

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/02/2020.

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

**POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À CARACTERÍSTICAS DE
LEITE EM BUBALINOS E À MORFOLOGIA ESPERMÁTICA
EM BOVINOS**

Ana Cláudia de Freitas
Zootecnista

2018

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

**POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À CARACTERÍSTICAS DE
LEITE EM BUBALINOS E À MORFOLOGIA ESPERMÁTICA
EM BOVINOS**

Ana Cláudia de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Coorientadora: Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza

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

2018

F866p Freitas, Ana Cláudia de
Polimorfismos associados à características de leite em bubalinos
e à morfologia espermática em bovinos / Ana Cláudia de Freitas. --
Jaboticabal, 2018
iv, 41 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Humberto Tonhati

Coorientadora: Nedenia Bonvino Stafuzza

Banca examinadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima,
Larissa Fernanda Simielli Fonseca Noronha, Marina Mortati Dias
Barbero, Luciana Correia de Almeida Regitano

Bibliografia

1. Espermatozoide. 2. Mastite. 3. Polimorfismo. 4. Reprodução I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082.22

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: POLIMORFISMOS ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS DE LEITE EM BUBALINOS E À MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM BOVINOS

AUTORA: ANA CLÁUDIA DE FREITAS


ORIENTADOR: HUMBERTO TONHATI

COORIENTADORA: NEDENIA BONVINO STAFUZZA

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


Pós-doutoranda NEDENIA BONVINO STAFUZZA
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS ROSSEPIAN DE LIMA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP


Pós-doutoranda LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA NORONHA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. MARINA MORTATI DIAS BARBERO
Departamento de Produção Animal / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CLÁUDIA DE FREITAS - nascida em 8 de março de 1988, na cidade de Araraquara – SP, filha de Cláudio de Freitas e Ana Rita Seno de Freitas. Iniciou em fevereiro de 2007 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal obtendo o título de Zootecnista em fevereiro de 2011. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati. Em agosto de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati, obtendo o título de Mestre em 25 de fevereiro de 2014. Em março de 2014 iniciou o doutorado na mesma instituição e no mesmo programa de pós-graduação, com orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e coorientação da Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza. Atualmente é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e realizou parte do seu doutorado (doutorado sanduíche) na Universidade de Queensland – Austrália, sob orientação da Profa. Dra. Marina R. S. Fortes.

“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

AGRADECIMENTOS

À minha família e principalmente aos meus pais, sempre presentes em minha jornada. Sem eles nada disso faria sentido. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador de tantos anos, Prof. Humberto Tonhati. Obrigada sempre pela oportunidade e ensinamentos. Tenho sorte por ter um amigo e orientador na mesma pessoa.

À minha coorientadora Nedenia, uma das peças principais para que essa pesquisa acontecesse. Obrigada pela paciência, dedicação e pelos conselhos. Você colaborou com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Daniel Jordan, por ter participado do projeto e me ajudado principalmente com as análises estatísticas. Obrigada pelo suporte e ensinamentos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Henrique Nunes, Prof. Fernando Baldi, Dra. Larissa Simielli, Dra. Marina Mortati e aos atuais membros da banca de defesa. As correções e sugestões dadas por vocês serão de grande valor para esse trabalho.

À Dra. Marina Fortes, que tão bem me recebeu na University of Queensland e em sua equipe. Foi uma experiência maravilhosa trabalhar com alguém tão cativante.

Ao Prof. Danísio Prado Munari e à Profa. Lucia Galvão de Albuquerque que tão bem conduzem nosso programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal.

Aos meus amigos de Jaboticabal, em especial Raphael, Mariana, Camila, Thaise e Fernanda. Vocês foram meu suporte nos dias difíceis e conseguiram deixar tudo mais leve.

Ao meu namorado Guilherme e sua família. Sempre atenciosos e carinhosos comigo.

À FAPESP, processo 2014/25309-7 por todos os recursos disponibilizados para a realização desse projeto.

À CAPES pela bolsa de estudos durante todo o meu período de doutorado, no Brasil e no exterior, processo 88881.133033/2016-01.

