

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

**DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE  
DRB3 DO COMPLEXO PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDADE NAS RAÇAS DE  
BÚFALO MEDITERRÂNEO, JAFARABADI  
E MURRAH**

**Lucas Matheus Olivatto**

Biólogo

**2013**

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

**DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE  
DRB3 DO COMPLEXO PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDADE NAS RAÇAS DE  
BÚFALO MEDITERRÂNEO, JAFARABADI  
E MURRAH**

**Lucas Matheus Olivatto**

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisabete Jorge Amaral**

Co-orientadora: **Dr<sup>a</sup>. Nedenia Bonvino Stafuzza**

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

**2013**

Olivatto, Lucas Matheus  
O48d Diversidade alélica do gene DRB3 do complexo principal de  
Histocompatibilidade nas raças de búfalo mediterrâneo, Jafarabadi e  
murray / Lucas Matheus Olivatto. -- Jaboticabal, 2013  
viii, 42 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Maria Elisabete Jorge Amaral

Co-orientadora: Nedenia Bonvino Stafuzza

Banca examinadora: Nedenia Bonvino Stafuzza, Luciane  
Madureira de Almeida, Danísio Prado Munari

Bibliografia

1. Gene-diversidade alélica. 2. Búfalo-caracterização. 3. MHC. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 577.213:636.293.1

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

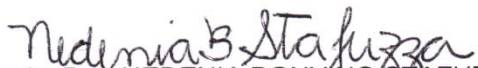
**TÍTULO:** DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE DRB3 DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE NAS RAÇAS DE BÚFALO MEDITERRÂNEO, JAFARABADI E MURRAH

**AUTOR:** LUCAS MATHEUS OLIVATTO

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA ELISABETE JORGE AMARAL

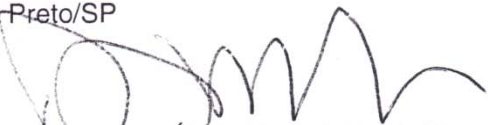
**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Aprovado 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 / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas / IBILCE / São José do Rio Preto/SP



Prof. Dr. DANÍSIO PRADO MUNARI

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. LUCIANE MADUREIRA DE ALMEIDA

Universidade Estadual de Goiás / Ipameri/GO

Data da realização: 30 de julho de 2013.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUCAS MATHEUS OLIVATTO** – casado, nascido em 17 de julho de 1985, na cidade de São Joaquim da Barra (SP), Brasil, filho de Mariluci Matheus Olivatto e Orlando Olivatto Júnior. Iniciou em março de 2006 o curso de graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São Carlos no campus de Sorocaba (SP), obtendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em janeiro de 2010. Em agosto de 2011 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 aluno de mestrado, bolsista da CAPES, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisabete Jorge Amaral e co-orientado pela Dr<sup>a</sup>. Nedenia Bonvino Stafuzza.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me guiar em toda a minha vida, e por me direcionar em caminhadas difíceis.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Elisabete Jorge Amaral, pela orientação e por todos os conhecimentos adquiridos, não somente para a vida profissional, mas também para a minha vida pessoal. Obrigado professora, me tornei uma pessoa melhor.

À Dr<sup>a</sup> Nedenia Bonvino Stafuzza, por me co-orientar neste projeto, se disponibilizando em todos os momentos. Obrigado Nedenia, por sua paciência em me auxiliar, foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV\_UNESP) por me proporcionar todas as condições para realização deste mestrado.

À CAPES, que me concedeu a bolsa de estudos, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Humberto Tonhati, que disponibilizou os pêlos de búfalos, dos quais foi extraído o material genético que foi analisado neste projeto.

À banca de qualificação, minha orientadora a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisabete Jorge Amaral, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e o Doutor Rusbel Raúl Aspilcueta Borquis, pelas sugestões e ajuda na qualidade deste trabalho.

À banca de defesa, minha co-orientadora a Dr<sup>a</sup>. Nedenia Bonvino Stafuzza, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Madureira de Almeida e o Prof. Dr. Danísio Prado Munari, por contribuírem para a qualidade final deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal e seus coordenadores, assim como todos os funcionários da Seção de Pós-graduação, que sempre auxiliavam na resolução de problemas e dúvidas no decorrer desta jornada.

Às amigas do Laboratório de Genômica Comparativa no IBILCE-UNESP: Bruna Naressi, Mariana Victoretti e Mariana Borges, pela ajuda e por terem me recebido com toda hospitalidade no laboratório.

Aos meus pais Orlando e Mariluci e meu irmão Isaac, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e não me deixando desfalecer pelo caminho. Obrigado família, por tudo.

Aos meus familiares próximos, que querem sempre o melhor para mim e que me apoiaram nesta jornada. Em especial, agradeço às minhas primas, Paula e Carla, por me amarem igual a um irmão, nunca me esquecerei de vocês, minhas irmãs.

À minha esposa Polianna e ao meu filho Estevam, por estarem em minha vida, pois vocês são a razão de todo o meu esforço e luta. Obrigado por tudo, Amo vocês.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 Aspectos gerais da bubalinocultura.....	1
1.2 Raças de búfalos de rio no Brasil.....	2
1.2.1 Raça Mediterrâneo.....	2
1.2.2 Raça Jafarabadi.....	3
1.2.3 Raça Murrah.....	3
1.3 Aspectos gerais do Complexo Principal de Histocompatibilidade	4
1.4 Estudos com os genes DRB em bovídeos.....	7
2. OBJETIVO.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Rebanho experimental, reações de PCR e otimização de iniciadores de PCR .....	10
3.2 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP).....	11
3.3 Genotipagem dos animais.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
4.1 Reações de PCR e otimização de iniciadores de PCR.....	15
4.2 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP).....	16
4.3 Genotipagem dos animais.....	18
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE DRB3 DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE NAS RAÇAS DE BÚFALO MEDITERRÂNEO, JAFARABADI E MURRAH

**RESUMO** – O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) é uma região do genoma com um denso agrupamento de genes que apresentam alto grau de polimorfismo. Os genes do MHC estão divididos em regiões que apresentam similaridades funcionais, contendo genes da classe I, II e III, sendo que em bovídeos a classe II é subdividida em dois agrupamentos denominados IIa e IIb. Genes da classe II do MHC têm chamado muito a atenção, se tratando de animais de produção, diante da necessidade de melhorar métodos de controle de doenças, por meio do desenvolvimento de novas vacinas e seleção de animais resistentes. Desta forma, o presente trabalho visou à realização de um estudo da diversidade alélica do gene DRB3 em três raças de búfalo de rio criadas no Brasil (Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah) utilizando a técnica de PCR-RFLP. As amostras de DNA foram extraídas de bulbo folicular de 24 animais da raça Mediterrâneo, 23 animais da raça Jafarabadi e 18 animais da raça Murrah. As reações de PCR foram realizadas com volume total de 30 µl e o produto de PCR obtido foi digerido com três enzimas de restrição: *RsaI*, *HaeIII* e *PstI*. Os pares de iniciadores de PCR produziram produto de PCR de aproximadamente 300 bp de tamanho. A digestão com a enzima de restrição *RsaI* apresentou oito alelos, com tamanhos aproximados: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp), *RsaI*-B (180+120 bp), *RsaI*-C (130+90+70 bp), *RsaI*-D (140+90+70 bp), *RsaI*-E (120+70+60 bp), *RsaI*-F (120+110+70 bp) e *RsaI*-G (110+70+60+55 bp), sendo cinco alelos (O, *RsaI*-A, *RsaI*-B, *RsaI*-C, *RsaI*-E) na raça Mediterrâneo, quatro alelos (O, *RsaI*-A, *RsaI*-F e *RsaI*-G) na raça Jafarabadi e três alelos (O, *RsaI*-A e *RsaI*-D) na raça Murrah. Em todos os produtos de PCR, das três raças, o genótipo homozigoto para o alelo O foi o mais frequente (300bp/300bp). Com a enzima de restrição *HaeIII* foram observados quatro alelos, com tamanhos aproximados: *HaeIII*-A (220+80 bp), *HaeIII*-B (170+80+50 bp), *HaeIII*-C (210+80 bp) e *HaeIII*-D (170+130 bp), em que os produtos de PCR da raça Mediterrâneo exibiram os quatro alelos e produtos de PCR das raças Jafarabadi e Murrah apenas dois alelos (*HaeIII*-A e *HaeIII*-D). Os produtos de PCR da raça Mediterrâneo apresentaram cinco genótipos heterozigotos, dois deles sendo os mais frequentes no rebanho analisado (*HaeIII*-A/*HaeIII*-D em 21,7% e *HaeIII*-B/*HaeIII*-D em 21,7%). A enzima de restrição *PstI* apresentou três alelos, com tamanhos aproximados: O (300 bp), *PstI*-A (230+70 bp) e *PstI*-B (210+90 bp), em que produtos de PCR da raça Jafarabadi exibiram os três alelos e os produtos de PCR das raças Mediterrâneo e Murrah os alelos O e *PstI*-A. Os produtos de PCR analisados, nas três raças, com a enzima *PstI*, exibiram na maioria dos animais o genótipo homozigoto para o alelo O (300bp/300bp).

**Palavras-chave:** Diversidade alélica, Enzima de restrição, MHC, Polimorfismo

## ALLELIC DIVERSITY OF THE DRB3 GENE OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN THE BREEDS OF BUFFALOES MEDITERRANEAN, JAFARABADI AND MURRAH

**SUMMARY** – The Major Histocompatibility Complex (MHC) is a genome region with have a dense clusters of genes that showing a high degree of polymorphism. The genes of the MHC are divided in regions that show similar functions, and contain genes of the classe I, II and III. The class II, in bovides is subdivided in two clusters called IIa and IIb. Much attention has been given to class II genes, especially to the livestock, because the production animal has a need of more efficient methods to control diseases through the development of vaccines and selection of resistant animals. Therefore, the present work aimed study the allelic diversity of the DRB3 gene in three breeds of river buffaloes raised in Brazil (Mediterranean, Jafarabadi and Murrah) by PCR-RFLP. DNA samples were extracted from follicle bulb of 24 Mediterranean, 23 Jafarabadi and 18 Murrah buffaloes breeds. The PCR reactions have 30  $\mu$ l of volume and the PCR product was digested with three restriction enzymes: *RsaI*, *HaeIII* and *PstI*. The primers pairs produced a PCR product with 300 bp size proximally. Digestion with the restriction enzyme *RsaI* presented eight alleles, with proximally sizes: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp), *RsaI*-B (180+120 bp), *RsaI*-C (130+90+70 bp), *RsaI*-D (140+90+70 bp), *RsaI*-E (120+70+60 bp), *RsaI*-F (120+110+70 bp) and *RsaI*-G (110+70+60+55 bp), and were five alleles (O, *RsaI*-A, *RsaI*-B, *RsaI*-C and *RsaI*-E) in the Mediterranean breed, four alleles (O, *RsaI*-A, *RsaI*-F and *RsaI*-G) in the Jafarabadi breed and three alleles (O, *RsaI*-A and *RsaI*-D) in the Murrah breed. In all of the PCR products, of the three breeds, the homozygote genotype for the allele O was the most frequent (300bp/300bp). Digestion with the *HaeIII* restriction enzyme produced four alleles, with proximally sizes: *HaeIII*-A (220+80 bp), *HaeIII*-B (170+80+50 bp), *HaeIII*-C (210+80 bp) and *HaeIII*-D (170+130 bp), where the Mediterranean breed presented the four alleles and the Jafarabadi and Murrah breeds showed two alleles (*HaeIII*-A and *HaeIII*-D). Five heterozygote genotypes were found in the Mediterranean breed, where two genotypes (*HaeIII*-A/*HaeIII*-D – 21,7% and *HaeIII*-B/*HaeIII*-D – 21,7%) were the most frequent in the analyzed animals. The restriction enzyme *PstI* presented three alleles, with proximally sizes: O (300 bp), *PstI*-A (230+70 bp) and *PstI*-B (210+90 bp), where the Jafarabadi breed exhibited the three alleles and Mediterranean and Murrah breeds exhibited only the alleles O and *PstI*-A. The analyzed PCR products, in all the breeds, with the *PstI* enzyme, exhibited in the most of animals the homozygote genotype for the allele O (300bp/300bp).

