



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

André Luiz Alves de Sá

**Utilização de células de trofoblasto de embriões partenogênicos na
descrição de haplótipos de *BoLA-DRB3-DQA-DQB***

**Belém
2015**

André Luiz Alves de Sá

**Utilização de células de trofoblasto de embriões partenogênicos
na descrição de haplótipos de *BoLA-DRB3-DQA-DQB***

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda

**Belém
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Sá, André Luiz Alves de, 1991-

Utilização de células de trofoblasto de embriões partenogênicos na descrição de haplótipos de bola-drb3-dqa-dqb / André Luiz Alves de Sá. - 2015.

Orientador: Moysés dos Santos Miranda.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2015.

1. Bovino - Reprodução. 2. Bovino - Embrião.
3. Embriologia veterinária. 4. Bovino -
Melhoramento genético. I. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

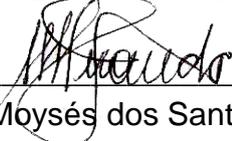
André Luiz Alves de Sá

**Utilização de células de trofoblasto de embriões partenogênicos
na descrição de haplótipos de *BoLA-DRB3-DQA-DQB***

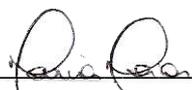
Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 30/03/2015

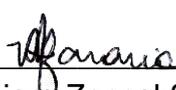
Banca Examinadora



Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
(Orientador)
Universidade Federal do Pará



Profª. Drª. Maria Helena Thomaz Maia
Universidade Federal do Pará



Drª. Naiara Zoccal Saraiva
Embrapa Amazônia Oriental

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Moysés dos Santos Miranda, e demais professores do Laboratório de Fertilização *In Vitro*, Simone do Socorro Damasceno Santos e Otávio Mitio Ohashi, pelo acolhimento no laboratório e oportunidade de desenvolver este trabalho. O apoio financeiro para a realização do cultivo foi essencial para esta pesquisa. Aos meus irmãos de laboratório, em especial Stefanne, Mayra, Miyuka, Priscilona, Alessandra, Nathália, Felipe, Cinthia, Edu, Paulo e Carol, que me ajudaram no que foi possível para o desenvolvimento deste projeto – fosse me cobrindo nas tarefas de rotina, me ajudando no experimento (neste caso, tendo paciência e compreensão da necessidade de puncionar, rastrear e plaquear os oócitos de cada fêmea separadamente), ou cantarolando comigo durante as rotinas de trabalho –, vocês foram imprescindíveis para que eu conseguisse conciliar o mestrado com o emprego.

Aos professores do Laboratório de Genética Humana e Médica, professores Leonardo dos Santos Sena, Maria Helena Tomaz Maia e Eduardo José Melo dos Santos, pela oportunidade de enveredar pela genética. Não foi fácil iniciar a pesquisa como geneticista escolhendo o grupo de genes mais complicados do genoma, mas vocês tornaram esse contato o mais didático, enriquecedor e aprazível possível (equivalente a um EJA em MHC). Ao meu coorientador Leonardo, agradeço o respeito, amizade e apoio, seja nas leituras dos manuscritos, discussão científica, caronas e discussões literárias. Aos meus novos irmãos de laboratório, André (o outro), Camily, Higo, Valéria, Dejair e Walquíria, por me ensinar o básico de um laboratório de genética e suas técnicas, pela amizade e por me avisar nos dias que teria festa (e, portanto, comida) no laboratório.

Aos parceiros deste projeto. À professora Maria Paula Cruz Schneider pelo financiamento parcial dos experimentos contidos nesta pesquisa e disponibilização da ajuda dos técnicos do Laboratório de Polimorfismo do DNA, Davi, Soraya e Silvanira, a quem devo muito. À Aline, por me ensinar a fazer a leitura do resultado de sequenciamento e experimentos pilotos deste trabalho. Ao professor Loren C. Skow e doutoranda Erika D. Downey, da Texas A&M University, pela realização da leitura dos SNPs de *BoLA* bem como disponibilização dos dados do ensaio para que fossem

feitas as análises. Suas contribuições ao manuscrito e publicação foram essenciais para que este trabalho fosse completado.