À FCAV, que tem sido a minha segunda casa desde que iniciei minha graduação em 2007.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
Revisão de literatura	1
Identificação de polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune de búfalas leiteiras por sequenciamento	1
Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para identificar regiões de QTL associadas a características de fertilidade em bovinos de corte	3
Objetivos.....	5
Referências bibliográficas	5
CHAPTER 2 - Polymorphisms in major histocompatibility complex genes and its associations with milk quality in Murrah buffaloes	11
Abstract	11
Background.....	12
Methods	13
Results	18
Discussion.....	25
Conclusions	27
References	27
CHAPTER 3 - Mapping genetic determinants of sperm mid-piece abnormalities in tropical bulls	33
Summary	33
Introduction.....	34
Materials and Methods	34
Results	36
Discussion.....	37
List of References.....	39

POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À CARACTERÍSTICAS DE LEITE EM BUBALINOS E À MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM BOVINOS

RESUMO – O melhoramento genético animal utiliza ferramentas de cunho genômico e molecular a fim de auxiliar na seleção dos animais geneticamente superiores. No presente trabalho foram abordadas duas técnicas distintas para a obtenção de informações sobre características de interesse em bubalinos leiteiros e bovinos de corte. O objetivo do primeiro trabalho, realizado com búfalas da raça Murrah, foi identificar SNP nos genes *DRB2*, *DRB3*, *DMA* e *DMB* do MHC, os quais foram utilizados em estudos de associação com contagem de células somáticas, produção e qualidade do leite. Para tanto, foram utilizados DNA proveniente de 200 animais, que tiveram as regiões alvo dos genes candidatos sequenciadas. Posteriormente, foi feita a identificação dos SNP, cálculo das frequências alélicas e genotípicas, análises de variância dos efeitos dos SNP, bem como o teste do desequilíbrio de ligação. A partir dos resultados encontrados, sugerimos que os haplótipos podem ser utilizados como marcadores moleculares, uma vez que apresentaram associação com as características estudadas. O objetivo do segundo trabalho, realizado com bovinos de corte, foi identificar QTL associados a características de fertilidade de machos, como anormalidades na porção média dos espermatozoides em animais das raças Brahman (n = 1.023) e Composto Tropical (n = 1.648). Após a realização do GWAS, o SNP com maior valor significativo nos animais da raça Brahman foi identificado no gene *AKAP* (cromossomo X), já nos animais do Composto Tropical, o valor com maior associação significativa foi encontrado no SNP posicionado em uma região flanqueada pelos genes *SERINC5* e *GNPNAT1* (cromossomo 10). Os resultados indicam, portanto, que esses são potenciais SNP para auxiliar no melhoramento de características associadas à fertilidade em machos bovinos.

Palavras-chave: Espermatozoide, mastite, reprodução, SNP

POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH MILK TRAITS IN BUFFALOES AND SPERMATIC MORPHOLOGY IN CATTLE

ABSTRACT – Animal genetic improvement uses genomic and molecular tools to aid in the selection of genetically superior animals. In the present study two different techniques were approached to obtain information about characteristics of interest in dairy buffaloes and beef cattle. The objective of the first study with Murrah buffaloes, was to identify SNP in the MHC in *DRB2*, *DRB3*, *DMA* and *DMB* genes, which were verified its association with somatic cell count, milk production and quality. DNA from 200 animals was used, which had the target regions of the candidate genes sequenced. Subsequently, SNP were identified, allele and genotype frequencies were calculated, analyzes of variance of the effects of SNP, as well as the linkage disequilibrium test. From the results found, we suggest that the haplotypes can be used as molecular markers, once they were associated with the traits studied. The objective of the second study was to identify QTL associated with male fertility traits in beef cattle, such as mid-piece abnormalities in the spermatozoa in Brahman (n = 1,023) and Tropical Composites (n = 1,648). After GWAS, the most significant SNP in Brahman was identified in the *AKAP* gene (chromosome X), whereas in the Tropical Composites, the most significant association was found in the SNP positioned in a region flanked by *SERINC5* and *GNPNAT1* genes (chromosome 10). The results therefore indicate that these are potential SNP to assist in the improvement of characteristics associated with fertility in bovine males.

