, uma vez que ambas identificaram regiões de homologia entre as sequências de DNA dos clones e o genoma bovino, os resultados obtidos apresentaram diferenças com relação ao número de fragmentos homólogos observados e o sentido dos alinhamentos desses fragmentos (senso ou anti-senso)

no BTA23 . Estes resultados podem ser explicados pela diferença existente entre os métodos de alinhamento utilizados por cada uma das ferramentas. Na ferramenta BLASTn, a significância dos alinhamentos encontrados é determinada por meio de uma matriz de penalidades, onde são dadas pontuações para as condições de “mismatch” e de “gaps”, sendo o “score” de cada alinhamento determinado pela soma dessas penalidades. Já a ferramenta *ProgressiveMAUVE* pontua com altos valores de “score” as regiões que são conservadas entre as sequências avaliadas, não levando em consideração as penalidades dadas para os “gaps”. Além disso, essa ferramenta utiliza o modelo de análise denominado HHM (do inglês, “Homology Hidden Markov”), o qual rejeita os alinhamentos errôneos de sequências de DNA que não são relacionadas, um viés que pode ser observado no alinhamento de sequências que apresentam diferente composição gênica (DARLING; MAU; PERNA, 2010).

4.3.3. Predição de genes

Com auxílio do programa *GENSCAN*, foram identificados quatro genes na sequência de DNA do clone A/17 e três genes na sequência do clone I/09. Tal programa considera como melhores as predições das sequências de éxons que apresentam valor de “score” superior a 100, moderadas as predições com “score” entre 50 e 100 e como fracas as predições com “score” menor que 50. Para os éxons de todos os genes preditos no presente trabalho foram obtidos valores de “score” considerados moderados.

Os alinhamentos das sequências codificantes (CDs) e de aminoácidos preditas para os genes relativos à sequência de DNA do clone A/17, realizados com os bancos de dados referência de RNAs (*RefSeq RNA*) e de proteínas (*RefSeq Protein*) do genoma bovino, respectivamente, resultaram na identificação dos seguintes genes preditos: H2B (*Histone H2B-like*), BoLA-DMB (*Major histocompatibility complex, class II, DM beta*), BoLA-DMA (*Major histocompatibility complex, class II, DM alpha*) e BRD2 (*Bromodomain containing 2*). Estes quatro genes preditos apresentaram uma cobertura acima de 75% e identidade superior a

94% com as sequências dos genes correspondentes em bovino, presentes no BTA23.

Nos alinhamentos realizados com as sequências codificantes (CDs) e de aminoácidos dos genes preditos para o clone I/09 foram identificados os seguintes genes: VPS52 (*Vacuolar protein sorting 52 homolog – S. cerevisiae*), HTATSF1 (*HIV-1 Tat specific factor 1*) e DGKE (*Diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa*).

A sequência do gene predito VPS52 apresentou 100% de cobertura e 99% de identidade com a sequência do gene correspondente no BTA23. Já a sequência do gene predito DGKE apresentou uma cobertura de 11% e identidade de 83% com o gene correspondente em bovino, o qual se encontra anotado no BTA19. Devido à baixa cobertura apresentada foi possível inferir que a sequência de DNA do gene predito pelo programa *GENSCAN* não corresponde ao gene DGKE em bovino. Já o gene predito HTATSF1 apresentou uma cobertura de 84% e identidade de 78% com a sequência do gene correspondente em bovino, porém esse gene encontra-se anotado no BTAX. A predição deste gene para a sequência de DNA do clone I/09 não está de acordo com o resultado esperado, uma vez que a região MHC de bovino encontra-se localizada no cromossomo BTA23.

A construção de mapas de alta resolução para todos os cromossomos do genoma bubalino permitiu o mapeamento de cerca de 3.000 marcadores, os quais tiveram suas posições determinadas em cromossomos homólogos quando comparados com o genoma bovino (AMARAL et al., 2008). Com base neste estudo e nos resultados obtidos na predição das sequências dos genes DGKE e HTATSF, é possível inferir que as sequências dos genes preditos sejam sequências de genes exclusivos do genoma bubalino ou sequências gênicas que ainda não tenham sido anotadas no genoma bovino. Além disso, não pode ser descartada a ocorrência de erros na predição gênica realizada pelo programa *GENSCAN*.

O alinhamento da sequência de aminoácidos predita para o gene H2B com o banco referência de proteínas de bovino (*RefSeq Protein*), utilizando a ferramenta BLASTp, apresentou 100% de cobertura, 94% de identidade, “score” de 235, com “e-value” de $7e^{-80}$. Neste alinhamento foram identificadas oito substituições de aminoácidos entre a sequência de bovino e a sequência de aminoácidos predita para búfalo, onde nenhum “gap” foi identificado.

Os resultados obtidos com o alinhamento da sequência de aminoácidos predita para o gene DMB em búfalo com o banco de dados referência de proteínas em bovino foram de 65% de cobertura, 96% de identidade, “score” de 399, com “e-value” de $6e^{-139}$. Neste caso, foram identificadas nove substituições de aminoácidos entre as sequências alinhadas.

Já os resultados obtidos com o alinhamento da sequência de aminoácidos predita para o gene DMA foram de 89% de cobertura, 90% de identidade, “score” de 452, com “e-value” de $1e^{-160}$. Neste caso, foram identificados 20 “gaps” e 26 substituições de aminoácidos entre as sequências alinhadas.

O alinhamento da sequência de aminoácidos predita para o gene BRD2 com o banco referência de proteínas de bovino apresentou 59% de cobertura, 100% de identidade, “score” de 882, com “e-value” de 0.0. Neste alinhamento não foram identificadas substituições de aminoácidos entre a sequência de bovino e a sequência de aminoácidos predita para búfalo.

Já o alinhamento da sequência de aminoácidos do gene predito VPS52 com o banco de dados referência resultou em 100% de cobertura, 93% de identidade, “score” de 1.358, com “e-value” de 0.0. Neste alinhamento foram identificados 39 “gaps” e 47 substituições de aminoácidos entre as sequências alinhadas.

Embora o *GENSCAN* seja considerado um dos melhores programas de predição gênica *ab initio* (WANG; CHEN; LI, 2004), em alguns casos, a união de éxons de dois genes diferentes ou até mesmo a união da sequência de dois genes para a predição de apenas um éxon, indicam uma limitação apresentada pelo programa (BURGE; KARLIN, 1997). Esta limitação, associada aos resultados obtidos, demonstrou a necessidade da confirmação dos genes preditos.