À minha família, pelo apoio incondicional, seja financeiro ou psicológico. Em especial, à minha mãe, Jacirema do Socorro Alves Sá, pelo exemplo de vida, amor e companheirismo. Ao meu pai, Luiz da Silva Sá Filho, pelo amparo e exemplo como profissional. Aos meus irmãos, Luiz da Silva Sá Neto e Thais Alves de Sá, pela paciência e convívio harmônico. Sem sombra de dúvidas, todos contribuíram para que este trabalho caminhasse da melhor forma possível. Ao meu namorado, Breno Filo Creão de Souza Garcia, pelo amor, companheirismo, compreensão e paciência, principalmente nos momentos de estresse e correria, que não foram poucos durante estes dois anos, e pela ilustração incluída na epígrafe.

Aos amigos “de fora”, pela compreensão nas muitas ausências devido ao trabalho, porém sem nunca deixarem de me convidar para sair e relaxar. Especialmente, à Jamille pelas discussões acadêmicas e “extra-acadêmicas”; às amigas do antigo trabalho, Alessandra e Patrícia, do Bosque Rodrigues Alves, por tudo; aos colegas do “novo” trabalho, professora Dora, Magda e Milton do Projeto Bio-Fauna/UFRA; e aos amigos de infância, Yan, Heitor, Américo, Paula, Pedro, Leandro, Felipe, João. Todos me ajudaram a dissipar os estresses e ainda me inspiram a continuar.

Às entidades de pesquisa pelo financiamento parcial deste projeto: CNPq, através do Universal 476510/2011-2; e The Whole System Genomics Initiative, pelo financiamento dos experimentos realizados nos EUA, pela Texas A&M University.

Aos membros das bancas avaliadoras de qualificação e defesa da dissertação de mestrado, pelas contribuições ao experimento e manuscrito.

À pós-graduação em Ciência Animal.

Peço desculpas àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho e que não foram citados.



*Calundu? Pos era um zebu daquela idade.
[...] Cor de céu que vem chuva.
[...] E até a lua começou a alumiar o Calundu
mais do que as outras coisas,
por respeito...*

João Guimarães Rosa

*"The gene does not lead,
it follows."*

Mary Jane West-Eberhard

RESUMO

A perspectiva de aumentar a produtividade do gado bovino a partir da aplicação de melhoramento genético do rebanho é cada vez mais estudada. Dentre as regiões genômicas mais estudadas e promissoras têm-se o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), já que este reúne genes importantes na resposta imunológica do animal, sendo possível selecionar marcadores nesta região para maior resistência a enfermidades e, portanto, maior produção pecuária. A diversidade do MHC bovino, conhecido como *BoLA* (*Bovine Leukocyte Antigens*), foi estudada inicialmente investigando seus genes isoladamente. A maioria dos bovinos são heterozigotos em *BoLA* e apenas em ocasiões especiais (animais homozigotos ou que possuam informação de pedigree) seu haplótipo pode ser caracterizado. Portanto, este trabalho objetivou desenvolver uma nova abordagem para descrever haplótipos de *BoLA* de vacas heterozigotas, utilizando células do trofoblasto de embriões partenogênicos bovinos. Dois métodos para validação desta abordagem foram utilizados: um painel de 445 SNPs em *BoLA* foi informativo acerca do efeito que a recombinação meiótica apresenta na zigose da região; e a comparação de alelos de *BoLA-DRB3* entre a fêmea bovina e sua célula trofoblástica partenogênica (CTP) demonstrou ser um método confiável e prático para a investigação de homozigose em *BoLA*. A partir de ambos os métodos, a metodologia desenvolvida aqui foi validada, já que CTPs homozigotas em *BoLA* foram derivadas de vacas heterozigotas, permitindo a descrição de haplótipos de *BoLA*. A análise detalhada da região de Classe IIa de *BoLA-DRB3-DQA-DQB* revelou a presença de 18 haplótipos distintos, sendo 16 destes nunca antes descritos. Além disso, dois alelos de *DQA* e um de *DQB* presentes nestes haplótipos são novos. O método descrito aqui foi mais eficiente do que a investigação por fêmeas homozigotas ou inferir a composição haplotípica baseada em informação de pedigree, além de evitar ambiguidades nos resultados. Novas pesquisas buscando a otimização deste método podem aumentar a sua eficiência e torná-lo mais facilmente aplicável a uma variedade de estudos genéticos, usando espécies diferentes e com finalidades distintas.