Keywords: *Spermatozoa*, mastitis, reproduction, SNP

Lista de Abreviações

AF: Allele frequency
AGL: Animal Genetics Laboratory
AKAP/ AKAP14: A-kinase-anchoring protein
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
BoLA: Bovine Leukocyte Antigen
BuLA: Buffalo Leukocyte Antigen
CD4 +/ CD8+: Cluster of differentiation antigen 4 or 8
CNV: Copy number variation
dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database
DRB2: DR Beta 2
DRB3: DR Beta 3
DMA: DM Alpha
DMB: DM Beta
DNA: Deoxyribonucleic acid
EGF-HW: Expected and genotype frequencies for the Hardy-Weinberg equilibrium
FCAV: School of Agricultural and Veterinarian Sciences
F%: Fat percentage
FP: Fat production
GWAS: Genome-wide association study
GNPNAT1: Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1
LD: Linkage disequilibrium
MAF: Minor allele frequency
MHC: Major Histocompatibility Complex
MOZ: Mozzarella cheese production
MP: Milk production
MPA: Mid piece abnormality
mRNA: Messenger ribonucleic acid
NK: Natural killer cell
OGF: Observed genotype frequencies
PCR: Polymerase Chain Reaction
P%: Protein percentage
PP: Protein production
PKA: Protein kinase A
QTL: Quantitative trait locus
SERINC5: Serine incorporator 5
SCC: Somatic cell count
SCCt: Somatic cell count in logarithmic scale
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
TBE: Tris-borate-EDTA
TNF: Tumor necrosis factor
UNESP: São Paulo State University
 χ^2 : Chi-square test

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

O estudo de genes candidatos permite a associação de genes de ação biológica conhecida com características de interesse econômico na produção animal, sendo que esses genes estão envolvidos com o desenvolvimento ou processos fisiológicos responsáveis pela expressão dessas características. A abordagem do gene candidato pode proporcionar um entendimento mais direto da base genética das diferenças fenotípicas observadas entre os indivíduos (BRYNE; MCMULLEN, 1996; PAZ et al., 2004; LIU et al., 2008).

O sequenciamento pelo método de Sanger foi descrito em 1975, e desde então tem contribuído para um crescimento importante na área do melhoramento genético animal. Com essa técnica foi possível identificar a sequências dos nucleotídeos do DNA, o que culminou no início do mapeamento genômico dos seres vivos (CARVALHO, 2016). Porém, a rápida evolução e popularização das tecnologias da genética molecular tem permitido acessar e manipular o genoma das espécies de diferentes maneiras. A evolução tecnológica das plataformas de genotipagem com polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP, “Single Nucleotide Polymorphisms”) possibilitou a criação de novas abordagens para investigar os componentes genéticos subjacentes à fenótipos complexos, denominadas estudos de associação genômica ampla (GWAS, “Genome-Wide Association Studies”) (MATOS, 2013; MENEZES et al., 2013). A utilização do GWAS não requer conhecimento prévio profundo sobre os mecanismos fisiológicos da característica desejada, uma vez que polimorfismos espalhados por todo o genoma (SNP) são analisados, os quais são associados com características de interesse, como à suscetibilidade a uma doença ou a maiores ou menores níveis de produção (MENEZES et al., 2013).

Revisão de literatura

Identificação de polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune de búfalas leiteiras por sequenciamento

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC, “Major Histocompatibility Complex”) é caracterizado por um grande conjunto de genes intimamente ligados, que desempenham papel fundamental em processos como resistência/suscetibilidade a doenças infecciosas e resposta imune inata e adaptativa (PENN, 2002).

Em bovinos, o MHC (BoLA, "Bovine Leukocyte Antigen") está localizado no cromossomo 23 e em bubalinos (BuLA, "Buffalo Leukocyte Antigen"), está localizado no braço curto do cromossomo 2 (STAFUZZA et al., 2013). Seus genes estão organizados em três classes distintas, agrupadas de acordo com suas funções: I, II e III (MOSAFER et al., 2012).