As sequências de DNA dos genes em bovino correspondentes aos genes preditos para cada um dos clones foram então selecionadas do banco de dados UCSC, onde a versão de anotação Btau_4.6.1 foi utilizada, para a realização do alinhamento com auxílio da ferramenta BLAST2seq.

O alinhamento da sequência do gene H2B bovino com a sequência do clone A/17, apresentou 100% de cobertura, 93% de identidade, “score” de 565, com “e-value” de $2e^{-163}$. Estes resultados indicam que a sequência do gene predito H2B está totalmente representada na sequência de DNA do clone avaliado. Neste

alinhamento foram identificadas 27 substituições de nucleotídeos entre a sequência do gene em bovino e a sequência do gene predito em búfalo, onde nenhum “gap” foi identificado.

O gene H2B em bovino apresenta um tamanho de 381 bp, sendo formado por apenas um éxon de mesmo tamanho. A proteína codificada por este gene, chamada de histona H2B, juntamente com as proteínas H2A, H3 e H4 formam a unidade básica da cromatina, denominada de nucleossomo. As histonas desempenham papel fundamental na regulação da transcrição, na replicação e na estabilidade do cromossomo, uma vez que atuam na compactação da molécula de DNA (UniProt Consortium, 2013). Segundo Childers et al. (2005) a presença deste gene na classe IIb do MHC é uma condição exclusiva dos ruminantes, uma vez que nenhum gene da família das histonas foi identificado na região MHC de outros mamíferos.

O alinhamento da sequência do gene BoLA-DMB bovino com a sequência do clone A/17 apresentou 100% de cobertura, 96% de identidade, “score” de 11.174, com “e-value” de 0.0. Estes resultados indicam que a sequência do gene predito DMB também encontra-se totalmente representada na sequência de DNA do clone. No alinhamento foram identificados 68 “gaps” e 262 substituições de nucleotídeos entre a sequência de DNA do gene em bovino e a sequência do gene predito em búfalo.

Já os resultados obtidos com o alinhamento da sequência do gene BoLA-DMA bovino com a sequência do clone A/17 foram de 99% de cobertura, 96% de identidade, “score” de 8.338, com “e-value” de 0.0. Neste caso, foram identificados 99 “gaps” e 233 substituições de nucleotídeos entre as sequências alinhadas.

Os genes DMA e DMB já estão mapeados na classe IIb da região MHC de bovino (BALLINGALL et al., 2004) e de bubalino (STAFUZZA et al., 2013). Em bovinos, ambos os genes são formados por seis éxons, onde o gene BoLA-DMB apresenta um tamanho de 6.845 bp e o gene BoLA-DMA é formado por 5.358 bp.

Em humano, as proteínas DMA e DMB realizam a troca dos peptídeos que se ligam às moléculas da classe II com baixa afinidade substituindo-os por peptídeos com maior afinidade, o que resulta na formação de um complexo estável para apresentação dos antígenos às células CD4⁺ (KROPSHOFER et al., 1996). No trabalho realizado por Niimi, Nakai e Aida (1995) sequências de cDNA dos genes

DMA e DMB, obtidas de clones de uma biblioteca genômica de bovino, foram comparadas com as sequências desses genes em humano e em camundongo, além da comparação com as sequências de outros genes da classe II do MHC bovino. Os resultados obtidos revelaram que as sequências dos clones foram mais relacionadas aos genes DM em humanos e em camundongos em comparação com os demais genes da classe II em bovinos, indicando que estes genes podem desempenhar função similar aquela apresentada pelos genes em humanos.

O alinhamento da sequência do gene BRD2 bovino com a sequência de DNA do clone A/17 apresentou 100% de cobertura, 96% de identidade, “score” de 11.638, com “e-value” de 0.0. Foram identificados 116 “gaps” e 311 substituições de nucleotídeos entre as sequências de DNA alinhadas.

Embora o gene BRD2 esteja mapeado na região MHC do genoma de diversos animais, tais como bovinos e caprinos no cromossomo 23, ovinos e equinos no cromossomo 20, suínos no cromossomo 7 e em humanos no cromossomo 6, a proteína codificada por este gene não está relacionada à resposta imune nestes animais. Esta proteína desempenha papel na regulação da transcrição por meio da remodelação da cromatina, se ligando à cromatina hiperacetilada (UniProt Consortium, 2013).

O alinhamento da sequência de DNA do gene VPS52 bovino com a sequência do clone I/09 apresentou 98% de cobertura, 96% de identidade, “score” de 7.620, com “e-value” de 0.0. Foram identificados 198 “gaps” e 741 substituições de nucleotídeos entre as sequências do gene em bovino e a sequência do gene predito em búfalo.

O gene VPS52 recebe a denominação de *vacuolar protein sorting 52* (*S. cerevisiae*) devido à similaridade entre a proteína codificada por este gene e aquela codificada por um gene supressor encontrado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em mamíferos, o gene VPS52 codifica uma proteína constituinte envolvida no sistema de transporte associado ao Complexo de *Golgi*, a qual desempenha um papel na liberação de vacúolos endossomais na membrana celular (HISLOP; MARLEY; VON ZASTROW, 2004).

A Tabela 3 apresenta uma relação dos genes preditos nas sequências de DNA dos clones A/17 e I/09, assim como suas respectivas posições e tamanhos na

sequência do clone e no genoma bovino. Além disso, o número de éxons apresentados por estes genes em boi e em búfalo também estão apresentados nesta Tabela.

Tabela 3. Relação dos genes preditos para as sequências de DNA dos clones A/17 e I/09 e suas respectivas posições e tamanhos na sequência de DNA do clone e no genoma bovino, além do número de éxons apresentados por estes genes em boi e em búfalo.

Símbolo do gene	Posição na sequência de DNA do clone	Posição no genoma bovino	Tamanho em bp		Número de éxons em boi e búfalo
			Búfalo	Boi	
Clone A/17					
H2B	5.561-5.941	7.436.685-7.437.065	380	381	1
BoLA-DMB	56.844-49.998	7.473.054-7.479.898	6.845	6.845	6
BoLA-DMA	71.999-66757	7.490.409-7.495.776	5.133	5.368	6
BRD2	89.941-97.144	7.581.724-7.588.889	7.203	7.166	12
Clone I/09					
VPS52	620-16.528	7.741.440-7.759.424	15.908	17.985	20

Como pode ser observado na Tabela 3, todos os genes preditos para búfalo apresentaram o mesmo número de éxons dos genes em bovino. Os genes H2B, DMA, BRD2 e VPS52 apresentaram diferenças no tamanho das sequências dos genes em búfalo e em bovino, onde o gene H2B apresentou uma diferença de apenas 1 base e o gene VPS52 apresentou a maior diferença observada, sendo de 2.077 bp, onde 94% dessa diferença foi identificada em região de íntron.