Palavras-chave: Embriões partenogênicos. MHC. Haplótipos de *BoLA*. Região de Classe IIa.

ABSTRACT

The prospect of increasing the productivity of cattle by means of genetic improvement is increasingly investigated. Among the most studied and promising genomic regions is the Major Histocompatibility Complex (MHC), since it includes key genes of the immune response of the animals, being able to select markers in this region for increased disease resistance and therefore greater production. The diversity of the cattle MHC, known as *BoLA* (Bovine Leukocyte Antigens), has been primarily studied using variants of serological specificities or sequencing some of its genes. Most cattle are heterozygous at *BoLA* and only in special occasions (homozygous animals or animals for which pedigree information is available) can the haplotypes be characterized. Therefore, this study aims to develop a novel approach to describe *BoLA* haplotypes from heterozygous cows, using trophoblast cells from parthenogenetic bovine embryos derived from slaughterhouse ovaries. Two methods for validating this approach were used: a panel of 445 SNPs spanning *BoLA* region was informative on the effect of meiotic recombination on the region zygosity; and the comparison of *BoLA-DRB3* alleles between the dam and its parthenogenetic embryo derived trophoblast cells (PEDTC) proved to be a reliable and practical method for investigating *BoLA* homozygosity. Using both methods, the approach presented here was validated, since *BoLA* homozygous PEDTC were derived from heterozygous cows, allowing the description of *BoLA* haplotypes. Detailed analysis of the *BoLA* Class IIa region identified 18 different *BoLA-DRB3-DQA-DQB* haplotypes, including 16 novel haplotypes. Furthermore, two *DQA* and one *DQB* alleles included in these haplotypes were novel. This method was more efficient than to look for homozygous cows or infer haplotype composition based on pedigree information, in addition to avoid ambiguities on the results. New researches aiming for the improvement of this method can increase its efficiency and make it more easily applicable for a variety of genetic studies, using different species and for other purposes.