Os genes da classe I expressam moléculas responsáveis pela apresentação de peptídeos antígenos aos linfócitos CD8+ por meio de receptores de membrana das células T, os quais destroem as células infectadas (BEHL et al., 2012). Os genes da classe II são expressos exclusivamente nas células que contêm antígenos, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, e têm como função apresentar antígenos extracelulares aos linfócitos CD4+ (DE et al., 2002). As proteínas expressas pelos genes da classe II também degradam peptídeos de patógenos intracelulares nas células T-helpers, como parte de um mecanismo que identifica antígenos externos iniciando a resposta imune (BROWN et al., 1993). No complexo BoLA e BuLA, os genes da classe II de bovídeos encontram-se divididos em duas regiões separadas do cromossomo em vez de um grupamento único de genes, como é visto na maioria dos mamíferos. Essas duas partes são conhecidas como IIa e IIb, com classe IIa intimamente associada com a classe I e regiões de classe III (IANNUZZI et al., 1993; STAFUZZA et al., 2013). Já os genes da classe III do MHC codificam um grupo de proteínas com variadas funções, destacando-se interações com os receptores das células NK ("Natural Killer Cell"), além de codificar os chamados fatores de necrose tumoral (TNF, "Tumour Necrosis Factor") os quais também estão associados à resposta imune, causando a morte de células infectadas pelo processo de apoptose (TROWSDALE, 2002; BEHL et al., 2012).

A classe IIa possui duas sub-regiões, uma composta pelos genes da família DQ (*DQA* e *DQB*) e outra pelos genes da família DR (*DRA* e *DRB*). Os genes DQ são os responsáveis por codificar moléculas que tornam as células CD4+ aptas para o reconhecimento de patógenos (NORIMINE; BROWN, 2005). Em bovinos é observada uma variedade no número de loci DQ entre os indivíduos devido a um processo de duplicação gênica, gerando um nível de complexidade adicional a essa região do sistema imune (ANDERSSON; RASK, 1988; SCOTT et al., 1991; BEHL et al., 2012).

A sub-região composta pelos genes DR é a mais amplamente estudada devido sua importância funcional, apresentando um grande número de polimorfismos identificados (DONGXIAO; YUAN, 2003). Em bovinos, o gene *DRA* possui apenas um

alelo que codifica a cadeia α da molécula DR, ou seja, trata-se de um gene monomórfico, já os genes da família DRB que codificam a cadeia β da molécula DR são altamente polimórficos (AMILLS et al., 1998). Em bovinos, existem pelo menos três genes da família DRB descritos, o *DRB1*, considerado um pseudogene; o *DRB2*, pouco expresso e o gene *DRB3*, descrito como altamente expresso e polimórfico (KUMAR et al., 2011). Em bovinos, o gene *DRB3* está relacionado com resistência/suscetibilidade a várias doenças, como por exemplo, neospirose (SCHWAB et al., 2009), dermatofilia (MAILLARD et al., 1996) e mastite (IBRAHIM et al., 2012). Em bubalinos, diversos trabalhos na literatura vêm descrevendo polimorfismos do gene *DRB3* associados com doenças em animais de interesse econômico, como a mastite, nas raças Murrah (KUMAR et al., 2011) e Nili-Ravi (KUMAR et al., 2008).

A região da classe IIb do MHC, compreende os genes *DM*, *DOB*, *DNA*, *LM* e *TAP*. A sub-região composta pela família *DM*, é a mais estudada dessa classe, apresentando estudos de mapeamento em bovinos (BALLINGALL et al., 2004) e bubalinos (STAFUZZA et al., 2013). A caracterização de genes *DM* em diferentes organismos vertebrados pode fornecer informações importantes sobre a evolução do MHC, em particular no que diz respeito ao estabelecimento da função dos genes da classe IIb. Muitos estudos foram relatados com as mais variadas espécies, como humanos e macacos (ALVAREZ et al., 1998), ratos (KURTH et al., 1997) e bovinos (NIIMI et al., 1995). De maneira geral, as proteínas provenientes dos genes *DMA* e *DMB* estão sempre relacionadas aos processos imunes do hospedeiro.