A identificação dos éxons nas sequências dos genes preditos para os clones selecionados foi realizada por meio do alinhamento das sequências codificantes dos genes H2B, BoLA-DMB, BoLA-DMA, BRD2 e VPS52 em bovino, selecionadas do banco de dados UCSC, com as sequências de DNA dos respectivos clones. Os resultados obtidos estão representados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Genes preditos para a sequência de DNA do clone A/17 e informações sobre o número e o tamanho dos éxons, e sua respectiva posição na sequência do clone.

Clone A/17							
Gene Predito	Éxon	Tamanho (bp)	Posição do éxon na sequência do clone	Gene Predito	Éxon	Tamanho (bp)	Posição do éxon na sequência do clone
H2B	1	381	5.561-5.941		1	25	89.941-89.966
DMB	1	270	56.844-56.574	BRD2	2	303	91.547-91.850
	2	281	55.154-54.873		3	137	92.458-92.595
	3	284	53.040-52.756		4	138	93.357-93.495
	4	116	51.492-51.376		5	214	93.574-93.788
	5	35	50.973-50.938		6	374	93.882-94.256
	6	598	50.596-49.998		7	128	94.780-94.908
DMA	1	93	71.999-71.906		8	251	95.093-95.344
	2	284	69.709-69.425		9	265	95.460-95.725
	3	278	68.010-67.732		10	304	96.242-96.546
	4	128	67.520-67.392		11	122	96.779-96.901
	5	165	67.032-66.867		12	136	97.008-97.144
	6	95	66.852-66.757				

Quadro 2. Gene predito para a sequência de DNA do clone I/09 e informações sobre o número e o tamanho dos éxons, e sua respectiva posição na sequência do clone.

Clone I/09							
Gene Predito	Éxon	Tamanho (bp)	Posição do éxon na sequência do clone	Gene Predito	Éxon	Tamanho (bp)	Posição do éxon na sequência do clone
VPS52	1	290	620-910	VPS52	11	133	5.090-5.223
	2	120	1.931-2.051		12	155	5.647-5.802
	3	52	2.168-2.220		13	118	6.278-6.396
	4	75	2.397-2.472		14	123	6.562-6.685
	5	67	2.666-2.733		15	95	6.961-7.056
	6	175	3.024-3.199		16	107	7.152-7.259
	7	150	3.802-3.952		17	65	7.483-7.548
	8	100	4.240-4.340		18	51	15.197-15.248
	9	132	4.414-4.546		19	118	15.466-15.584
	10	57	4.671-4.728		20	704	15.824-16.528

Com base nas posições dos éxons preditos obtidas com os alinhamentos realizados com a ferramenta BLAST2seq, o tamanho e a posição dos íntrons para cada um dos genes puderam ser determinados. Os resultados obtidos para a sequência dos clones A/17 e I/09 estão representados nos Quadros 3 e 4, respectivamente.

Quadro 3. Genes preditos para a sequência de DNA do clone A/17 e informações sobre o número e o tamanho dos íntrons, e sua respectiva posição na sequência do clone.

Clone A/17							
Gene Predito	Íntron	Tamanho (bp)	Posição na sequência do clone	Gene Predito	Íntron	Tamanho (bp)	Posição na sequência do clone
DMB	1	1.420	56.573-55.155	BRD2	1	1.579	89.967-91.546
	2	1.833	54.872-53.041		2	606	91.851-92.457
	3	1.264	52.755-51.493		3	762	92.596-93.356
	4	403	51.375-50.974		4	77	93.496-93.573
	5	342	50.937-50.597		5	92	93.789-93.881
DMA	1	2.197	71.905-69.710		6	522	94.257-94.779
	2	1.415	69.424-68.011		7	183	94.909-95.092
	3	212	67.731-67.521		8	114	95.345-95.459
	4	360	67.391-67.033		9	515	95.726-96.241
	5	15	66.866-66.853		10	231	96.547-96.778
					11	105	96.902-97.007

Quadro 4. Gene predito para a sequência de DNA do clone I/09 e informações sobre o número e o tamanho dos íntrons, e sua respectiva posição na sequência do clone.

Clone I/09							
Gene Predito	Íntron	Tamanho (bp)	Posição na sequência do clone	Gene Predito	Íntron	Tamanho (bp)	Posição na sequência do clone
VPS52	1	1.019	911-1.930	VPS52	11	422	5.224-5.646
	2	151	2.016-2.167		12	474	5.803-6.277
	3	175	2.221-2.396		13	164	6.397-6.561
	4	192	2.473-2.665		14	274	6.686-6.960
	5	289	2.734-3.023		15	94	7.057-7.151
	6	601	3.200-3.801		16	222	7.260-7.482
	7	286	3.953-4.239		17	7.647	7.549-15.196
	8	90	4.341-4.413		18	216	15.249-15.465
	9	123	4.547-4.670		19	238	15.585-15.823
	10	360	4.729-5.089				

4.3.4. Identificação de sequências repetitivas

- Elementos transponíveis

Os resultados obtidos com o programa *RepeatMasker* permitiram identificar que 49,3% da sequência de DNA do clone A/17 é composta por elementos transponíveis, onde os elementos de classe I foram mais representativos, sendo o número de retrotransposons não-LTR superior ao número de retrotransposons LTR. Dentre os elementos retrotransposons não-LTR foi observado que 19,76% e 12,5% da sequência de DNA do clone A/17 são representados por elementos do tipo LINE e SINE, respectivamente.

Os resultados obtidos com a sequência de DNA do clone I/09 mostraram que os elementos transponíveis representam 46,6% da sequência de DNA desse clone. Assim como foi observado para o clone A/17, as sequências da classe I foram mais representativas, sendo o número de retrotransposons não-LTR superior ao número de retrotransposons LTR, onde a quantidade de elementos do tipo LINE (29,76%) foi superior àquela observada para os elementos do tipo SINE, que representaram 14,05% da sequência de DNA desse clone. A Tabela 4 apresenta o tamanho (bp) e a porcentagem da sequência de DNA representados por cada uma das classes de elementos transponíveis identificadas nas análises dos respectivos clones.