**Keywords:** Allelic diversity, MHC, Polymorphism, Restriction enzyme

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. Aspectos gerais da bubalinocultura

Segundo estimativas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) o rebanho mundial de búfalos é de aproximadamente de 195 milhões de animais, dos quais 97% estão localizados no continente asiático (FAO, 2011). Economicamente, o búfalo se mostra de relevante importância para países da Ásia, apresentando um papel fundamental no desenvolvimento da sociedade asiática, por meio da exploração do leite, carne, couro e tração animal, tendo ainda como subprodutos, seus pêlos, chifres e fezes (NANDA; NAKAO, 2003).

Diferentes raças de búfalos apresentam maior ou menor aptidão para produção de carne, leite ou para tração e transporte de carga, podendo ser considerado um animal de tripla aptidão (GARCIA et al., 2005). Segundo Moreira et al. (1994) as características inerentes dos bubalinos são: adaptabilidade, prolificidade, precocidade, longevidade, elevada taxa de produtividade de carne e leite, taxas de mortalidade inferior a 3% ao ano e de natalidade superior a 80%. O rebanho bubalino brasileiro teve crescimento significativo, pois características como, elevada longevidade produtiva e adaptabilidade aos mais variados ambientes, aumentou o interesse de produtores em criar búfalos como alternativa para a produção de carne, leite e derivados (OLIVEIRA, 2005).

O Brasil possui um rebanho de 1,27 milhão de búfalos distribuídos pelas cinco regiões do país, segundo dados do IBGE de 2011 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), sendo que 64,2% encontram-se na região Norte; 9,8% na região Nordeste; 6,2% na região Centro-Oeste; 10,4% na região Sudeste e 9,3% na região Sul. Dados recentes do IBGE apontam crescimento de 7,8% do rebanho bubalino brasileiro do ano de 2010 para o ano de 2011, em que os bubalinos foram o rebanho de grande porte com a maior taxa de variação anual apresentada, indicando grande interesse dos pecuaristas brasileiros pela espécie.

Bovinos e bubalinos estão inseridos dentro da mesma família, a *Bovidae*, que possui alguns dos animais mais importantes tanto na cultura quanto na economia de vários povos (MACEACHERN et al., 2009), sendo também a mais diversa das nove famílias da ordem *Artiodactyla*. A família *Bovidae* possui seis gêneros: *Angra*, *Bibos*, *Bison*, *Bos*, *Bubalus* e *Syncerus*, em que os búfalos são representados por dois deles: os búfalos selvagens de origem africana (*Syncerus*) e os domésticos de origem asiática (*Bubalus*). Atualmente, os búfalos, que são criados para fins econômicos (búfalos domésticos), são apenas da espécie *Bubalus bubalis* (LENSTRA; BRADLEY, 1999).

Estudos morfológicos (MACGREGOR, 1939), bioquímicos (AMANO, 1983; BARKER et al., 1997a), moleculares (BARKER et al., 1997b; KIKKAWA et al., 1997; LAU et al., 1998) e genéticos (BERARDINO; IANNUZZI, 1981; FISCHER; ULBRICH, 1968; IANNUZZI, 1994), mostram que os búfalos da espécie *Bubalus bubalis* podem ser divididos em dois grupos: os búfalos de rio ( $2n=50$ ) e os búfalos de pântano ( $2n=48$ )

## **1.2. Raças de búfalo de rio no Brasil**

Entre as diversas raças de búfalo de rio descritas, apenas três raças são encontradas no Brasil e reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah. A seguir, estão descritas algumas características destas raças de búfalos de rio, reconhecidas pela ABCB.

### **1.2.1. Raça Mediterrâneo**

Raça de búfalo de rio de origem italiana, sendo utilizada tanto para a produção de leite como para a produção de carne, considerada de dupla aptidão. No Brasil, a raça Mediterrâneo está sendo utilizada principalmente para a produção de carne, tendo os pesos médios dos animais em torno de 750 Kg para os machos e 550 Kg para as fêmeas (PEREIRA et al., 1996).

Os animais desta raça no Brasil são descendentes de indivíduos importados da Itália, primeiramente para a Ilha de Marajó e depois para outros estados brasileiros (ANDRADE; GARCIA, 2005). Por serem de origem italiana, são conhecidos por búfalo preto ou italiano, com aparência intermediária entre as raças Murrah e Jafarabadi (MARQUES, 2000). Apresentam pelagem e pele totalmente pretas, estendendo-se também aos chifres e os pêlos são mais abundantes nos indivíduos mais novos (ANDRADE; GARCIA, 2005).

### **1.2.2. Raça Jafarabadi**

A raça Jafarabadi é originária da Floresta do Gir, península Kathiavar, no oeste da Índia. É caracterizada pela forma peculiar da cabeça e chifres longos e caídos, com duas variedades bem distintas, a Gir e a Palitana (MARQUES, 2000). São animais de grande porte e considerados de aptidão mista, produção de carne e leite, apresentando pêlos pretos em todo o corpo (ANDRADE; GARCIA, 2005).

É considerado no Ocidente um animal mais para a produção de carne, porém na Índia existem registros de boas produtoras de leite. Os animais desta raça possuem peso médio variando de 500 a 1.200 Kg nos machos e 450 a 900 Kg nas fêmeas. Uma dificuldade encontrada para sua criação está na alimentação mais exigente, devido ao seu maior porte (MANO FILHO, 1985).

### **1.2.3. Raça Murrah**

Raça de bubalinos originária do noroeste da Índia, difundindo-se no norte do país e no Paquistão. Dentre as raças bubalinas é considerada a de melhor aptidão leiteira, com conformação e tipo indicando aptidão mista com predomínio para o tipo leiteiro. A pele e a pelagem dos animais desta raça apresentam cor preta, assim como os chifres (ANDRADE; GARCIA, 2005).

O nome Murrah, dado a esta raça, vem do termo hindu que significa caracol, claramente referenciando os chifres do animal. Apresentam peso médio de 450 a 900 kg para os machos e de 350 a 700 Kg para as fêmeas. No

Brasil, os animais da raça Murrah, se distribuíram por todas as regiões do país (MANO FILHO, 1985).

Bubalinos são suscetíveis a um espectro semelhante de agentes infecciosos que afetam os bovinos, em que muitas das vacinas e quimioterápicos desenvolvidos para bovinos são utilizadas também em bubalinos, como por exemplo, medicamentos que combatem brucelose, antraz, peste bovina, leptospirose e febre aftosa (MARQUES, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981; TOMAR; TRIPATHI, 1987). Porém, os búfalos apresentam resposta imunológica diferente para muitas doenças que atacam os bovinos (LEITE; BASTIANETTO, 2009).

O material genético do hospedeiro está relacionado com sua resistência/suscetibilidade a doenças infecciosas (AXFORD et al., 2000; BISHOP et al., 2002), desta forma é importante elucidar a estrutura dos genes e suas variantes relacionadas à resistência/suscetibilidade a agentes infecciosos. A partir deste conhecimento será possível entender como a variação na estrutura genômica pode diversificar as funcionalidades do genoma e auxiliar em planejamentos futuros para uma melhor prevenção e combate às doenças que afetam tanto bovinos como bubalinos.

### **1.3. Aspectos gerais do Complexo Principal de Histocompatibilidade**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) é uma região do genoma com um denso agrupamento de genes que apresentam alto grau de polimorfismo, cuja maioria dos genes está relacionada à resposta imune inata e adaptativa, exercendo papel importante na resposta do hospedeiro à patógenos (KELLEY et al., 2005). O arranjo físico desses genes em agrupamentos revela a importância de seu papel funcional no genoma, sendo expressos de forma co-dominante e herdados em blocos, influenciando a suscetibilidade e a predisposição a um amplo espectro de doenças (VANDIEDONCK; KNIGHT, 2009).

Em mamíferos, os genes do MHC estão organizados em um ou mais agrupamentos, cujas regiões apresentam similaridades funcionais, contendo

genes de classe I, classe II e classe III (CHILDERS et al., 2005; KLEIN; SATO, 1998). De acordo com a espécie, há variação quanto à organização de cada uma dessas regiões e quanto ao número de genes em cada uma delas. Isso se deve ao fato de que durante o processo evolutivo, novos genes são criados por processos de duplicação gênica, podendo ser mantidos no genoma, deletados ou tornarem-se não funcionais devido ao acúmulo de mutações (NEI; ROONEY, 2005; TAKAHASHI et al., 2000).

Os genes da classe I do MHC expressam moléculas responsáveis pela apresentação de peptídeos antígenos aos linfócitos CD8<sup>+</sup> por meio de receptores de membrana das células T (AMILLS et al., 1998). Tais moléculas podem atuar também como elementos de reconhecimento para as células NK (do inglês *Natural Killer Cell*) (KUMÁNOVICS et al., 2003).

Os genes da classe II do MHC são expressos exclusivamente nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (DE et al., 2002). As proteínas expressas pelos genes da classe II também degradam peptídeos de patógenos intracelularmente nas células T-*helpers*, como parte do mecanismo que identifica antígenos externos iniciando uma resposta imune (BROWN et al., 1993).

Na maioria dos mamíferos, genes da classe II estão organizados em um único segmento. Entretanto, apesar de existirem evidências de homologia dos genes desta região entre os mamíferos, a região do MHC em bovídeos se apresenta de forma diferente dos demais mamíferos, em que os genes da classe II estão organizados em dois agrupamentos denominados IIa e IIb (BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009; TRAUJL et al., 2005).

Os genes da classe III do MHC codificam um grupo diverso de proteínas com variadas funções, em que há maior destaque para as interações com receptores das células NK (TROWSDALE, 2002). No entanto, não são todos os genes da classe III que estão relacionados com resposta imune (MILNER; CAMPBELL, 2001; XIE et al., 2003).

Como os genes do MHC exercem papel importante na resposta imune, há vários estudos em diferentes espécies de mamíferos, os quais têm mostrado que os genes do MHC apresentam grande complexidade genética,

tanto em número de genes e haplótipos como em diversidade alélica (BIRCH et al., 2006; DEAKIN et al., 2006; KELLEY et al., 2005).

Existem poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre os genes da classe IIa do MHC em bubalinos, cuja maioria estão relacionados com polimorfismos de genes específicos da família DR (ACHARYA et al., 2002; AHMED; OTHMAN, 2006; ARAVINDAKSHAN; NAINAR; SIVASELVAM, 2000; BEHL; BEHL; VERMA, 2010; DE et al., 2002; DE et al., 2011; GOLE et al., 2009; KUMAR et al., 2008; KUMAR et al., 2011; MOSAFER et al., 2012; NASKAR et al., 2012; RAHIMNAHAL et al., 2010; SENA et al., 2003; SHEIKHMOHAMMADI et al., 2010; SUMATHI et al., 2010), e ainda, um menor número trabalhos relacionados com polimorfismos de genes da família DQ (NIRANJAN et al., 2010; SENA et al., 2011).