A necessidade de melhorar os métodos de controle de doenças em animais de interesse econômico, principalmente para o desenvolvimento de novas vacinas e seleção de animais resistentes, faz com que tais genes da família *DR* e *DM* despertem o interesse dos pesquisadores (NIRANJAN et al., 2010), cujo o conhecimento das possíveis variações presentes nesses genes, poderá auxiliar nas estratégias de seleção dos programas de melhoramento genético animal.

Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para identificar regiões de QTL associadas a características de fertilidade em bovinos de corte

A metodologia de estudos de associação genômica ampla (GWAS) tem como principal objetivo, a utilização de SNP para o mapeamento de QTL, ou seja, identificar regiões do genoma relacionadas com a expressão de características de importância

econômica ou com a regulação de alguma rota metabólica que atue diretamente no fenótipo de interesse. Os GWAS estão embasados na suposição de que uma mutação causal capaz de condicionar um fenótipo está em desequilíbrio de ligação (DL) com marcadores adjacentes em indivíduos de uma população, mesmo após diversas gerações e eventos recombinação (VAN TASSELL et al., 2008).

É interessante notar que os cromossomos sexuais são excluídos das análises na maioria dos trabalhos publicados de GWAS, uma vez que não são diploides em machos. Wise et al. (2013) levantou várias razões para não ocorrer a inclusão do cromossomo X nas análises, e estas incluem uma menor proporção de genes nesse cromossomo e uma menor cobertura do cromossomo X nas atuais plataformas de genotipagem em comparação com a cobertura autossômica. Esses autores também descreveram uma série de obstáculos técnicos, como complicações na genotipagem, imputação e na seleção de testes estatísticos. No entanto, esses cromossomos parecem ter funções bastante importantes para características reprodutivas e com a exclusão, sua influência não é levada em consideração (CAMARGO, 2015). No estudo de Fortes et al. (2012) e também abordado no capítulo 3 dessa tese, foi verificada uma grande influência do cromossomo X na fertilidade de machos bovinos. Os GWAS para características de fertilidade e puberdade em bovinos, são importantes visto que precocidade sexual ainda é um problema nos sistemas produtivos e sua melhora pode promover maior retorno econômico (CAMARGO, 2015; FORTES et al., 2012).

Uma produção pecuária eficiente requer fertilidade adequada, e os touros têm um efeito importante na disseminação de mérito genético superior (DAHLEN et al., 2014; KUES et al., 2008). Assim, indicadores de fertilidade masculina, como a susceptibilidade à fragmentação, a morfologia do esperma ou a circunferência escrotal, são utilizados no contexto clínico para avaliar a capacidade de reprodução em espécies bovinas (EVENSON, 2013; HOLROYD et al., 2002). Características de fertilidade em raças bovinas tropicais vêm sendo estudadas e dentre os fatores que podem influenciar na qualidade do sêmen, estão as anormalidades na peça intermediária do espermatozoide (FORTES et al., 2012). Essa região está localizada entre a cabeça e a cauda do espermatozoide, e é caracterizada pela presença de um grande número de mitocôndrias arranjadas de forma espiralada (bainha mitocondrial), sendo a principal responsável pela propulsão do espermatozoide (BEDFORD; HOSKINS, 1990). Os defeitos da peça intermediária incluem o pescoço "curvado" (onde o pescoço e a cauda formam um ângulo maior que 90° para o eixo longo da

cabeça), a inserção assimétrica da parte intermediária na cabeça, peça intermediária grossa ou irregular, peça intermediária anormalmente fina (sem bainha mitocondrial), bem como qualquer combinação destes defeitos (SUN et al., 2006).

Problemas na peça intermediária do espermatozoide são bastante comuns e influenciam diretamente a motilidade deste (FORDYCE et al., 2006). Com a melhoria de características relacionadas à qualidade seminal, podem ser elevados os índices de concepção na inseminação artificial por exemplo, fator de alto retorno econômico na bovinocultura de corte (SAMARAJEEWA et al., 2012; WOLFOVA et al. 2010). Portanto, a utilização de GWAS para características reprodutivas em machos bovinos se faz importante para identificar regiões de QTL que influenciam diretamente características economicamente importantes e que poderão ser incorporados na avaliação genética desses animais.