Tabela 4. Classes de elementos transponíveis identificadas com auxílio do programa *RepeatMasker* nas sequências dos clones A/17 e I/09, assim como o tamanho da sequência dos clones representada por estes elementos em pares de base (bp) e em porcentagem (%).

Classes de elementos transponíveis	Clone A/17 (117.211 bp)		Clone I/09 (42.891 bp)	
	Tamanho da sequência (bp)	(%)	Tamanho da sequência (bp)	(%)
Transposon	5.113	2,88	1.078	2,15
Retrotransposon LTR	7.385	6,30	140	0,33
Retrotransposon não-LTR	45.305	32,26	18.790	43,81
SINE	22.139	12,50	6.026	14,05
LINE	23.166	19,76	12.764	29,76

Segundo Makalowski (2001), os elementos transponíveis do tipo retrotransposons não-LTR são encontrados em maior número no genoma dos mamíferos, com destaque para os elementos do tipo SINE e LINE. Estes resultados estão de acordo com o observado no presente trabalho onde para ambos os clones o número de elementos de classe I foi maior. O mesmo padrão pode ser observado

nos genomas humano (MAKALOWSKI, 2001) e bovino (ALMEIDA et al., 2007; ADELSON; RAISON; EDGAR, 2009), onde os retrotransposons encontram-se representados em maior número que os transposons. Segundo dados da literatura 46,5% do genoma bovino são representados por elementos transponíveis de ambas as classes (ADELSON; RAISON; EDGAR, 2009).

Foram identificados elementos transponíveis inseridos nas sequências de todos os genes preditos no presente trabalho, tanto para o clone A/17 quanto para o clone I/09. Contudo, todos os elementos foram identificados em regiões de íntron dos respectivos genes preditos.

Diversos estudos têm demonstrado a contribuição dos elementos transponíveis na estrutura, função e expressão dos genes hospedeiros (GANKO et al., 2006; OLIVER; GREENE, 2009). Como estes elementos contêm componentes regulatórios, como sequências promotoras e acentuadoras, eles podem influenciar não só a própria atividade, mas também a expressão de genes adjacentes (DUNN et al., 2006). Quando inseridos em regiões de éxons, os elementos transponíveis podem influenciar a expressão gênica fornecendo sítios de “splicing” alternativo (DAVIS et al., 1998). Por outro lado, quando inseridos em regiões de íntrons, tais elementos podem promover novos sítios de poliadenilação (MAGER et al., 1999). A presença de um elemento transponível pode ainda modificar a função de um gene, levando ao processo conhecido como domesticação ou exaptação, caso esta mudança seja adaptativa e conservada (MILLER; MCDONALD; PINSKER, 1997; BRANDT et al., 2005).

- Pequenos RNAs

Foram identificados 28 pequenos RNAs na sequência do clone A/17, onde apenas um pequeno RNA nuclear (snRNA) foi encontrado. As demais sequências de RNAs identificadas foram todas do tipo RNA transportador (tRNA).

Para a sequência do clone I/09 foram identificados 15 tRNAs e não foram identificados snRNA.

- Repetições em “tandem”

Foram identificadas 30 repetições em “tandem” para a sequência do clone A/17, onde cinco repetições foram identificadas em região de éxon nos genes preditos DMB, DMA e BRD2, e quatro repetições foram identificadas em região de íntron nos genes preditos DMA e BRD2. As demais repetições foram identificadas em região intergênica.

No gene predito DMB foi identificada uma repetição em “tandem” (GAAGT)_n no éxon 1. Já na sequência do gene predito DMA foram identificadas as repetições em “tandem” (GCA)_n e (CA)_n nos éxons 1 e 5, respectivamente, e as repetições (CCAGA)_n e (CA)_n nos íntrons 2 e 5, respectivamente. O gene predito BRD2 apresentou as repetições em “tandem” (GAG)_n e (CTC)_n nos éxons 8 e 12, respectivamente, e as repetições (TG)_n e (TGTTT)_n nos íntrons 3 e 9, respectivamente.

Os resultados obtidos com auxílio do programa *RepeatMasker* indicaram a presença de 11 repetições em “tandem” na sequência de DNA do clone I/09, onde todas foram identificadas em região de íntron.

5. CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi realizada uma caracterização preliminar de clones contendo marcadores da classe IIb da região MHC de búfalo, possibilitando a realização de análises relacionadas a estrutura e a organização dessa região do genoma bubalino, o que contribuirá sobremaneira para o entendimento dos processos regulatórios responsáveis pela atuação dos genes do MHC no sistema imune e na reprodução de búfalos. Assim, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- ao realizar os alinhamentos das sequências de DNA dos clones A/17 e I/09 com as duas versões de anotação do BTA23 (UMD_3.1 e Btau_4.6.1) foi observado que as sequências de DNA de ambos os clones apresentam uma maior cobertura quando alinhadas com a versão UMD_3.1 do que com a versão Btau_4.6.1, evidenciando as diferenças existentes entre as duas versões de anotação da região MHC no genoma bovino;

- foram preditos quatro genes para a sequência de DNA do clone A/17 (H2B, DMB, DMA e BRD2) e um gene para a sequência de DNA do clone I/09 (VPS52);

- os alinhamentos com as sequências dos genes H2B, DMB, DMA, BRD2 e VPS52 de bovino com as sequências de DNA dos respectivos clones, evidenciaram a presença de “gaps” e substituições de nucleotídeos entre as sequências alinhadas, indicando diferenças na estrutura desses genes, as quais podem ser responsáveis por diferenças existentes entre a sequência de aminoácidos nas duas espécies;

- os resultados obtidos na identificação de elementos transponíveis estão de acordo com os descritos na literatura para outros mamíferos, como por exemplo, bovino e humano, onde os elementos transponíveis do tipo retrotransposons não-LTR (SINEs e LINEs) apresentaram-se em maior número que os demais tipos de elementos repetitivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADELSON, D.L.; RAISON, J.M.; EDGAR, R.C. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12855-12860, 2009.

AGUIAR, D.M. A sanidade animal e as zoonoses em sistemas de agricultura familiar: um breve comentário. **Pesquisa e Tecnologia – APTA Regional**, v. 4, 2007.

ALMEIDA, L.M.; SILVA, I.T.; SILVA JR, W.A.; CASTRO, J.P.; RIGGS, P.K.; CARARETO, C.M.; AMARAL, M.E.J. The contribution of transposable elements to *Bos taurus* gene structure. **Gene**, v. 390, p. 180-189, 2007.