O estudo do MHC bubalino, no Brasil, iniciou-se em 2008, quando foi publicado um mapa preliminar do MHC de búfalo, contendo 10 genes de classe II mapeados no braço curto do cromossomo 2 (BBU2p) (RODRIGUES-FILHO et al., 2008). Entre os genes mapeados pelos autores, se encontram seis genes da classe IIa (DRA, DRB, DRB2, DRB3, DQA e DQA2) e quatro genes da classe IIb (DMA, DYA, DYB e PSMB9). Esse mapa preliminar corroborou os dados citogenéticos de que os genes da classe II se encontram divididos em dois agrupamentos, uma vez que apresentou os genes da classe IIa e IIb alocados em dois grupos de ligação distintos (DI MEO et al., 2008; IANNUZZI et al., 1993).

Recentemente, a organização geral da região MHC no genoma do búfalo foi estabelecida por meio de um mapa de alta resolução, construído pelo grupo de pesquisa “Genômica de Búfalos”, em que foram alocados 53 marcadores, incluindo aqueles das classes I, IIa, IIb e III (STAFUZZA et al., 2013). Ainda nesse estudo, foi construído o mapa comparativo do MHC bubalino e bovino evidenciando segmentos de homologia entre as duas espécies.

#### 1.4. Estudos com os genes DRB em bovídeos

A classe IIa possui duas sub-regiões, uma composta pelos genes da família DR (DRA e DRB) e outra pelos genes da família DQ (DQA e DQB). A sub-região composta pelos genes DR é a mais amplamente estudada, devido ao grande número de polimorfismos presentes, além de sua importância funcional (DONGXIAO; YUAN, 2003). Nos bovinos, o gene DRA só possui um alelo que codifica a cadeia  $\alpha$  da molécula DR, ou seja, trata-se de um gene monomórfico. Os genes DRB que codificam a cadeia  $\beta$  da molécula DR são altamente polimórficos, cujos polimorfismos se concentram principalmente no segundo éxon, que é o responsável por codificar a porção variável do sítio de ligação peptídica da proteína (AMILLS et al., 1998).

Existem pelo menos três genes DRB descritos em bovinos: o DRB1 que é um pseudogene, o DRB2 que é pouco expresso e o gene DRB3 que é altamente expresso e polimórfico (KUMAR et al., 2011). Tais genes da família DRB têm despertado o interesse de pesquisadores diante da necessidade de melhorar os métodos de controle de doenças em animais de interesse econômico, principalmente para o desenvolvimento de novas vacinas e da seleção de animais resistentes (NIRANJAN et al., 2010).

O gene DRB3 está localizado no cromossomo 23 bovino (BTA23) e no cromossomo 2 bubalino (BBU2). Nos bovinos, o gene DRB3 possui tamanho aproximado de 11,4 Kb desde o códon de início até o sinal de poliadenilação, contendo seis éxons (RUSSELL; SMITH; OLIVER, 2004).

Diversos trabalhos na literatura vêm descrevendo polimorfismos do gene DRB3 associados com doenças em animais de interesse econômico. Em bisão (*Bison bison*), polimorfismos no gene DRB3 foram associados à resistência à febre catarral maligna (TRAUL et al., 2007). Em bovinos, o gene DRB3 está relacionado com resistência/suscetibilidade à várias doenças, como por exemplo, neosporose (SCHWAB et al., 2009), pancitopénia neonatal bovina (BALLINGALL et al., 2011), dermatofilia (MAILLARD et al., 1996) e mastite (CHU et al., 2012; FIROUZAMANDI et al., 2010; IBRAHIM et al., 2012; KULBERG et al., 2007; RUPP et al., 2007; YOSHIDA et al., 2009; WOJDAK-

MAKSYMIEC, et al., 2010;). O gene DRB3 também tem sido relacionado com resistência ao vírus da leucemia bovina (JULIARENA et al., 2008). Em búfalo, há trabalhos na literatura associando polimorfismos no gene DRB3 com mastite nas raças Murrah (GOLE et al. 2009; KUMAR et al., 2011) e Nili-Ravi (KUMAR et al., 2008).

Dentre os vários métodos utilizados para investigar polimorfismos genéticos, a técnica de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) tem se mostrado útil na identificação de polimorfismos no segundo éxon do gene DRB3 bovino (CHU et al., 2012; DIETZ et al., 1997a; DIETZ et al., 1997b; FIROUZAMANDI et al., 2010; MOSAFER & NASSIRY et al., 2005; SHARIF et al., 1998; VAN EIJK et al., 1992; WOJDAK-MAKSYMIEC et al., 2010) e bubalino (ACHARYA et al., 2002; BEHL; BEHL; VERMA, 2010; GOLE et al., 2009; KUMAR et al., 2008; KUMAR et al., 2011; SUMATHI et al., 2010).

Existem estudos que relacionam os polimorfismos dos genes do MHC com escolha de parceiros ideais, problemas reprodutivos e de fertilidade, em animais de interesse econômico e até em humanos (BAINBRIDGE; SARGENT; ELLIS, 2001; LOW et al., 1990; OBER, 1999; PENNY et al., 1999). Estes tipos de estudos fornecem informações relevantes sobre a variabilidade alélica e genotípica de uma determinada população, provendo marcadores para suscetibilidade/resistência à doenças economicamente prejudiciais aos rebanhos, como por exemplo a mastite. Alguns trabalhos relacionam polimorfismos nos genes do MHC com a reprodução de rebanhos, indicando os animais adequados para cruzamentos a fim de reduzir e até evitar problemas reprodutivos.

## **2. OBJETIVO**

Identificar a presença de polimorfismos e caracterizar a diversidade alélica e genotípica do segundo éxon do gene DRB3 em búfalos, utilizando a técnica de PCR-RFLP.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Rebanho experimental, reações de PCR e otimização de iniciadores de PCR

Foram utilizadas amostras de DNA extraído de bulbo folicular provenientes de 65 animais, registrados pela Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB). Foram considerados 24 animais da raça Mediterrâneo provenientes de uma fazenda em Itatiba-SP; 23 animais da raça Jafarabadi provenientes de duas fazendas (uma em Belém-PA e outra em Sales de Oliveira-SP); e 18 animais da raça Murrah oriundos de duas fazendas situadas em Belém-PA (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos animais agrupados por raça, município amostrado, fazenda, número de amostras por município e sexo.

Raça	Município	Fazenda	Nº de amostras	Sexo
Mediterrâneo	Itatiba-SP	Maringá	24	01 macho 23 fêmeas
	Jafarabadi	Belém-PA	Agropecuária Santa Rita do Marajó S/A	16
Sales Oliveira-SP		Lageado	07	07 fêmeas
Murrah	Belém-PA	Itaqui	07	02 machos 05 fêmeas
	Belém-PA	Agropecuária Santa Rita do Marajó S/A	11	11 fêmeas
<b>Total de amostras:</b>			<b>65</b>	

Para a amplificação do éxon 2 do gene DRB3 foram utilizados os iniciadores para PCR descritos por Sigurdardóttir et al. em 1991 (senso: 5'-GATGGATCCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3' e anti-senso: 5'-CTTGAATTCGCGCTCACCTCGCCGCTG-3'). Inicialmente esse par de iniciadores para PCR foi gerado para estudos de polimorfismos do gene DRB3 em bovinos e vem sendo utilizado com sucesso em estudos de polimorfismo de diversas espécies, como por exemplo, em ovelhas (GUTIERREZ-ESPELETA et al., 2001), cavalos (HEDRICK et al., 1999) e búfalos (ARAVINDAKSHAN; NAINAR;

SEVASELVAM, 2000; GOLE et al., 2009; KUMAR et al., 2008; KUMAR et al., 2011; SENA et al., 2003; SUMATHI et al., 2010).

As reações de PCR para a otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores de PCR foram realizadas com gradiente de temperatura, visando à obtenção de um produto de PCR único com o DNA de búfalo. Para isso foi utilizado um termociclador do tipo gradiente (*Veriti® - Life Technologies*) com bloco de 96 amostras distribuídas em 12 colunas e 8 linhas. As temperaturas de anelamento utilizadas variaram de 50 a 65°C, sendo: 50°C, 53°C, 56°C, 59°C, 62°C e 65°C.

As reações de PCR foram realizadas com volume total de 30 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos iniciadores para PCR, 100 mM de dNTPs, 10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 1,5U da DNA polimerase GoTaq®Hot Start (Promega). Os ciclos para amplificação foram os seguintes: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores para PCR a 62°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados, inicialmente, mediante a aplicação de 5µl do amplificado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese horizontal por 30 minutos a 90 V, em tampão TBE 0,5X. Os resultados foram foto-documentados com câmera digital do tipo DC290 Kodak™ em luz ultravioleta. Verificada a amplificação almejada, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição para detecção de polimorfismos.

### **3.2. Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)**

Para a análise de RFLP, 18 µl do produto de PCR foi dividido em três tubos de 0,5 ml, contendo 6 µl do produto de PCR em cada tubo, os quais foram submetidos à digestão com diferentes enzimas de restrição. Foram utilizadas 6U de cada uma das enzimas de restrição, *RsaI* (sítio de restrição:

GT↓AC), *HaeIII* (sítio de restrição: GG↓CC) e *PstI* (sítio de restrição: CTGCA↓G) para a digestão, a qual ocorreu a 37°C por 16 horas.

Os fragmentos digeridos foram visualizados em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese horizontal por 90 minutos a 100 V, em tampão TBE 0,5X. Os marcadores moleculares de 25 bp e 50 bp (Promega) foram utilizados para auxiliar na identificação do tamanho dos fragmentos digeridos. Os resultados foram foto-documentados com câmera digital do tipo DC290 Kodak™ em luz ultravioleta.

### 3.3. Genotipagem dos animais

O padrão de polimorfismo de cada animal foi determinado com a análise dos dados obtidos com a técnica de PCR-RFLP, verificando a presença dos diferentes fragmentos de restrição nos géis de agarose visualizados. O tamanho desses fragmentos foi determinado, aproximando seus tamanhos pela comparação com dois marcadores moleculares de 25 pb e 50 pb.

As análises foram realizadas por meio da contagem direta dos genótipos apresentados, observados nos géis analisados, obtendo assim as frequências alélicas e genotípicas, pela aplicação das fórmulas (FALCONER; MACKAY, 1996):

$$\begin{aligned}
 p(A) &= \frac{N_{AA} + 0,5N_{AB} + \dots + 0,5N_{AX}}{N} & F(AA) &= \frac{N_{AA}}{N} \\
 q(B) &= \frac{N_{BB} + 0,5N_{AB} + \dots + 0,5N_{BX}}{N} & F(BB) &= \frac{N_{BB}}{N} \\
 & \vdots & & \\
 t(X) &= \frac{N_{XX} + 0,5N_{AX} + \dots + 0,5N_{XY}}{N} & F(AB) &= \frac{N_{AB}}{N} \\
 & & F(XX) &= \frac{N_{XX}}{N} & F(XY) &= \frac{N_{XY}}{N}
 \end{aligned}$$

Em que  $N_{AA}$ ,  $N_{BB}$  e  $N_{XX}$  correspondem ao número de indivíduos homocigotos AA, BB e XX.  $N_{AB}$  corresponde ao número de indivíduos heterocigotos AB. Já  $N_{AX}$ ,  $N_{BX}$  e  $N_{XY}$ , correspondem ao número de indivíduos heterocigotos A/alelos restantes, B/alelos restantes e heterocigotos para os demais alelos, sendo que as letras “X” e “Y” representam os demais alelos encontrados. N representa o número total de indivíduos da população analisada.