Objetivos

Identificar polimorfismos nos genes *DRB2*, *DRB3*, *DMA* e *DMB* por meio de sequenciamento e realizar análise de associação entre estes polimorfismos e características de qualidade e produção de leite em búfalas da raça Murrah.

Identificar QTL associados à característica de fertilidade em bovinos das raças Brahman e Composto Tropical por meio de GWAS.

Referências bibliográficas

ALVAREZ, M.; RECIO, M. J.; MARTINEZ-LASO, J.; PÉREZ-BLAS, M.; GARCIA-DE-LA-TORRE, C.; VARGAS-ALARCON, G.; ALEGRE, R.; GOMEZ-CASADO, E.; ARNAIZ-VILLENA, A. Allelic diversity at the primate MHC-DMB locus: Presence of a conserved tyrosine inhibitory motif in the cytoplasmictail. **Tissue Antigens**, v. 51, p. 174–182, 1998.

AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; LEWIN, H. A. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue Scientifique Technique**, v. 17, p. 108-120, 1998.

ANDERSSON, L.; RASK, L. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. **Immunogenetics**, v. 27, p. 110-120, 1988.

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.

BEDFORD, J. M.; HOSKINS, D. D. The mammalian spermatozoon: Morphology, biochemistry and physiology In: Marshall's Physiology of Reproduction. **Male Reproduction Lamming**, G.E. (Ed), London: Churchill Livingstone, 1990. v. 2, p. 379-568.

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.

BROWN, J. H.; JARDETZKY, T. S.; GORGA, J. C.; STERN, L. J.; URBAN, R.G.; STROMINGER, J. L.; WILEY, D. C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, p. 33-39, 1993.

BRYNE, P. F.; MCMULLEN, M. D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, v. 7, p. 24-27, 1996.

CAMARGO, G.M.F. **Mutações putativo-causais em genes candidatos associadas à fertilidade de bovinos de corte e bubalinos**. Tese (doutorado). 2015. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2015.

CARVALHO, R. A. **Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1**. Dissertação (Mestrado). 2016. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DAHLEN, C.; LARSON, J.; LAMB, G. Cliff. Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. In: **Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production**. Springer New York, 2014. p. 97-114.

DONGXIAO, S.; YUAN, Z. Polymorphisms of the Second Exon of MHC-DRB gene in Chinese local sheep and goat. **Biochemical Genetics**, v. 42, p. 385-390, 2004.

EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). **Spermatogenesis: Methods and Protocols**, p. 147-164, 2013.

FORDYCE, G.; ENTWISTLE, K.; NORMAN, S.; PERRY, V.; GARDINER, B.;
FORDYCE, P. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in
Australia. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1140-1148, 2006.

FORTES, M.R.S. LEHNERT, S. A., BOLORMAA, S., REICH, C., FORDYCE, G.,
CORBET N. J., WHAN V.; HAWKEN, R. J.; REVERTER, A. Finding genes for
economically important traits: Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**,
v. 52, p.143-150, 2012.

HOLROYD, R. G.; DOOGAN, V. J.; FAVERI, J. D.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.
R.; BERTRAM, J. D.; VANKAN, D. M.; FITZPATRICK, L. A.; JAYAWARDHANA, G. A.;
MILLER, R. G. Bull selection and use in northern Australia: 4. Calf output and
predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v.
71, p. 67-79, 2002.

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. **Hereditas**, v. 118, p. 187-
190, 1993.

IBRAHIM, E. A.; ALLAM, N. A. T.; KOTB, E. E. Z.; EL-RAFEY, G. A.; EL-DEEN, M. M.
A.; FADLALLAH, M. G. Sequence-based typing-study on the relationship between
subclinical mastitis and BoLA-DRB3.2 allelic polymorphism in Egyptian cows. **Global
Veterinaria**, v. 9, p. 8-22, 2012.