AMARAL, M.E.J.; GRANT, J.R.; RIGGS, P.K.; STAFUZZA, N.B.; RODRIGUES-FILHO, E.A.; GOLDAMMER, T.; WEIKARD, R.; BRUNNER, R.M.; KOCHAN, K.J.; GRECO, A.J.; JEONG, J.; CAI, Z.; LIN, G.; PRASAD, A.; KUMAR, S.; SARADHI, G.P.; MATHEW, B.; KUMAR, M.A.; MIZIARA, M.N.; MARIANI, P.; CAETANO, A.R.; GALVÃO, S.R.; TANTIA, M.S.; VIJH, R.K.; MISHRA, B.; KUMAR, S.T.B.; PELAI, V.A.; SANTANA, A.M.; FORNITANO, L.C.; JONES, B.C.; TONHATI, H.; MOORE, S.; STOTHARD, P.; WOMACK, J.E. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.

ANDERSON, S.I.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; GORICK, B.; ARCHIBALD, A.L. A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 811-814, 2000.

APANIUS, V.; PENN, D.; SLEV, P.R.; RUFF, L.R.; POTTS, W.K. The nature of selection on the major histocompatibility complex. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 179-224, 1997.

ARAVINDAKSHAN, T.V.; NAINAR, A.M.; SIVASELVAM, S.N. Polymorphism in exon 2 of the BuLA-DRB3 gene in Indian buffalo (*Bubalus bubalis* var. *indicus*) detected by PCR-RFLP. **Animal Science**, v. 70, p. 221-226, 2000.

BAINBRIDGE, D.R.J. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 67-74, 2000.

BALLINGALL, K.T.; ELLIS, S.A.; MACHUGH, N.D.; ARCHIBALD, S.D.; MCKEEVER, D.J. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. **Immunogenetics**, v. 55, p. 748-755, 2004.

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 98-103, 2009.

BEHL, J.D.; VERMA, N.K.; TYAGI, N.; MISHRA, P.; BEHL, R.; JOSHI, B.L. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. **ISRN Veterinary Science**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

*Normas do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal - FCAV-UNESP

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: Janeiro de 2014.

BOEHM, T.; BLEUL, C.C.; SCHORPP, M. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. **Immunological Reviews**, v. 195, p. 15-27, 2003.

BRANDT, J.; SCHRAUTH, S.; VEITH, A.; FROSCHAUER, A.; HANEKE, T.; SCHULTHEIS, C.; GESSLER, M.; LEIMEISTER, C.; VOLFF, J.N. Transposable elements as a source of genetic innovation: expression and evolution of a family of retrotransposon-derived neogenes in mammals. **Gene**, v. 345, p. 101-111, 2005.

BRINKMEYER-LANGFORD, C.L.; CHILDERS, C.P.; FRITZ, K.L.; GUSTAFSON-SEABURY, A.L.; COTHRAN, M.; RAUDSEPP, T.; WOMACK, J.E.; SKOW, L.C. A high resolution RH map of the bovine major histocompatibility complex. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

BUITKAMP, J.; KOLLERS, S.; DURSTEWITZ, G.; FRIES, R.; WELZEL, K.; SCHAFER, K.; KELLERMANN, A.; LEHRACH, H. Construction and characterization of a gridded cattle BAC library. **Animal Genetics**, v. 31, p. 347-351, 2000.

BURGE, C.; KARLIN, S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 268, p. 78-94, 1997.

CAI, L.; TAYLOR, J.F.; WING, R.A.; GALLAGHER, D.S.; WOO, S.S.; DAVIS, S.K. Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. **Genomics**, v. 29, p. 413-425, 1995.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 735-744, 2010.

CHEN, R.; SODERGEN, E.; WEINSTOCK, G.M.; GIBBS, R.A. Dynamic building of a BAC clone tiling path for the Rat Genome Sequencing Project. **Genome Research**, v. 14, p. 679-684, 2004.

CHILDERS, C.P.; NEWKIRK, H.L.; HONEYCUTT, D.A.; RAMLACHAN, N.; MUZNEY, D.M.; SODERGREN, E.; GIBBS, R.A.; WEINSTOCK, G.M.; WOMACK, J.E.; SKOW, L.C. Comparative analysis of the bovine MHC class IIb sequence identifies inversion breakpoints and three unexpected genes. **Animal Genetics**, v. 37, p. 121-129, 2005.

DARLING, A.E.; MAU, B.; PERNA, N.T. progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. **PLOS ONE**, v. 5, p. 1-17, 2010.

DAVIS, M.B.; DIETZ, J.; STANDIFORD, D.M.; EMERSON JR, C.P. Transposable element insertions respecify alternative exon splicing in three *Drosophila* myosin heavy chain mutants. **Genetics**, v. 150, p. 1105-1114, 1998.

DE, S.; SINGH, R.K.; BRAHMA, B. Allelic diversity of Major Histocompatibility Complex class II DRB gene in Indian cattle and buffalo. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

DE, S.; SINGH, R.K.; BUTCHIAIAH, G. MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 33, p. 215-219, 2002.

DONALDSON, W.L.; ZHANG, C.H.; ORIOL, J.G.; ANTCZAK, D.F. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I Major Histocompatibility Complex antigens. **Development**, v. 110, p. 63-71, 1990.

DUNN, C.A.; ROMANISH, M.; GUTIERREZ, L.E.; VAN LAGEMAAT, L.N.; MAGER, D.L. Transcription of two genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. **Gene**, v. 366, p. 335-342, 2006.

EGGEN, A.; GAUTIER, M.; BILLAUT, A.; PETIT, E.; HAYES, H.; LAURENT, P.; URBAN, C.; PFISTER-GENSKOW, M.; EILERTSEN, K.; BISHOP, M.D. Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. **Genetics Selection Evolution**, v. 33, p. 543-548, 2001.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Criação de bovinos de corte no estado do Pará, 2006. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCortePara/paginas/manejo_san.html. Acesso em: Outubro de 2013.

FAHRENKRUG, S.C.; ROHRER, G.A.; FREKING, B.A.; SMITH, T.P.L.; OSOEGAWA, K.; SHU, C.L.; CATANESE, J.J.; PIETER, J.J. A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 472-474, 2001.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Faostat agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>. Acesso em: Outubro de 2013.

FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; TORO, M.J.U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 04, p. 19-28, 2010.

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.

FRISCH, J.E. Changes occurring in cattle as a consequence of selection for growth rate in a stressful environment. **The Journal of Agricultural Science**, v.96, 23-38, 1981.