O teste de  $\chi^2$  (Qui-quadrado) para a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos do gene analisado e as frequências genotípicas observadas foram testadas, comparando-as com frequências genotípicas esperadas, que foram estimadas por meio da expansão das fórmulas (FALCONER & MACKAY, 1996):

$$\begin{aligned}(X_O + X_A)^2 &= X_O^2 + 2X_OX_A + X_A^2 \\(X_O + X_A + X_B)^2 &= X_O^2 + 2X_OX_A + 2X_OX_B + X_A^2 + 2X_AX_B + X_B^2 \\&\vdots \\(X_O + X_A + \dots + X_Y)^2 &= X_O^2 + 2X_OX_A + \dots + 2X_OX_Y + X_A^2 + \dots + 2X_AX_Y + \dots + X_Y^2\end{aligned}$$

Em que  $X_O$ ,  $X_A$ ,  $X_B$ ,  $X_Y$  correspondem às frequências esperadas para os alelos O, A, B e Y (alelos restantes) e  $2X_OX_A$ ,  $2X_OX_B$ ,  $2X_OX_Y$ ,  $2X_AX_B$  e  $2X_AX_Y$  correspondem às frequências esperadas para os genótipos O/A, O/B, O/demais alelos, A/B e A/demais alelos.

O teste de  $\chi^2$  foi realizado utilizando os graus de liberdade para cada raça, com cada enzima, em nível de significância de 5%, sendo que os graus de liberdade foram calculados por meio da fórmula:

$$gl = k - 1 - m$$

Em que  $k$ , corresponde ao número de classes utilizadas e  $m$ , corresponde ao número de parâmetros utilizados. O teste foi realizado na hipótese de que os rebanhos estariam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que não houve seleção e nenhuma correlação com o gene DRB3 nos rebanhos analisados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Reações de PCR e otimização de iniciadores de PCR

A reação de PCR para a otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores de PCR amplificou um fragmento de aproximadamente 300 bp, como descrito por Sigurdardóttir et al. (1991), que obteve um fragmento de 304 bp. A reação de PCR feita para a otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores de PCR foi realizada em gradiente de temperatura, onde a temperatura de 62°C foi a mais adequada por gerar um produto de PCR mais robusto. A Figura 1 ilustra um gel de agarose contendo seis produtos de PCR, em gradiente de temperatura de anelamento, demonstrando os diferentes níveis de amplificação, revelando a temperatura de 62°C a mais indicada para esse par de iniciadores para PCR.

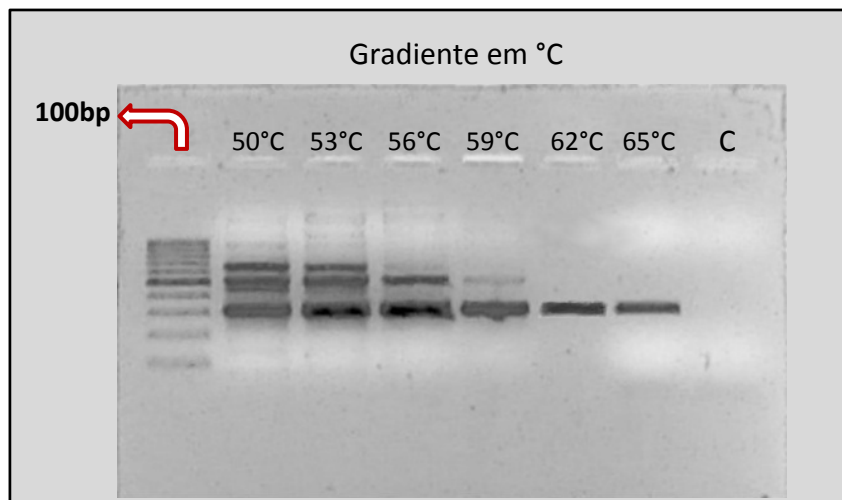


Figura 1 – Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, apresentando produtos de PCR (300 bp) com DNA de búfalo em um experimento de PCR com gradiente de temperaturas de anelamento (50°C até 65°C). C = Controle negativo (reação de PCR sem DNA).

## 4.2. Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

A digestão dos produtos de PCR com o DNA de animais das três raças analisadas, com as três enzimas de restrição apresentou 14 alelos e 19 genótipos diferentes, evidenciando que a técnica de PCR-RFLP se mostra útil para a análise de polimorfismos genéticos no gene DRB3.

Os produtos de PCR digeridos com a enzima de restrição *RsaI* apresentaram oito alelos, cujos tamanhos dos fragmentos aproximados encontram-se descritos a seguir: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp), *RsaI*-B (180+120 bp), *RsaI*-C (130+90+70 bp), *RsaI*-D (140+90+70 bp), *RsaI*-E (120+70+60 bp), *RsaI*-F (120+110+70 bp) e *RsaI*-G (110+70+60+55 bp). Com a enzima de restrição *HaeIII* foram observados quatro alelos: *HaeIII*-A (220+80 bp), *HaeIII*-B (170+80+50 bp), *HaeIII*-C (210+80 bp) e *HaeIII*-D (170+130 bp). A digestão com a enzima de restrição *PstI* apresentou três alelos: O (300 bp), *PstI*-A (230+70 bp) e *PstI*-B (210+90 bp). Um esquema contendo os tamanhos aproximados dos alelos, obtidos por meio da digestão dos produtos de PCR das três raças, com cada uma das enzimas, está ilustrado na Figura 2.

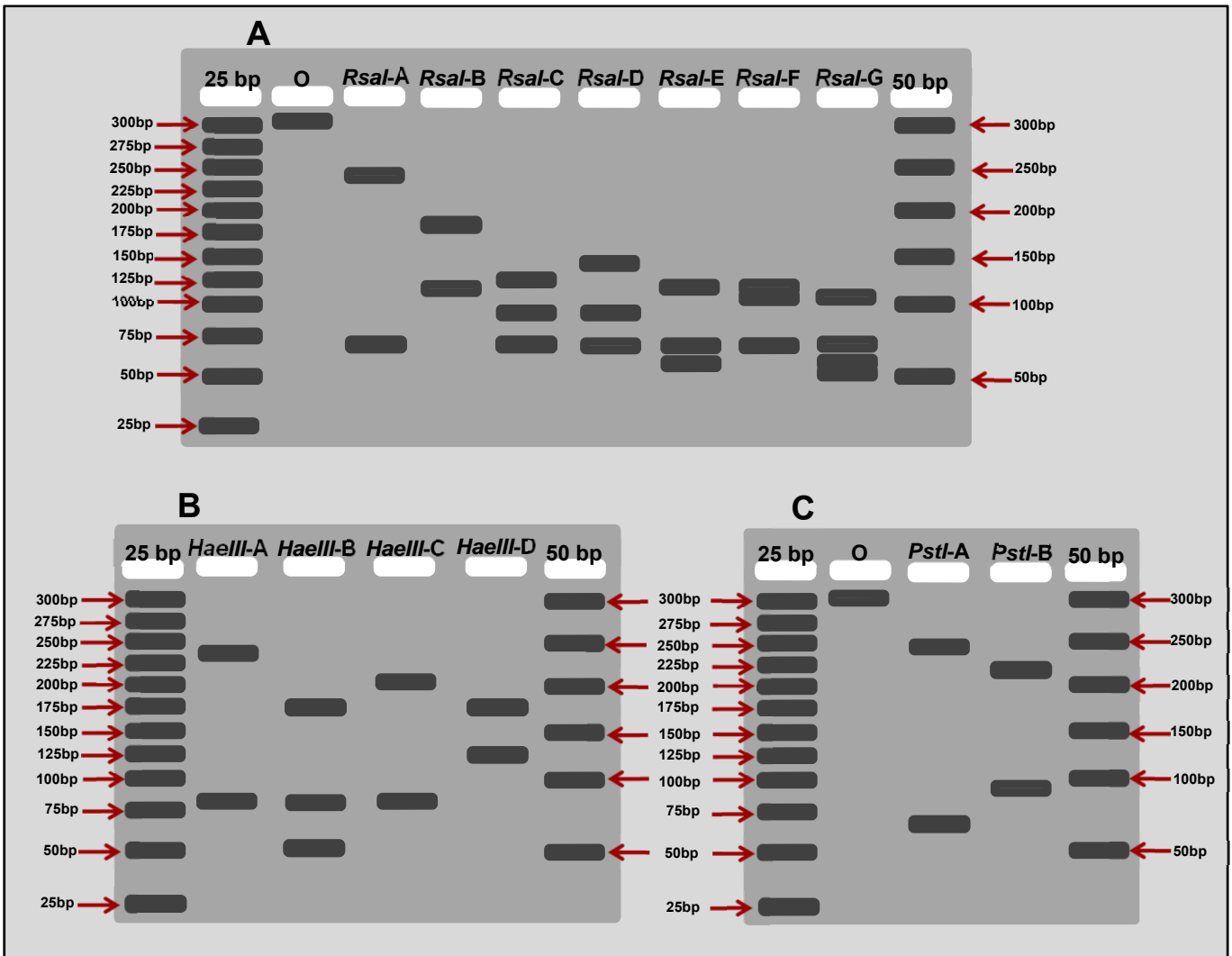


Figura 2 – Esquema ilustrativo dos alelos do gene DRB3, obtidos por meio da digestão dos produtos de PCR das raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah (300 bp), com as enzimas de restrição *RsaI*, *HaeIII* e *PstI*. **A** = Esquema dos alelos obtidos com a enzima *RsaI*. **B** = Esquema dos alelos obtidos com a enzima *HaeIII*. **C** = Esquema dos alelos obtidos com a enzima *PstI*.

### 4.3. Genotipagem dos animais

#### Enzima *RsaI*

A digestão realizada com a enzima de restrição *RsaI*, dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Mediterrâneo, apresentou cinco alelos: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp), *RsaI*-B (180+120 bp), *RsaI*-C (130+90+70 bp) e *RsaI*-E (120+70+60 bp). Os alelos encontrados apresentaram quatro genótipos diferentes: O/O, O/*RsaI*-A, *RsaI*-A/*RsaI*-B, *RsaI*-C/*RsaI*-E.

Por meio da digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Jafarabadi, foram observados quatro alelos: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp), *RsaI*-F (120+110+70 bp) e *RsaI*-G (110+70+60+55 bp). Os alelos obtidos apresentaram cinco genótipos diferentes. Os genótipos homocigotos formados com os alelos foram: O/O, *RsaI*-A/*RsaI*-A, *RsaI*-F/*RsaI*-F. Os genótipos heterocigotos foram: O/*RsaI*-A, O/*RsaI*-G.

Os alelos obtidos com a digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Murrah foram: O (300 bp), *RsaI*-A (230+70 bp) e *RsaI*-D (140+90+70 bp). Os três alelos obtidos com produtos de PCR da raça Murrah, foi o menor número de alelos encontrados com a enzima *RsaI*, comparado com os outros produtos de PCR das raças Mediterrâneo e Jafarabadi. Os genótipos apresentados com os alelos foram dois homocigotos (O/O e *RsaI*-D/*RsaI*-D) e um heterocigoto (O/*RsaI*-A). A Figura 3 apresenta géis de agarose 4% contendo alguns dos alelos obtidos com a enzima de restrição *RsaI* com o DNA de quatro animais da raça Mediterrâneo (A), quatro animais da raça Jafarabadi (B) e quatro animais da raça Murrah (C).