Keywords: Parthenogenetic embryos. MHC. *BoLA* haplotypes. Class IIa subregion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Estrutura das proteínas do MHC de Classe I e II.....	22
Figura 2 — Modelo esquemático da apresentação de antígenos pelas moléculas de Classe I.....	24
Figura 3 — Modelo esquemático da apresentação de antígenos pelas moléculas de Classe II.....	26
Figura 4 — Mapa genético do cromossomo 23 bovino, com destaque às sub-regiões do MHC bovino (Classe III/I, IIa e IIb).....	27
Figura 5 — Representação gráfica do desequilíbrio de ligação na região de <i>BoLA</i>	29
Figura 6 — Descrição de haplótipos de <i>BoLA</i> utilizando comparações entre alelos parentais e de sua prole.....	37
Figura 7 — Representação simplificada da Meiose I, ilustrando um cromossomo que sofreu recombinação e um que não sofreu.....	40
Figura 8 — Esquema do experimento.....	43
Figura 9 — Células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) em cultivo na placa de 24 poços.....	54
Figura 10 — Perfil de SNPs de <i>BoLA</i> de uma fêmea bovina e 15 células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs).....	57
Figura 11 — Genótipos de SNPs de <i>BoLA</i> em células trofoblásticas partenogenéticas (CTP) e uma fêmea bovina.....	58
Figura 12 — Sequência de nucleotídeos do éxon 2 de alelos <i>BoLA-DQA</i> , incluindo novos alelos (em negrito).....	63
Figura 13 — Sequência de nucleotídeos do éxon 2 de alelos <i>BoLA-DQB</i> , incluindo novo alelo (em negrito).....	64
Figura 14 — Sequência de aminoácidos de alelos de éxon 2 de <i>BoLA-DQA</i> (A) e – <i>DQB</i> (B), incluindo novos alelos (em negrito).....	65
Quadro 1 — Descrição dos SNPs utilizados neste estudo.....	106
Quadro 2 — Genotipagem das 15 amostras de células trofoblásticas partenogenéticas e uma fêmea bovina para 445 SNPs espalhados em <i>BoLA</i>	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Associação de alelos de <i>BoLA-DRB3</i> com doenças.....	32
Tabela 2 — Sequência dos primers utilizados na PCR e sequenciamento dos genes <i>BoLA-DRB3</i> , <i>-DQA</i> , <i>-DQB</i>	48
Tabela 3 — Condições de termociclagem para os genes <i>DRB3</i> , <i>DQA</i> e <i>DQB</i>	48
Tabela 4 — Resumo dos dados de produção de embriões partenogenéticos e plaqueamento de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) para cada fêmea usada neste estudo.....	51
Tabela 5 — Resumo da eficiência da utilização de ativação partenogenética de oócitos bovinos para produção de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) para extração de DNA.....	55
Tabela 6 — Porcentagem de genótipos de SNPs compatíveis entre fêmea bovina e sua célula trofoblástica partenogenética (CTP) em cada Classe de <i>BoLA</i>	60
Tabela 7 — Correspondência de genótipos de 445 SNPs entre fêmea bovina e sua célula trofoblástica partenogenética (CTP) em <i>BoLA</i>	60
Tabela 8 — Resumo da eficiência de utilizar-se de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) para obtenção de material genético homocigoto de fêmeas bovinas heterocigotas para descrição de haplótipos de <i>BoLA</i>	61
Tabela 9 — Haplótipos de <i>BoLA</i> Classe IIa <i>DRB3-DQA-DQB</i> em células trofoblásticas de embriões partenogenéticos homocigotas.....	62
Tabela 10 — Haplótipos parciais de <i>BoLA</i> Classe IIa <i>DRB3-DQA-DQB</i> em células trofoblásticas de embriões partenogenéticos homocigotas.....	62
Tabela 11 — Associação de alelos de <i>BoLA-DRB3</i> com aspectos produtivos do gado bovino.....	104
Tabela 12 — Resumo dos estudos com o gene <i>DRB3</i> em rebanhos bovinos..	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC — Células Apresentadoras de Antígenos (*Antigen Presenting Cells*)
- BoLA — Antígenos Leucocitários Bovinos (*Bovine Leukocyte Antigens*)
- BSA — Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- CCO — Complexo *Cumulus Oophorus*
- CD4 — Co-receptor de Linfócito T Auxiliar (*Cluster of Differentiation 4*)
- CD8 — Co-receptor de Linfócito T Citotóxico (*Cluster of Differentiation 8*)
- cM — CentiMorgans, unidade de medida de ligação genética, usada para definir a distância entre dois pontos do genoma baseado na taxa de recombinação entre estes (portanto, não reflete distância física real)
- CNV — Variação no Número de Cópias (*Copy Number Variation*)
- CTP — Célula Trofoblástica Partenogenética, denominação criada no presente trabalho para designar as células cultivadas a partir do plaqueamento dos embriões partenogenéticos
- DNA — Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- DQA — Gene de MHC Classe II bovino (as vezes referido como *BoLA-DQA*), codificante da cadeia alfa da molécula DQ
- DQB — Gene de MHC de Classe II bovino (as vezes referido como *BoLA-DQB*), codificante da cadeia beta da molécula DQ
- DRB3 — Gene de MHC Classe II bovino (as vezes referido como *BoLA-DRB3*), codificante da cadeia beta da molécula DR
- FSH — Hormônio Folículo Estimulante (*Follicle Stimulating Hormone*)
- HLA — Antígenos Leucocitários Humanos (*Human Leukocyte Antigens*)
- LH — Hormônio Luteinizante (*Luteinizing Hormone*)
- MEM — Meio Essencial Mínimo (*Minimal Essential Medium*)
- MHC — Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
- MIV — Maturação *In Vitro*
- PBS — Tampão Fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCR — Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PEDTC — Termo em inglês usado para denominar as CTP (*Parthenogenetic Embryo Derived Trophoblast Cells*)
- RFLP — Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- SOCIPE — Sociedade Cooperativa dos Pecuaristas em Belém/PA
- SOF — Fluido Sintético do Oviduto (*Synthetic Oviductal Fluid*)
- SBT — Tipagem Baseada em Sequência (*Sequence Based Typing*)
- SNP — Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single-nucleotide Polymorphism*)
- TCR — Receptor de Célula T (*T Cell Receptor*)
- TCM — Meio de Cultivo de Tecidos (*Tissue Culture Medium*)
- 6-DMAP — 6-Dimetilaminopurina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. HIPÓTESE.....	15
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1. PECUÁRIA BOVINA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARÁ.....	16
3.2. PERDAS EM DECORRÊNCIA DE ENFERMIDADES.....	17
3.3. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC).....	19
3.3.1. Organização do MHC.....	20
3.3.2. Estrutura dos Genes de Classe I e II.....	21
3.4. A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS.....	23
3.5. <i>BoLA</i> – BOVINE LEUKOCYTE ANTIGENS.....	27
3.5.1. Associação de <i>BoLA</i> com Doenças.....	29
3.5.2. Importância de se Avaliar Haplótipos.....	34
3.6. TÉCNICAS UTILIZADAS NO ESTUDO DE <i>BoLA</i>	35
3.6.1. Dificuldades no Estudo de Haplótipos.....	36
3.7. BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO COMO ALTERNATIVA AO ESTUDO DE <i>BoLA</i>	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
4.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PARTENOGENÉTICOS.....	44
4.2.1. Coleta de Ovários.....	44
4.2.2. Rastreo e Maturação <i>In Vitro</i> (MIV) de Oócitos.....	44
4.2.3. Ativação Partenogenética.....	45
4.2.4. Cultivo <i>In Vitro</i> de Embriões.....	45
4.3. CULTIVO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS (CTPs)	45
4.4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	46
4.5. VALIDAÇÃO DA HOMOZIGOSE.....	46
4.6. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE <i>BoLA</i> CLASSE IIa.....	47
4.7. ANÁLISE DE DADOS.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES, CULTIVO E EXPANSÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS.....	50
5.2. EXTRAÇÃO DE DNA E PCR DOS GENES ALVOS.....	55
5.3. VALIDAÇÃO DE HOMOZIGOSE.....	56
5.3.1. Primeira Abordagem: Genotipagem de SNPs.....	56
5.3.2. Segunda Abordagem: Comparação de alelos <i>DRB3</i>.....	60