FUJISAKI, S.; MIZOGUCHI, Y.; TAKAHASHI, S.; CHEN, Y.Z.; SUZUKI, K.; ASAKAWA, S.; SOEDA, E.; SHIMIZU, N.; SUGIMOTO, Y.; YASUE, H. Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle. **Animal Genetics**, v. 33, p. 379-381, 2002.

GANKO, E.W. LTR retrotransposon-gene associations in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 62, p. 111-120, 2006.

GILL, C.A.; DAVIS, S.K.; TAYLOR, J.F.; COCKETT, N.E.; BOTTEMA, C.D.K. Construction and characterization of an ovine bacterial artificial chromosome library. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 1108-1111, 1999.

GODARD, S.; SCHIBLER, L.; OUSTRY, A.; CRIBIU, E.P.; GUÉRIN, G. Construction of a horse BAC library and cytogenetical assignment of 20 type I and II markers. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 633-637, 1998.

GOGOLIN-EWENS, K.J.; LEE, C.S.; MERCER, W.R.; BRANDON, M.R. Site-directed differences in the immune response to the fetus. **Immunology**, v. 66, p. 312-317, 1989.

GUSTAFSON, A.L.; TALLMADGE, R.L.; RAMLACHAN, N.; MILLER, D.; BIRD, H.; ANTCHAK, D.F.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.P.; SKOW, L.C. An ordered BAC contig map of the equine major histocompatibility complex. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 189-195, 2003.

HEDRICK, P.W. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. **Evolution**, v. 56, p. 1902-1908, 2002.

HESS, M.; GOLDAMMER, T.; GELHAUS, A.; RIED, K.; RAPPOLD, G.; EGGEN, A.; BISHOP, M.D.; SCHEWERIN, M.; HORSTMANN, R.D. Physical assignment of the bovine MHC class IIa and class IIb genes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 85, p. 244-247, 1999.

HOU, Y.; LIU, G.E.; BICKHART, D.M.; CARDONE, M.F.; WANG, K.; KIM, E.; MATUKUMALLI, L.K.; VENTURA, M.; SONG, J.; VANRADEN, P.M.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P. Genomic characteristics of cattle copy number variations. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

HUANG, Y.; ZHANG, L. Rapid and sensitive dot-matrix methods for genome analysis. **Bioinformatics**, v.20, p. 460-466, 2004.

IANNUZZI, L.; GALLAGHER, D.S.; WOMACK, J.E.; DI MEO, G.P.; SKOW, L.C.; FERRARA, L. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex in cattle and river buffalo by fluorescent in situ hybridization. **Heredity**, v. 118, p. 187-190, 1993.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab11.pdf. Acesso em: Outubro de 2013.

HISLOP, J.N.; MARLEY, A.; VON ZASTROW, M. Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 22522-22531, 2004.

JEON, J.T.; PARK, E.W.; JEON, H.J.; KIM, T.H.; LEE, K.T.; CHEONG, I.C. A large-insert porcine library with sevenfold genome coverage: a tool for positional cloning of candidate genes for the major quantitative traits. **Molecules and Cells**, v. 16, p. 113-116, 2003.

JOHNSON, R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **Journal of Animal Science**, v. 75, 1244-1255, 1997.

JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase Upbase, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 462-467, 2005.

KAMBOUR, A.; HO, H.N.; MISRA, D.N.; MACPHERSON, T.A.; KUNZ, H.W.; GIL III, T.J. Differential expression of MHC class I antigens on the placenta of the rat. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p. 1861-1882, 1987.

KIM, U.J.; BIRREN, B.W.; SLEPAK, T.; MANCINO, V.; BOYSEN, C.; KANG, H.L.; SIMON, M.I.; SHIZUYA, H. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. **Genomics**, v. 34, p. 213-218, 1996.

KLEIN, J.; BRONTOP, R.E.; DAWKINS, R.L.; ERLICH, H.A.; GYLLENSTEN U.B.; HEISE, E.R.; JONES, P.P.; PARHAM, P.; WAKELAND, E.K.; WATKINS, D.I. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. **Immunogenetics**, v. 31, p. 217-219, 1990.

KROPSHOFER, H.; VOGT, A.B.; MOLDENHAUER, G.; HAMMER, J.; BLUM, J.S.; HÄMMERLING, G.J. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 6144-6154, 1996.

KRZYWINSKI, M.; WALLIS, J.; GOSELE, C.; BOSDET, I.; CHIU, R.; GRAVES, T.; HUMMEL, O.; LAYMAN, D.; MATHEWSON, C.; WYE, N.; ZHU, B.; ALBRACHT, D.; ASANO, J.; BARBER, S.; BROWN-JOHN, M.; CHAN, S.; CHAND, S.; CLOUTIER, A.; DAVITO, J.; FJELL, C.; GAIGE, T.; GANTEN, D.; GIRN, N.; GUGGENHEIMER, K.; HIMMELBAUER, H.; KREITLER, T.; LEACH, S.; LEE, D.; LEHRACH, H.; MAYO, M.; MEAD, K.; OLSON, T.; PANDOH, P.; PRABHU, A.L.; SHIN, H.; TANZER, S.; THOMPSON, J.; TSAI, M.; WALKER, J.; YANG, G.; SEKHON, M.; HILLIER, L.; ZIMDAHL, H.; MARZIALI, A.; OSOEGAWA, K.; ZHAO, S.; SIDDIQUI, A.; JONG, P.J.; WARREN, W.; MARDIS, E.; MCPHERSON, J.D.; WILSON, R.; HUBNER, N.; JONES, S.; MARRA, M.; SCHEIN, J. Integrated and sequence-ordered BAC- and YAC-based physical maps for the Rat Genome. **Genome Research**, v. 14, p. 766-779, 2004.

KUMAR, S.; SANGWAN, M.L.; AHLAWAT, S.; BARWAR, A. Polymorphism in DRB3 exon 2 by PCR-RFLP and its association with mastitis in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 232-234, 2011.

KUMAR, S.; SANGWAN, M.L.; RUPENDER. Polymorphism in DRB3 exon 2 by PCR-RFLP and association with mastitis in Nili-Ravi breed. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 398-400, 2008.

LARRUSKAIN, A.; MINGUIJÓN, E.; GARCÍA-ETXEBARRIA, K.; MORENO, B.; AROSTEGUI, I.; JUSTE, R.A.; JUGO, B.M. MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. **Immunogenetics**, v. 62, p. 75-83, 2010.