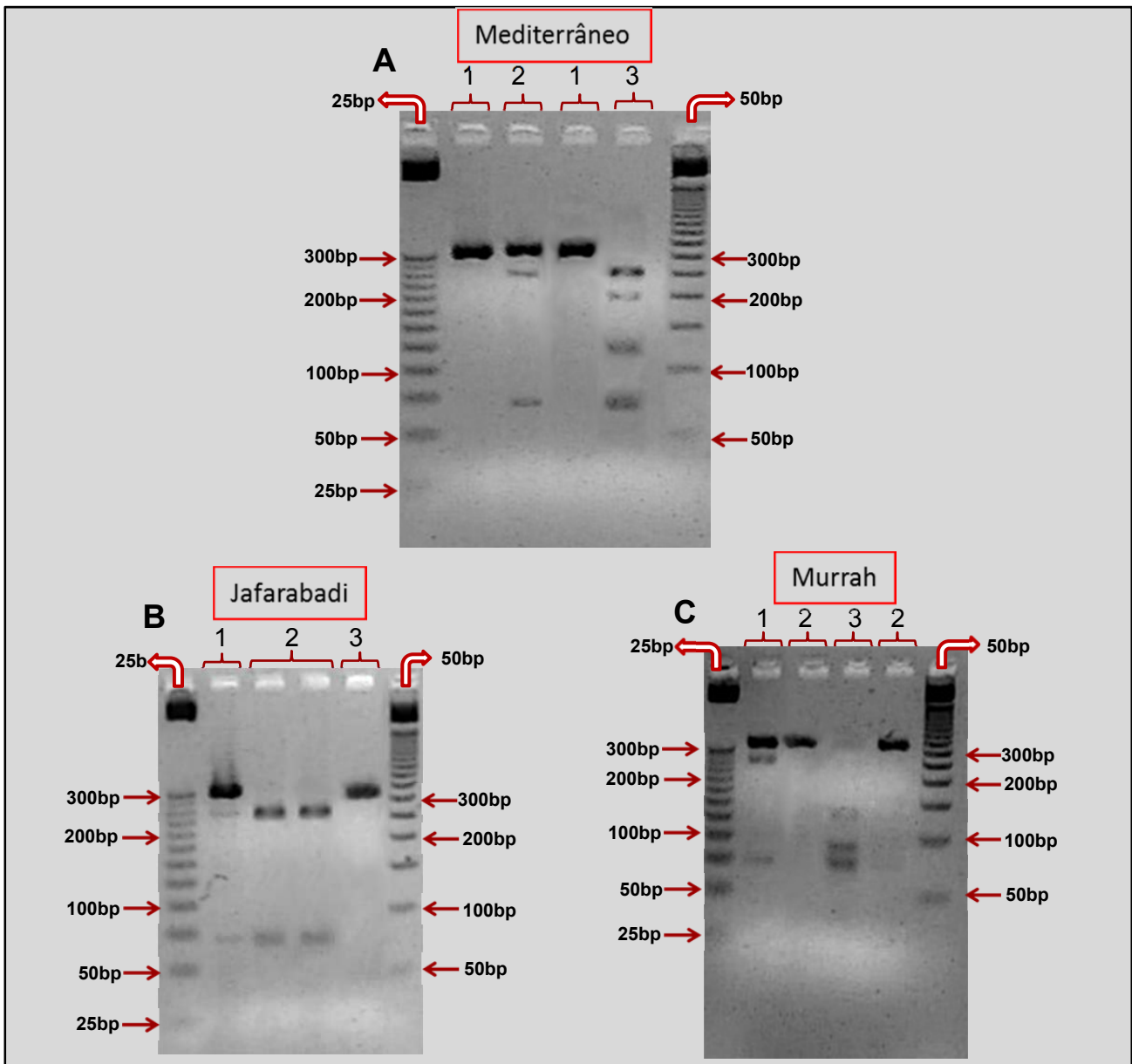


Figura 3 – Géis de agarose 4%, corados com brometo de etídio, ilustrando os alelos obtidos com a enzima de restrição *RsaI*. **A** = Gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de quatro animais da raça Mediterrâneo: 1 = alelo O (300 bp); 2 = alelos O (300 bp) e *RsaI*-A (230+70 bp); 3 = alelo O (300 bp); 4 = alelos *RsaI*-A e *RsaI*-B. **B** = Gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de quatro animais da raça Jafarabadi: 1 = alelo O e alelo *RsaI*-A; 2 = alelo *RsaI*-A; 3 = alelo O. **C** = Gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de quatro animais da raça Murrah: 1 = alelo O e alelo *RsaI*-A; 2 = alelo O; 3 = alelo *RsaI*-D. **25bp** = Marcador molecular de 25 bp; **50bp** = Marcador Molecular de 50 bp.

### **Enzima *HaeIII***

A digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Mediterrâneo, com a enzima de restrição *HaeIII*, apresentou quatro alelos: *HaeIII*-A(220+80 bp), *HaeIII*-B (170+80+50 bp), *HaeIII*-C (210+80 bp) e *HaeIII*-D (170+130 bp). Foram observados sete genótipos diferentes com os alelos encontrados com a enzima *HaeIII*. Dos sete genótipos encontrados, dois foram homozigotos (*HaeIII*-A/*HaeIII*-A e *HaeIII*-D/*HaeIII*-D) e cinco foram heterozigotos (*HaeIII*-A/*HaeIII*-B, *HaeIII*-A/*HaeIII*-C, *HaeIII*-A/*HaeIII*-D, *HaeIII*-B/*HaeIII*-D e *HaeIII*-C/*HaeIII*-D).

A digestão realizada dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Jafarabadi apresentou dois alelos: *HaeIII*-A (220+80 bp) e *HaeIII*-D (170+130 bp). Os produtos de PCR dos animais da raça Jafarabadi digeridos com a enzima *HaeIII* apresentaram três genótipos, dois homozigotos (*HaeIII*-A/*HaeIII*-A e *HaeIII*-D/*HaeIII*-D) e um heterozigoto (*HaeIII*-A/*HaeIII*-D).

A digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Murrah apresentou os mesmos alelos observados em produtos de PCR da raça Jafarabadi: *HaeIII*-A(220+80 bp) e *HaeIII*-D (170+130 bp). Os produtos de PCR dos animais da raça Murrah digeridos com a enzima *HaeIII* apresentaram três genótipos, dois homozigotos (*HaeIII*-A/*HaeIII*-A e *HaeIII*-D/*HaeIII*-D) e um heterozigoto (*HaeIII*-A/*HaeIII*-D). A Figura 4 apresenta três géis de agarose 4% contendo os alelos obtidos com a enzima de restrição *HaeIII* em cinco animais da raça Mediterrâneo (A), quatro animais da raça Murrah (B) e quatro animais da raça Jafarabadi (C).

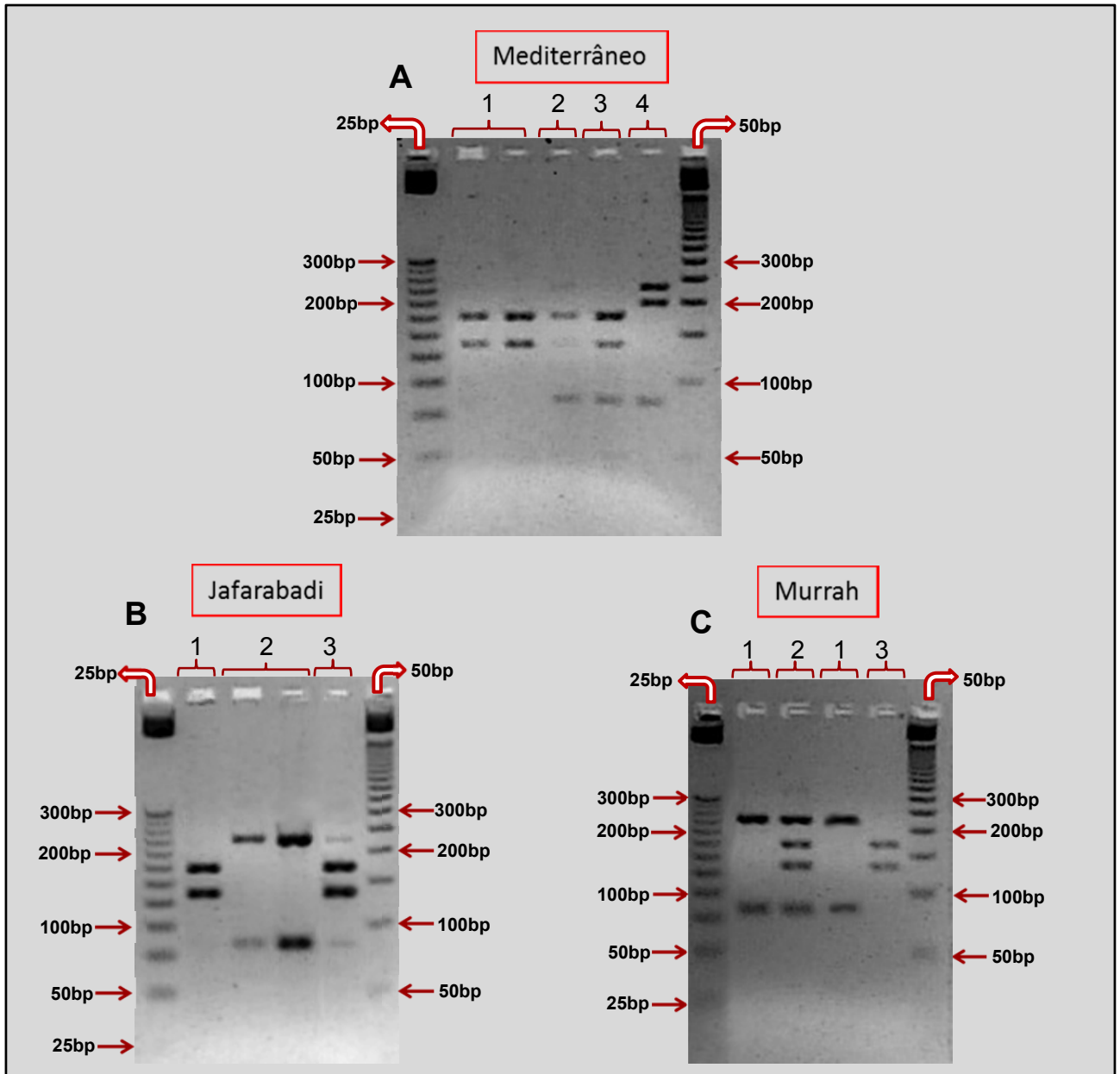


Figura 4 – Géis de agarose 4%, corados com brometo de etídio, ilustrando os alelos obtidos com a enzima de restrição *Haelll*. **A** = Foto do gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de cinco animais da raça Mediterrâneo: 1 = alelo *Haelll*-D (170+130 bp); 2 = alelos *Haelll*-A (220+80 bp) e *Haelll*-D; 3 = alelos *Haelll*-B (170+80+50 bp) e *Haelll*-D; 4 = alelos *Haelll*-A e *Haelll*-C (210+80 bp). **B** = Foto do gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de quatro animais da raça Jafarabadi: 1 = alelo *Haelll*-D; 2 = alelo *Haelll*-A; 3 = alelos *Haelll*-A e *Haelll*-D. **C** = Foto do gel ilustrando os alelos obtidos com o DNA de quatro animais da raça Murrah: 1 = alelo *Haelll*-A; 2 = alelos *Haelll*-A e *Haelll*-D; 3 = alelo *Haelll*-D. **25bp** = Marcador molecular de 25 bp; **50bp** = Marcador Molecular de 50 bp.