KUES, W. A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Reproductive biotechnology in farm animals
goes genomics. **CAB Reviews**, v. 3, n. 36, p. 1-18, 2008.

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

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

KURTH, D.; NEUMANN, J.; DEMLEITNER, K.; HILDMANN, J.; MEHLIG, M.;
SCHEICHER, C.; WENDLING, U.; SUN, D.; RESKE, K. Full length cDNA of rat
RT1.DMa and RT1.DMb and expression of RT1.DM genes in dendritic and
Langerhans cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 378, p.1005–1012, 1997.

LIU, M.; PENG, J.; XU, D.Q.; ZHENG, R.; LI, F.; LI, J.L.; ZUO, B.; LEI, M.G.; XIONG, Y.Z.; DENG, C.Y.; JIANG, S.W. Association of MYF5 and MYOD1 gene polymorphisms and meat quality traits in Large White X Meishan F2 pig populations. **Biochemical Genetics**, v. 46, p. 720–732, 2008.

MAILLARD, J. C.; MARTINEZ, D.; BENSALD, A. An amino acid sequence coded by the exon 2 of the BoLA DRB3 gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of resistance to dermatophilosis in Brahman zebu cattle of Martinique (FWI). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 791, p. 185-197, 1996.

MATOS, M.C. **Associação genômica ampla para características reprodutivas em bovinos da raça nelore**. Dissertação (mestrado). 2013. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

MENEZES, G.R.O., REGITANO, L.C.A., SILVA, M.V.G.B., CARDOSO, F.F., SILVA, L.O.C., SIQUEIRA, F., EGITO, A.A. Genômica aplicada ao melhoramento genético de gado de corte. In: Melhoramento genético aplicado em gado de corte. Brasília: EMBRAPA, 2013. cap. 17, 213-226.

MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E.; RUSSELL, G.; SULIMOVA, G.E. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of two new alleles in Iranian buffalo breed. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

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.; DEB, S. M.; 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.

NORIMINE, J.; BROWN, W. C. Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4(+) T lymphocyte responses. **Immunogenetics**, v. 57, p. 750-762, 2005.

PAZ, C.C.P.; PACKER, I.U.; FREITAS, A.R.; TAMBASCO-TALHARIS, D.; REGITANO, L.C.A., ALENCAR, M.M.; RODRIGUES, A.A. Influência de polimorfismos genéticos

sobre os parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 858-69, 2004.

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

SAMARAJEewa, S.; HAILU, G.; JEFFREY, S. R.; BREDAHL, M. Analysis of production efficiency of beef cow/calf farms in Alberta. **Applied Economics**, v. 44, p. 313-322, 2012.

SCHWAB, A. E.; GEARY, T. G.; BAILLARGEON, P.; SCHWAB, A. J.; FECTEAU, G. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 136-140, 2009.

SCOTT, P. C.; GOGOLIN-EWENS, K. J.; ADAMS, T. E.; BRANDON, M. R. Nucleotide sequence, polymorphism, and evolution of ovine MHC class II DQA genes. **Immunogenetics**, v. 24, p. 69-79, 1991.

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.

SUN, F.; KO, E.; MARTIN, R. H. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2006.

TROWSDALE, J. The gentle art of gene arrangement: the meaning of gene clusters. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-5, 2002.

VAN TASSELL, C. P.; SMITH, T. P.; MATUKUMALLI, L. K.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; LAWLEY, C. T. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. **Nature Methods**, v. 5, n. 3, p. 247-252, 2008.

WISE, A. L.; GYI, L.; MANOLIO T. A. 2013. eXclusion: toward integrating the X chromosome in genome-wide association analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 5, p. 643-647, 2013.

WOLFOVÁ, M.; WOLF, J.; ZAHRÁDKOVÁ, R.; PŘIBYL, J.; DAŇO, J.; KRUPA, E.; KICA, J. Breeding objectives for beef cattle used in different production systems - 2. Model application to production systems with the Charolais breed. **Livestock Production Science**, v.95, p.217-230, 2005