LEINDERS-ZUFALL, T.; BRENNAN, P.; WIDMAYER, P.; CHANDRAMANI, P.; MAUL-PAVICIC, A.; JAGER, M.; LI, X.M.; BREER, H.; ZUFALL, F.; BOEHM, T. MHC class I peptides an chemosensory signals in the vomeronasal organ. **Science**, v. 306, p. 1033-1037, 2004.

LEITE, R.C.; BASTIANETTO, E. Doenças infecciosas em búfalos. **Revistas UFG**, p. 1-11, 2009.

LIU, L.; YIN, J.; LI, W.; LIU, K.; PENG, Y.; TAN, P.; MA, R. Construction of a bacterial artificial chromosome library for the Rongchang pig breed and its use for the identification of genes involved in intramuscular fat deposition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, p. 1280-1284, 2010.

LUNNEY, J.K.; HO, C.S.; WYSOCKI, M.; SMITH, D.M. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 362-374, 2009.

MAGER, D.L.; HUNTER, D.G.; SCHERTZER, M.; FREEMAN, J.D. Endogenous retroviruses provide the primary polyadenization signal for two human genes (HHLA2 and HHLA3). **Genomics**, v. 59, p. 255-263, 1999.

MAKALOWSKI, W. The human genome structure and organization. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 578-598, 2001.

MAILLARD, J.C.; BERTHIER, D.; CHANTAL, I.; THEVENON, S.; SIDIBÉ, I.; STACHURSKI, F.; BELMSAGA, D.; RAZAFINDRAIBÉ, H.; ELSEN, J.M. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. **Genetics Selection Evolution**, v. 35, p. 193-200, 2003.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Sanidade Animal, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>. Acesso em Outubro de 2013.

MHC SEQUENCING CONSORTIUM. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, v. 401, p. 921-923, 1999.

MIHAIU, R.; MIHAIU, M.; PINTEA, A.; BELE, C.; LAPUSAN, A.; DAN, S.D.; TAULESCU, C.; CIUPA, A. Comparative study on the fat acids profile from buffalo milk as quality and traceability markers. **Veterinary Medicine**, v. 67, p. 161-165, 2010.

MILLER, W.J.; MCDONALD, J.F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, v. 100, p. 261-270, 1997,

NCBI. **National Center for Biotechnonoly Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Outubro de 2013.

NAKAMURA, K.; HASHIZUME, E.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, Y.; MALA, S.; YAMANE, K. Small cytoplasmatic RNA (scRNA) gene from *Clostridium perfringers* can replace the gene for the *Bacillus subtilis* scRNA in both growth and sporulation. **Microbiology**, v. 141, p. 2965-2975, 1995.

NIIMI, M.; NAKAI, Y.; AIDA, Y. Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 217, p. 522-528, 1995.

NIRANJAN, S.K.; SITANGSU, M.D.; KUMAR, S.; MITRA, A.; SHARMA, A.; SAKARAM, D.; NASKAR, S.; SHARMA, D.; SHARMA, S.R. Allelic diversity at MHC class II DQ loci in buffalo (*Bubalus bubalis*): Evidence for duplication. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, p. 206-212, 2010.

OLIVER, K.R.; GREENE, W.K. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. **BioEssays**, v. 31, p. 703-714, 2009.

OMIA. **Online Mendelian Inheritance in Animals**. Disponível em: <http://omia.angis.org.au/>. Acesso em: Janeiro de 2014.

PENN, D.J. Major Histocompatibility Complex (MHC). **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-7, 2002.

PENN, D.J.; POTTS, W.K. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. **The American Naturalist**, v. 153, p. 146-164, 1999.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; GRÖHN, Y.T.; MCCULLOCH, C.E.; GUARD, C.L. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1213-1220, 1999.

RAMSOONDAR, J.J.; CHRISTOPHERSON, R.J.; GUILBERT, L.J.; DIXON, W.T.; GHAHARY, A.; ELLIS, S.; WEGMANN, T.G.; PIEDRAHITA, J.A. Lack of class I major histocompatibility antigens on trophoblast of periimplantation blastocysts and term placenta in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 387-397, 1999.

RANJHAN, S.K. Safety and quality aspects of buffalo meat and meat products. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 22, p. 365-370, 2012.

REDMAN, C.W.G.; MCMICHAEL, A.J.; STIRRAT, G.M.; SUNDERLAND, C.A.; TING, A. Class I major histocompatibility complex antigens on human extra-villous trophoblast. **Immunology**, v. 52, p. 457-468, 1984.

RENNIE, P.J.; GOWER, D.B.; HOLLAND, K.T.; MALLET, A.I.; WATKINS, W.J. The skin microflora and the formation on human axillary odor. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 12, p. 197-207, 1990.

ROCHE. **GS FLX Titanium System**. Disponível em: <http://454.com/products/gs-flx-system/>. Acesso em: Outubro de 2013.

RODRIGUES-FILHO, E.A.; STAFUZZA, N.B.; CAETANO, A.R.; GILL, C.A.; RIGGS, P.K.; WOMACK, J.E.; AMARAL, M.E.J. Mapping MHC genes in river buffalo. **Developments in Biologicals**, v. 132, p. 343-346, 2008.

ROGEL-GAILLARD, C.; BOURGEOUX, N.; BILLAULT, A.; VAIMAN, M.; CHARDON, P. Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q.1.1. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 253-255, 2001.

SCHIBLER, L.; VAIMAN, D.; OSTRY, A.; GUINEC, N.; DANGY-CAYE, A.L.; BILLAULT, A.; CRIBIU, E.P. Construction and extensive characterization of a goat Bacterial Artificial Chromosome library with threefold genome coverage. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 119-124, 1998.

SCHWARTZ, S.; ZHANG, Z.; FRAZER, K.A.; SMIT, A.; RIEMER, C.; BOUCK, J.; GIBBS, R.; HARDISON, R.; MILLER, W. PipMaker – A web server for aligning two genomic DNA sequences. **Genome Research**, v. 10, p. 577-586, 2000.

SENA, L.; SCHNEIDER, M.P.C.; BREING, B.; HONEYCUTT, R.L.; WOMACK, J.E.; SKOW, L.C. Polymorphisms in MHC-DRA and -DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Animal Genetics**, v. 34, p. 1-10, 2003.