### Enzima *PstI*

Os produtos de PCR com o DNA de animais da raça Jafarabadi digeridos com a enzima de restrição *PstI* apresentaram três alelos: O (300 bp), *PstI*-A (230+70 bp) e *PstI*-B (210+90 bp). Os alelos foram observados em três genótipos diferentes. Foram observados um genótipo heterozigoto (*PstI*-A/*PstI*-B) e dois genótipos homozigotos (O/O e *PstI*-A/*PstI*-A).

A digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Mediterrâneo apresentou dois alelos: O (300 bp), *PstI*-A (230+70 bp). A digestão com a enzima *PstI* apresentou dois genótipos, um homozigoto para o alelo O (300bp/300bp) e um genótipo heterozigoto (O/*PstI*-A). O genótipo heterozigoto foi encontrado em apenas três animais dos 24 analisados.

Os produtos de PCR com o DNA de animais da raça Murrah, digeridos com a enzima de restrição *PstI*, apresentaram os mesmos alelos observados com produtos de PCR de animais da raça Mediterrâneo: O (300 bp) e *PstI*-A (230+70 bp). Os genótipos obtidos com a enzima *PstI*, foram os mesmos encontrados nos produtos de PCR de animais da raça Mediterrâneo, um genótipo homozigoto para o alelo O (300bp/300bp) e um genótipo heterozigoto (O/*PstI*-A). A Figura 5 ilustra géis de agarose 4% contendo os alelos obtidos com a enzima de restrição *PstI* em quatro animais da raça Jafarabadi (A), cinco animais da raça Mediterrâneo (B) e quatro animais da raça Murrah (C).



As frequências dos alelos obtidos para os animais de cada uma das raças de búfalo de rio, com as três enzimas de restrição utilizadas, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequências dos alelos do gene DRB3, obtidos com o DNA dos animais das raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah, digeridos pelas enzimas de restrição *RsaI*, *HaeIII* e *PstI*.

Alelos	Nome do alelo	Frequências alélicas/Raça		
		Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah
<b><i>RsaI</i></b>		<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>
300 bp	O	52,50%	60,53%	78,13%
240+60 bp	RsaI-A	22,50%	23,68%	9,38%
180+120 bp	RsaI-B	15,00%	-	-
120+95+70 bp	RsaI-C	5,00%	-	-
140+90+70 bp	RsaI-D	-	-	12,50%
120+70+60 bp	RsaI-E	5,00%	-	-
120+115+70 bp	RsaI-F	-	10,53%	-
115+70+65+50 bp	RsaI-G	-	5,26%	-
<b><i>HaeIII</i></b>		<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>
220+80 bp	HaeIII-A	39,13%	43,48%	53,33%
170+80+50 bp	HaeIII-B	17,39%	-	-
200+90 bp	HaeIII-C	8,70%	-	-
170+130 bp	HaeIII-D	34,78%	56,52%	46,67%
<b><i>PstI</i></b>		<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>	<b>Total: 100%</b>
300 bp	O	93,75%	77,27%	91,67%
230+70 bp	PstI-A	6,25%	15,91%	8,33%
210+90 bp	PstI-B	-	6,82%	-

Cálculos das frequências alélicas (cálculo da frequência do alelo *RsaI*-A na raça Mediterrâneo):  $p(RsaI-A) = [N_{AA} + (0,5N_{AO}) + (0,5N_{AB})]/N$ . Onde  $N_{AA}$  é o número de indivíduos homocigotos para o alelo *RsaI*-A,  $N_{AO}$  é o número de indivíduos heterocigotos para os alelos *RsaI*-A e O,  $N_{AB}$  é o número de indivíduos heterocigotos para os alelos *RsaI*-A e *RsaI*-B e N é o número total de indivíduos na população (FALCONER; MACKAY, 1996).

Analisando as frequências alélicas, foi possível observar que com a enzima de restrição *RsaI*, o alelo O (300 bp) foi o mais frequente entre os animais de todas as raças. Resultado também observado no estudo de

Aravindakshan, Nainar e Sivaselvam (2000), apresentando o alelo O (alelo “o”) e alelo *RsaI*-D (alelo “l”) como os alelos mais frequentes em um grupo de animais da raça Murrah provenientes da Índia, utilizando a enzima de restrição *RsaI*. Outro trabalho que obteve o mesmo resultado, também com búfalos indianos da raça Murrah, foi descrito por Kumar et al. (2011), cujo alelo O (alelo “o”) foi também identificado como o mais frequente nos animais avaliados naquele estudo.

Analisando os alelos, verificou-se que o alelo O (300 bp) não foi observado com a digestão com a enzima *HaeIII*, resultado contrário ao obtido com as enzimas *RsaI* e *PstI*. Tal resultado também foi obtido nos estudos de Acharya et al. (2002); Kumar; Sangwan e Rupender (2008) e Sumathi et al. (2010), analisando búfalos das raças Murrah, Surti, Nili-Ravi, Jafarabadi e Mehsani.

Os produtos de PCR obtidos com o DNA dos animais da raça Mediterrâneo apresentaram cinco alelos com a enzima *RsaI*, cujos alelos *RsaI*-B, *RsaI*-C e *RsaI*-E foram observados somente em animais desta raça. Os produtos de PCR obtidos com o DNA dos animais da raça Jafarabadi apresentaram quatro alelos com a enzima *RsaI*, em que os alelos *RsaI*-F e *RsaI*-G foram observados em animais somente desta raça. Os produtos de PCR obtidos com o DNA de animais provenientes da raça Murrah apresentaram três alelos após a digestão com a enzima *RsaI*. Tais observações revelam que o DNA dos animais analisados das raças Mediterrâneo e Jafarabadi possuem maior diversidade genética, quando comparados com o DNA dos animais analisados da raça Murrah, tendo seus produtos de PCR digeridos com a enzima *RsaI*.

Observando a digestão dos produtos de PCR do DNA dos animais da raça Mediterrâneo, foram encontrados quatro alelos (*HaeIII*-A a *HaeIII*-D) com a enzima *HaeIII*, resultado observado também nos estudos de Kumar; Sangwan e Rupender (2008) e Sumathi et al. (2010). No estudo de Kumar et al. (2011), além dos quatro alelos encontrados neste trabalho, foi observado também o alelo O em animais da raça Murrah.

A digestão dos produtos de PCR do DNA dos animais das raças Jafarabadi e Murrah apresentaram dois alelos com a enzima *HaeIII* (*HaeIII-A* e *HaeIII-D*). Por meio da digestão dos produtos de PCR com o DNA dos animais da raça Jafarabadi, com a enzima *PstI*, foram encontrados três alelos (O, *PstI-A* e *PstI-B*). Os produtos de PCR com o DNA dos animais das raças Mediterrâneo e Murrah, digeridos com a enzima *PstI*, apresentaram dois alelos (O e *PstI-A*). Estas observações indicam que o DNA dos animais analisados da raça Mediterrâneo, com as enzimas *RsaI* e *HaeIII*, possuem maior diversidade alélica que o DNA dos animais das outras raças analisadas. Desta mesma forma, o DNA dos animais analisados da raça Jafarabadi, que tiveram seus produtos de PCR digeridos com a enzima *PstI*, possuem maior diversidade alélica que o DNA dos animais das outras raças analisadas.

As frequências dos genótipos observados para os animais de cada uma das raças de búfalo, após a digestão com as três enzimas de restrição utilizadas, estão descritas na Tabela 3. O número de animais varia em relação às enzimas de restrição utilizadas, pois os genótipos quando observados em apenas um único animal foram excluídos das frequências genotípicas, evitando enviesar o cálculo do teste do  $X^2$  (Qui-quadrado).

Tabela 3 – Frequências dos genótipos obtidos com os alelos do gene DRB3, em animais das raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah, obtidas pela digestão com as enzimas de restrição *Rsal*, *HaeIII* e *PstI*.

Genótipo/Enzima	Nº de Animais/Raça			Frequências genotípicas/Raça		
	Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah	Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah
<b><i>Rsal</i></b>	<b>Total: 20</b>	<b>Total: 19</b>	<b>Total: 16</b>			
O/O	9	9	11	45,00%	47,37%	68,75%
O/ <i>Rsal</i> -A	3	3	3	15,00%	16%	18,75%
O/ <i>Rsal</i> -G	-	2	-	-	10,53%	-
<i>Rsal</i> -A/ <i>Rsal</i> -A	-	3	-	-	16%	-
<i>Rsal</i> -A/ <i>Rsal</i> -B	6	-	-	30%	-	-
<i>Rsal</i> -C/ <i>Rsal</i> -F	2	-	-	10,00%	-	-
<i>Rsal</i> -D/ <i>Rsal</i> -D	-	-	2	-	-	12,50%
<i>Rsal</i> -F/ <i>Rsal</i> -F	-	2	-	-	10,53%	-
<b><i>HaeIII</i></b>	<b>Total: 23</b>	<b>Total: 23</b>	<b>Total: 15</b>			
<i>HaeIII</i> -A/ <i>HaeIII</i> -A	4	5	7	17,39%	21,74%	46,67%
<i>HaeIII</i> -A/ <i>HaeIII</i> -B	3	-	-	13,04%	-	-
<i>HaeIII</i> -A/ <i>HaeIII</i> -C	2	-	-	8,70%	-	-
<i>HaeIII</i> -A/ <i>HaeIII</i> -D	5	10	2	21,74%	43,48%	13,33%
<i>HaeIII</i> -B/ <i>HaeIII</i> -D	5	-	-	21,74%	-	-
<i>HaeIII</i> -C/ <i>HaeIII</i> -D	2	-	-	8,70%	-	-
<i>HaeIII</i> -D/ <i>HaeIII</i> -D	2	8	6	8,70%	34,78%	40,00%
<b><i>PstI</i></b>	<b>Total: 24</b>	<b>Total: 22</b>	<b>Total: 18</b>			
O/O	21	17	15	87,50%	77,27%	83,33%
O/ <i>PstI</i> -A	3	-	3	12,50%	-	16,67%
<i>PstI</i> -A/ <i>PstI</i> -A	-	2	-	-	9,09%	-
<i>PstI</i> -A/ <i>PstI</i> -B	-	3	-	-	13,64%	-

Cálculos das frequências genotípicas (cálculo da frequência do genótipo O/O na raça Mediterrâneo):  $F(O/O) = N_{OO}/N$ . Em que  $N_{OO}$  é o número de indivíduos homocigotos para o alelo O e N é o número total de indivíduos na população (FALCONER; MACKAY, 1996).

Analisando as frequências genotípicas, foi observado que, com a enzima de restrição *Rsal* e *PstI*, o genótipo homocigoto O/O é o mais frequente nos animais avaliados. Analisando os genótipos obtidos com a enzima *HaeIII*, foi possível observar que os genótipos heterocigotos *HaeIII*-A/*HaeIII*-D e *HaeIII*-B/*HaeIII*-D, foram os mais frequentes no rebanho da raça Mediterrâneo, cada genótipo com frequência de 21,74%, indicando variabilidade genética entre os alelos. Na raça Jafarabadi, com a enzima *HaeIII*, foi observado que o genótipo

heterozigoto para os dois alelos encontrados (*HaeIII-A/HaeIII-D*) foi o mais frequente, também indicando variabilidade genética.

Comparando os alelos observados com as fazendas de origem dos animais avaliados, foi observado que o alelo *RsaI-F* somente aparecem nos animais da raça Jafarabadi provenientes da fazenda Santa Rita do Marajó no Pará. Os animais da raça Murrah oriundos da fazenda Itaqui no Pará exibiram os genótipos homozigotos com os alelos *HaeIII-A* e *HaeIII-D* obtidos com a enzima *HaeIII*. Os animais da raça Murrah provenientes da fazenda Santa Rita do Marajó (PA) que tiveram seus produtos de PCR digeridos com a enzima *HaeIII*, apresentaram o genótipo heterozigoto observado com os alelos obtidos com esta enzima. Este fato sugere que os animais da raça Murrah provenientes da fazenda Santa Rita do Marajó (PA) possuem maior variabilidade genética.

As frequências observadas para os genótipos encontrados no presente trabalho, com os animais pertencentes às três raças de búfalo, quando comparadas às frequências esperadas pelo teste de  $X^2$  (Qui-quadrado) ao nível de significância de 5%, mostram valores do teste variantes, dependendo da enzima utilizada. Alguns valores são maiores que o valor tabelado do teste do  $X^2$  ( $X^2_{\text{obs}} < X^2_{\text{t}}$ ), indicando que o rebanho analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto outros valores são menores que o valor tabelado do teste do  $X^2$  ( $X^2_{\text{obs}} > X^2_{\text{t}}$ ), indicando que o rebanho analisado está em desequilíbrio, revelando correlação com os polimorfismos do gene DRB3. Os valores das frequências esperadas, frequências observadas, o valor do teste do  $X^2$ , o grau de liberdade de cada teste e o valor tabelado do teste de  $X^2$  ao nível de significância de 5%, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Teste do  $\chi^2$  (Qui-quadrado) realizado com as frequências estimadas e observadas dos genótipos obtidos para os DNA de animais das três raças de búfalos analisadas, digeridos pelas enzimas de restrição *Rsal*, *HaeIII* e *PstI*.

Mediterrâneo Teste $\chi^2$																	
ENZIMA <i>Rsal</i>					ENZIMA <i>HaeIII</i>					ENZIMA <i>PstI</i>							
genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)
O/O	5,5125	9	2,2064			HaeIII-A/HaeIII-A	3,5217	4	0,0649			O/O	21,0938	21	0,0004		
O/Rsal-A	4,7250	3	0,6298			HaeIII-A/HaeIII-B	3,1304	3	0,0054			O/PstI-A	2,8125	3	0,0125		
O/Rsal-B	3,1500	0	3,1500			HaeIII-A/HaeIII-C	1,5652	2	0,1208			PstI-A/PstI-A	0,0938	0	0,0938		
O/Rsal-C	1,0500	0	1,0500			HaeIII-A/HaeIII-D	6,2609	5	0,2539			-	-	-	-		
O/Rsal-F	1,0500	0	1,0500			HaeIII-B/HaeIII-B	0,6957	0	0,6957			-	-	-	-		
Rsal-A/Rsal-A	1,0125	0	1,0125			HaeIII-B/HaeIII-C	0,6957	0	0,6957			-	-	-	-		
Rsal-A/Rsal-B	1,3500	6	16,0167			HaeIII-B/HaeIII-D	2,7826	5	1,7670			-	-	-	-		
Rsal-A/Rsal-C	0,4500	0	0,4500	9	16,919	HaeIII-C/HaeIII-C	0,1739	0	0,1739	5	11,070	-	-	-	-	1	3,841
Rsal-A/Rsal-F	0,4500	0	0,4500			HaeIII-C/HaeIII-D	1,3913	2	0,2663			-	-	-	-		
Rsal-B/Rsal-B	0,4500	0	0,4500			HaeIII-D/HaeIII-D	2,7826	2	0,2201			-	-	-	-		
Rsal-B/Rsal-C	0,3000	0	0,3000			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-B/Rsal-F	0,3000	0	0,3000			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-C/Rsal-C	0,0500	0	0,0500			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-C/Rsal-F	0,1000	2	36,1000			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-F/Rsal-F	0,0500	0	0,0500			-	-	-	-			-	-	-	-		
<b>TOTAL:</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>63,2653</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>4,2637</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>0,1067</b>		

Jafarabadi Teste $\chi^2$																	
ENZIMA <i>Rsal</i>					ENZIMA <i>HaeIII</i>					ENZIMA <i>PstI</i>							
genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)
O/O	6,9605	9	0,5976			HaeIII-A/HaeIII-A	4,3478	5	0,0978			O/O	13,1364	17	1,1364		
O/Rsal-A	5,4474	3	1,0995			HaeIII-A/HaeIII-D	11,3043	10	0,1505			O/PstI-A	5,4091	2	2,1486		
O/Rsal-G	2,4211	0	2,4211			HaeIII-D/HaeIII-D	7,3478	8	0,0579			O/PstI-B	2,3182	0	2,3182		
O/Rsal-H	1,2105	2	0,5149			-	-	-	-			PstI-A/PstI-A	0,5568	0	0,5568		
Rsal-A/Rsal-A	1,0658	3	3,5102	5	11,070	-	-	-	-	1	3,841	PstI-A/PstI-B	0,4773	3	13,3344	2	5,991
Rsal-A/Rsal-G	0,9474	0	0,9474			-	-	-	-			PstI-B/PstI-B	0,1023	0	0,1023		
Rsal-A/Rsal-H	0,4737	0	0,4737			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-G/Rsal-G	0,2105	2	15,2105			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-G/Rsal-H	0,2105	0	0,2105			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-H/Rsal-H	0,0526	0	0,0526			-	-	-	-			-	-	-	-		
<b>TOTAL:</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>25,0380</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>0,3062</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>19,5966</b>		

Murrah Teste $\chi^2$																	
ENZIMA <i>Rsal</i>					ENZIMA <i>HaeIII</i>					ENZIMA <i>PstI</i>							
genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)	genótipos esperados	Ne	No	$\chi^2$	gl	nf(5%)
O/O	9,7656	11	0,1560			HaeIII-A/HaeIII-A	4,2667	7	1,7510			O/O	15,1250	15	0,0010		
O/Rsal-A	2,3438	3	0,1838			HaeIII-A/HaeIII-D	7,4667	2	4,0024			O/PstI-A	2,7500	3	0,0227		
O/Rsal-D	3,1250	0	3,1250	2	5,991	HaeIII-D/HaeIII-D	3,2667	6	2,2871	1	3,841	PstI-A/PstI-A	0,1250	0	0,1250	1	3,841
Rsal-A/Rsal-A	0,1406	0	0,1406			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-A/Rsal-D	0,3750	0	0,3750			-	-	-	-			-	-	-	-		
Rsal-D/Rsal-D	0,2500	2	12,2500			-	-	-	-			-	-	-	-		
<b>TOTAL:</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16,2304</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>8,0405</b>			<b>TOTAL:</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>0,1488</b>		

**Ne** = Número de animais esperados; **No** = Número de animais observados; **gl** = grau de liberdade; **nf(5%)** = nível de significância de 5%;  **$\chi^2$**  = Qui-quadrado ( $\sum(\text{No} - \text{Ne})^2/\text{Ne}$ ) (FALCONER; MACKAY, 1996);.

Por meio dos valores do teste do  $\chi^2$  (Qui-quadrado) foi observado que, com os graus de liberdade do teste, ao nível de significância de 5%, as três enzimas apresentaram valores de teste que indicam que os rebanhos

analisados podem estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg ou não, ou seja, não foi possível constatar se houve nestes rebanhos alguma seleção para o gene DRB3.

Os resultados encontrados neste trabalho se mostram de relevante importância, pois podem ser utilizados em programas de melhoramento genético de rebanhos leiteiros e também de rebanhos de corte, como por exemplo, a utilização de tais dados em sumários de touros, apontando os animais mais compatíveis com as matrizes a serem inseminadas.

Desta forma, os rebanhos poderiam apresentar uma maior longevidade produtiva, pois selecionando os animais ideais para cruzamentos, o produtor evitaria problemas reprodutivos futuros, além de selecionar também, os animais mais resistentes à doenças infecciosas.

## 5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, verificou-se a presença de polimorfismos no segundo éxon do gene DRB3 em raças de búfalos criados no Brasil, onde foram encontrados por meio da técnica de PCR-RFLP, 14 alelos e 19 genótipos, no segundo éxon do gene DRB3, se caracterizando como uma região muito polimórfica do MHC bubalino.

Por meio da análise dos resultados, foi observado que os animais da raça Mediterrâneo possuem maior variedade de alelos comparado aos animais analisados das raças Jafarabadi e Murrah, quando seus produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *RsaI* e *HaeIII*. Também foi possível observar que os animais analisados das raças Jafarabadi e Murrah, provenientes da fazenda Santa Rita do Marajó no Pará, possuem maior diversidade genética, apresentando maior número de alelos.

Os polimorfismos encontrados neste gene do MHC contribuem para a seleção de animais mais resistentes à doenças prejudiciais para a produção e também para a escolha ideal de animais para cruzamentos em programas de melhoramento genético, justificando a sua utilização em estudos de variabilidade genética.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, C. P.; PIPALIA, D. L.; RANK, D. N.; JOSHI, C. G.; BRAHMKSHTRI, B. P.; SOLANKI, J. V.; SHAH, R. R. BoLa-DRB3 gene polymorphism in Jafarabadi and Mehsani buffaloes as revealed by PCR-RFLP. **Indian Veterinary Journal**, v. 79, p. 652-656, 2002.

AHMED, S.; OTHMAN, O. E. The characterization of *HaeIII* patterns in the second exon of the buffalo MHC class II DRB gene. **Biotechnology**, v. 5, p. 514-516, 2006.

AMANO, T. Genetic differences between swamp and river buffaloes in biochemical and immunological characteristics. In: Proceedings of the Preconference Symposium of the 5th World Conference on Animal Production. **Japanese Society of Zootechnical Sciences**, Tsukuba, Japão, p. 131-135, 1983.

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

ANDRADE, V. J.; GARCIA, S. K. Alelos raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 39-45, 2005.

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.

AXFORD, R. F. E.; BISHOP, S. C.; NICHOLAS, F. W.; OWEN, J. B. **Breeding for Disease Resistance in Farm Animals**. CABI Publishing, Okon, UK. 2 ed., 2000.

BAINBRIDGE, D. R. J.; SARGENT, I. L.; ELLIS, S. A. increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. **Reproduction**, v. 122, p. 907-913, 2001.

BALLINGALL, K. T.; NATH, M.; HOLLIMAN, A.; LAMING, E.; STEELE, P.; WILLOUGHBY, K. Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, p. 128-132, 2011.

BARKER, J. S. F.; TAN, S. G.; SELVARAJ, O. S.; MUKHERJEE, T. K. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 28, p. 1-13, 1997a.

BARKER, J. S. F.; MOORE, S. S.; HETZEL, D. J. S.; EVANS, D.; TAN, S. G.; BYRNE, K. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein coding loci. **Animal Genetics**, v. 28, p. 103-115, 1997b.