SENA, L.; SCHNEIDER, M.P.C.; BREING, B.B.; HONEYCUTT, R.L.; HONEYCUTT, D.A.; WOMACK, J.E.; SKOW, L.C. Polymorphism and gene organization of water buffalo MHC-DQB genes show homology to the BoLA DQB region. **Animal Genetics**, p. 1-8, 2011.

SHEIKHMOHAMMADI, R.; HASHEMI, A.; MARDANI, K. Analysis of polymorphism of MHC class II BuLA DRB3 exon 2 gene in North West Iranian populations of the Water buffalo (*Bubalus bubalis*) through PCR-SSCP. **International Journal of Veterinary Research**, v. 4, p.265-268, 2010.

SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3763-3774, 1991.

SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; KIM, U.J.; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIIRI, Y.; SIMON, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **PNAS**, v. 89, p. 8794-8797, 1992.

SPEHR, M.; KELLIHER, K.R.; LI, X.H.; BOEHM, T.; LEINDERS-ZUFALL, T.; ZUFALL, F. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 1961-1970, 2006.

STAFUZZA, N.B.; ABBEY, C.A.; GILL, C.A.; WOMACK, J.E.; AMARAL, M.E.J. Construction and preliminary characterization of a river buffalo bacterial artificial chromosome library. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 3013-3019, 2012.

STAFUZZA, N.B.; GRECO, A.J.; GRANT, J.R.; ABBEY, C.A.; GILL, C.A.; RAUDSEPP, T.; SKOW, L.C.; WOMACK, J.E.; RIGGS, P.K.; AMARAL, M.E.J. A high-resolution radiation hybrid map of the river buffalo major histocompatibility complex and comparison with BoLA. **Animal Genetics**, v.44, p. 369-376, 2013.

SUMATHI, S.; KARTHICKEYAN, S.M.K.; SIVASELVAM, S.N.; RAHUMATHULLA, P.S. Molecular typing and mapping of MHC class II-DRB3 gene in Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 557-560, 2010.

SUMIYAMA, K.; RUDDLE, F.H. Regulation of Dlx3 gene expression in visceral arches by evolutionarily conserved enhancer elements. **PNAS**, v. 100, p. 4030-4034, 2003.

SUZUKI, K.; ASAKAWA, S.; IIDA, M.; SHIMANUKI, S.; FUJISHIMA, N.; HIRAIWA, H.; MURAKAMI, Y.; SHIMIZU, N.; YASUE, H. Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. **Animal Genetics**, v. 31, p. 8-12, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, D.; MURIEL, P.; RUSSELL, D.; OSBORNE, P.; BROMLEY, A.; ROWLAND, M.; CREIGH-TYTE, S.; BROWN, C. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. **Scientific and Technical Review**, v. 3, p. 675-678, 2002.

THORNTON, P.K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 365, p. 2853-2867, 2010.

UCSC Genome Bioinformatics – University of California Santa Cruz. Disponível em <http://genome.ucsc.edu/>. Acesso em: Janeiro de 2014.

UniProt Consortium 2013. Disponível em <http://www.uniprot.org/>. Acesso: Janeiro de 2014.

VAIMAN, D.; BILLAULT, A.; TABET-AOUL, K.; SCHIBLER, L.; VILETTE, D.; OUSTRY-VAIMAN, A.; SORAVITO, C.; CRIBIU, E.P. Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 585-587, 1999.

VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.; DIJKHOF, R.J.; RUYTER, D.; GIPHART, M.J. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DOA, and DYA. **Immunogenetics**, v. 31, p. 29-36, 1990.

VIEIRA, M.L.C.; VELLO, N.A.; SILVA FILHO, M.C. Genética e Melhoramento Vegetal. In: Genômica (Luís Mir). **Genética e Melhoramento Vegetal**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. p. 679-720.

WAGNER, J.L. Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. **Journal of Heredity**, v. 94, p. 23-26, 2003.

WALDRON, M.R. KULICK, A.E.; BELL, A.W.; OVERTON, T.R. Acute experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related metabolic disorders in early postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 596-610, 2006.

WANG, Z.; CHEN, Y.; LI, Y. A brief review of computational gene prediction methods. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 2, p. 216-221, 2004.

WARREN, W.; SMITH T.P.L.; REXROAD III, C.E.; FAHRENKRUG, S.C.; ALLISON, T.; SHU, C.L.S.; CATANESE, J.; JONG, P.J. Construction and characterization of a new bovine bacterial artificial chromosome library with 10-genome-equivalent coverage. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 662-663, 2000.

WOBST, B.; ZAVAZAVA, N.; LUSZYK, D.; LANGE, K.; USSAT, S.; EGGERT, F.; FERSTL, R.; MÜLLER-RUCHHOLTZ, W. Molecular forms of soluble HLA in body fluids: potential determinants of body odor cues. **Genetica**, v. 104, p. 275-283, 1998.

YANG, J.; FU, Z.; FENG, X.; SHI, Y.; YUAN, C.; LUI, J.; HONG, Y.; LI, H.; LU, K.; LIN, J. Comparison of worm development and host immune responses in natural hosts of *Schistosoma japonicum*, yellow cattle and water buffalo. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

ZHU, B.; SMITH, J.A.; TRACEY, S.M; KONFORTOV, B.A.; WELZEL, K.; SCHALKWYK, L.C.; LEHRACH, H.; KOLLERS, S.; MASABANDA, J.; BUITKAMP, J.; FRIES, R.; WILLIAMS, J.L.; MILLER, J.R. A 5X genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 706-709, 1999.

Apêndice 1 – Soluções citadas no tópico Material e Métodos, utilizadas na seleção dos clones positivos para marcadores do MHC de búfalo.

Cloranfenicol – 12,5 mg/mL

- 0,5 g de cloranfenicol
- completar com etanol absoluto para 40 mL

IPTG 20% (200mg/mL)

- 2 g de IPTG
- completar com água para 10 mL

Meio LB-ágar

- 5 g de bacto triptona
- 2,5 g de extrato de levedura
- 5 g de NaCl
- 7,5 g Agar
- completar com água para 500 mL

Meio LB

- 5 g de bacto triptona
- 2,5 de extrato de levedura
- 5 g de NaCl
- completa com água para 500 mL

Tampão TBE 0,5X

- 44,5 mM de Tris-base
- 44,5 mM de ácido bórico
- 1 mM de EDTA

Tampão TE (Tris-EDTA) pH 8.0

- 10 mM de Tris-HCl
- 1mM EDTA

Xgal 2% (20 mg/mL)

- 200 µL Xgal a 100 mg/mL
- 800 µL de dimetilformamida