BERARDINO, D. D.; IANNUZZI, L. Chromosome banding homologies in Swamp and Murrah buffalo. **The Journal of Heredity**, v. 72, p. 183-188, 1981.

BIRCH, J.; MURPHY, L.; MACHUGH, N. D.; ELLIS, S. A. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC class I region. **Immunogenetics**, v. 58, p. 670-679, 2006.

BISHOP, S. C.; CHESNAIS, J.; STEAR, M. J. Breeding for disease resistance: issues and opportunities. In: PROCEEDINGS OF THE 7TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7., 2002, Montpellier, França. **Anais...** França: INRA, Comunicação 13-01, 2002.

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, 10 p., 2009.

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.

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

CHU, M. X.; YE, S. C.; QIAO, L.; WANG, J. X.; FENG, T.; HUANG, D. W.; CAO, G. L.; DI, R.; FANG, L.; CHEN, G. H. Polimorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 2909-2914, 2012.

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

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

DEAKIN, J. E.; PAPENFUSS, A. T.; BELOV, K.; CROSS, J. G. R.; COGGILL, P.; PALMER, S.; SIMS, S.; SPEED, P. T.; BECK, S.; GRAVES, J. A. M. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. **BMC Genomics**, v. 7, 14 p., 2006.

DIETZ, A. B.; COHEN, N. D.; TIMMS, L.; KEHRLI, M. E. JR. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 80, p. 406–412, 1997a.

DIETZ, A. B.; DETILLEUX, J. C.; FREEMAN, A. E.; KELLEY, D. H.; STABEL, J. R.; KEHRLI, M. E. JR. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 400-405, 1997b.

DI MEO, G. P.; PERUCATTI, A.; FLORIOT, S.; HAYES, H.; SCHIBLER, L.; INCARNATO, D.; DI BERARDINO, D.; WILLIAMS, J.; CRIBIU, E.; EGGEN, A.; IANNUZZI, L. An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*,  $2n = 50$ ) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal loci by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes. **Chromosome Research**, v. 16, p. 827-837, 2008.

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.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996, 464 p.

FAO (Food and Agriculture Organization). FAOSTAT: Agriculture data (2011). Disponível em: < <http://faostat.fao.org> >. Acesso em: 10 Mar. 2013.

FIROUZAMANDI, M.; SHOJA, J.; BARZEGARI, A.; ROSHANI, E. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastites in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 2224-2228, 2010.

FISCHER, H.; ULBRICH, F. Chromosomes of the Murrah buffalo and its crossbreds with the Asiatic swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie**, v. 84, p. 110-114, 1968.

GARCIA, S. K.; AMARAL A.; SALVADOR D. F. Situação da bubalinocultura mineira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 18-27, 2005.

GOLE, V. C.; SANGWAN, M. L.; BHUYAN, D. K.; RUPINDER; PRASAD, R. Genetic polymorphism in DRB3.2 gene and its association with mastitis in Murrah buffaloes. **Haryana Veterinarian**, v. 48, p. 58-60, 2009.

GUTIERREZ-ESPELETA, G. A.; HEDRICK, P. W.; KALINOWSKI, S. T.; GARRIGAN, D.; BOYCE, W. Is the decline of desert bighorn sheep from infectious disease the result of low MHC variation? **Heredity**, v. 86, p. 439-450, 2001.

HEDRICK, P. W.; PARKER, K. M.; MILLER, E. L.; MILLER, P. S. Major Histocompatibility Complex Variation in the endangered Przewalski's horse. **Genetics**, v. 152, p. 1701-1710, 1999.

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

IANNUZZI, L. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.,  $2n = 50$ ). Report of the committee for the standardization of banded karyotypes of the river buffalo. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 102-113, 1994.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm)>. Acesso em: 06 Nov. 2012.

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. 08-22, 2012.

JULIARENA, M. A.; POLI, M.; SALA, L.; CERIANI, C.; GUTIERREZ, S.; DOLCINI, G.; RODRÍGUEZ, E. M.; MARIÑO, B.; RODRÍGUEZ-DUBRA, C.; ESTEBAN, E. N. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. **Animal Genetics**, v. 39, p. 432-438, 2008.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. **Immunogenetics**, v. 56, p. 683-695, 2005.

KIKKAWA, Y.; YONEKAWA, H.; SUZUKI, H.; AMANO, T. Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variations in the mitochondrial gene by cytochrome b. **Animal Genetics**, v. 28, p. 195-201, 1997.

KLEIN, J.; SATO, A. Birth of the Major Histocompatibility Complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 47, p. 199-209, 1998.

KULBERG, S.; HERINGSTAD, B.; GUTTERSUD, O. A.; OLSAKER, I. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, p. 201-207, 2007.

KUMÁNOVICS, A.; TAKADA, T.; LINDAHL, K. F. Genomic organization of the mammalian MHC. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 629-657, 2003.

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.

LAU, C. H.; DRINKWATER, R. D.; YUSOFF, K.; TAN, S. G.; HETZEL, D. J. S.; BARKER, J. S. F. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. **Animal Genetics**, v. 29, p. 253-264, 1998.

LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E. Doenças infecciosas em búfalos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 7., 2009, Belo Horizonte. **Ciência Animal Brasileira – Anais eletrônicos...** Goiás: UFG, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7665/5438>>. Acesso em: 08 Nov. 2012.

LENSTRA, J. A.; BRADLEY, D. G. Systematics and phylogeny of cattle. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetics of cattle**. CAB International, New York, p. 1–14, 1999.

LOW, B. G.; HANSEN, P. J.; DROST, M.; GOGOLIN-EWENS, K. J. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 90, p. 235-243, 1990.

MACEACHERN, S.; MCEWAN, J.; GODDARD, M. Phylogenetic reconstruction and the identification of ancient polymorphism in the Bovini tribe (*Bovidae*, *Bovinae*). **BMC Genomics**, v. 10, 17 p., 2009.

MACGREGOR, R. **The Domestic Buffalo**. Tese apresentada no Royal College of Veterinary Surgeons. The Royal College of Veterinary Surgeons, Londres, p. 1-47, 1939.

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.

MANO FILHO, A. C. Raças de Búfalos. In: **Semana de Zootecnia 10**, Pirassununga, dezembro 1985. Campinas, Fundação Cargill, 1985. p. 149-157.

MARQUES, J. R. F. **Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa-SCT/Embrapa-CPATU, 2000. 176 p. (Coleção 500 Perguntas 500 respostas. Embrapa-SCT).

MILNER, C. M.; CAMPBELL, R. D. Genetic organization of the human MHC class III region. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 914-926, 2001.

MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIN, J. F. **Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada em terra firme, no Estado do Acre**. Rio Branco: Embrapa-CPAF-Acre, 1994. 19 p. (Boletim de pesquisa, 13).

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, 6 p., 2012.

MOSAFER, J.; NASSIRY, M. R. Identification of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Iranian Golpayegani Cattle by DNA Test. **Asian-Aust. Journal of Animal Science**, v. 18, p. 1691-1695, 2005.

NANDA, A. S.; NAKAO, T. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. **Animal Science Journal**, v. 74, p. 443-455, 2003.

NASKAR, S.; DEB, S. M.; NIRANJAN, S. K.; KUMAR, S.; SHARMA, D.; SAKARAM, D.; SHARMA, A. Molecular characterization of MHC-DRB cDNA in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Genetic and Molecular Biology**, v. 35, p. 95-98, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The water buffalo: new prospects for an underutilized animal**. Washington DC: National Academy Press, 111 p., 1981.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.

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.

OBBER, C. Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. **Human Reproduction Update**, v. 5, p. 103-107, 1999.

OLIVEIRA, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 122-134, 2005.

PENNY, L. A.; ARMSTRONG, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R.; COLLINS, R. A.; WATSON, E. D. Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 87-96, 1999.

PEREIRA, R. G. A.; MAGALHÃES, J. A.; SILVA NETTO, F. G.; TAVARES, A. C.; COSTA, N. L. Búfalo a máquina de produzir carne, leite e trabalho. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF-Rondônia, 1996, 14 p. (EMBRAPA-CPAF-Rondônia, Circular Técnica 24).

RAHIMNAHAL, S.; FAYAZI, J.; MIRZADEH, K.; NASSIRY, M. T. B.; ROSHANFEKR, H. Detection of allelic polymorphism in a gene of the Major Histocompatibility Complex of Iranian buffalo. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p. 1902-1904, 2010.

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.

RUPP, R.; HERNANDEZ, A.; MALLARD, B. A. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1029-1038, 2007.

RUSSELL, G. C.; SMITH, J. A.; OLIVER, R. A. Structure of the *BoLA-DRB3* gene and promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 31, p. 145-151, 2004.

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.

SENA, L.; SCHNEIDER, M. P. C.; BRENIG, B.; HONEYCUTT, R. L.; WOMACK, J. E.; SKOW, C. L. 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.; BRENIG, B. B.; HONEYCUTT, R. L.; HONEYCUTT, D. A.; WOMACK, J. E.; SKOW, C. L. Polymorphism and gene organization of water buffalo MHC-DQB genes show homology to the BoLA DQB region. **Animal Genetics**, v. 42, p. 378-385, 2011.

SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; DEKKERS, J. C. M.; LESLIE, K. E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 185-193, 1998.

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.

SIGURDARDÓTTIR, S.; BORSCH, C.; GUSTAFSSON, K.; ANDERSSON, L. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine MHC by PCR. **Animal Genetics**, v. 22, p. 199-209, 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.

SUMATHI, S.; KARTHICKEYAN, S. M. K.; SIVASELVAN, 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.

TAKAHASHI, K.; ROONEY, A. P.; NEI, M. Origins and divergence times of mammalian class II MHC gene clusters. **The Journal of Heredity**, v. 91, p. 198-205, 2000.

TOMAR, S. S.; TRIPATHI, V. N. Disease spectrum in a herd Murrah buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 64, p. 683-688, 1987.

TRAUL, D. L.; BHUSHAN, B.; ELDRIDGE, J. A.; CROWFORD, T. B.; LI, H.; DAVIES, C. J. Characterization of *Bison bison* major histocompatibility complex class IIa haplotypes. **Immunogenetics**, v. 57, p. 845-854, 2005.

TRAUL, D. L.; LI, H.; DASGUPTA, N.; O'TOOLE, D.; ELDRIDGE, J. A.; BESSER, T. E.; DAVIES, C. J. Resistance to malignant catarrhal fever in American bison (*Bison bison*) is associated with MHC class IIa polymorphisms. **Animal Genetics**, v. 38, p. 141-146, 2007.

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

VANDIEDONCK, C.; KNIGHT, J. C. The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 8, p. 379-394, 2009.

WOJDAK-MAKSYMIEC, K.; KMIEC, M.; KOWALEWSKA-LUCZAK, I.; WARLIŃSKI, M. DRB3 gene polymorphism and somatic cell count in milk of jersey cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p. 1295-1300, 2010.

XIE, T.; ROWEN, L.; AGUADO, B.; AHEARN, M. E.; MADAN, A.; QIN, S.; CAMPBELL, R. D.; HOOD, L. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. **Genome Research**, v. 13, p. 2621-2636, 2003.

YOSHIDA, T.; MUKOYAMA, H.; FURUTA, H.; KONDO, Y.; TAKESHIMA, S.; AINDA, Y.; KOSUGIYAMA, M.; TOMOGANE, H. Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 498-509, 2009.