5.4. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS E NOVOS ALELOS.....	61
6. DISCUSSÃO.....	66
6.1. PRODUÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS.....	67
6.2. VALIDAÇÃO DE HOMOZIGOSE.....	68
6.2.1. Genotipagem de SNPs.....	69
6.2.2. Comparação de alelos <i>DRB3</i>.....	70
6.3. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE <i>BoLA</i>	71
6.4. LIMITAÇÕES DA METODOLOGIA.....	73
6.5. PERSPECTIVAS.....	74
6.5.1. Otimização da Metodologia.....	75
6.5.2. Descrição de Haplótipos de <i>BoLA</i> Classe I.....	76
6.5.3. Outros Estudos Genéticos do Gado Bovino.....	77
6.5.4. Ampliação dos Estudos no Gado Paraense.....	80
7. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICES.....	103
APÊNDICE A — Associação de <i>BoLA-DRB3</i> com aspectos produtivos em rebanhos bovinos.....	104
APÊNDICE B — Descrição dos SNPs utilizados no presente trabalho.....	106
APÊNDICE C — Genotipagem de SNPs das amostras CTPs e fêmea bovina investigados no presente estudo.....	117
APÊNDICE D — Estudos com diversidade de <i>DRB3</i> em gados bovinos utilizados como referências neste trabalho.....	128
APÊNDICE E — Artigo científico publicado na revista <i>Animal Genetics</i> (DOI: 10.1111/age.12285), contendo parte dos resultados obtidos neste trabalho.....	134

1. INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se em uma posição privilegiada no que diz respeito à produção pecuária mundial – com destaque ao gado bovino. Em 2006, tornou-se o maior exportador de carne bovina no mundo e vem se mantendo entre os principais produtores/exportadores deste produto desde então (USDA, 2014). Entre 1990 e 2011, o rebanho bovino brasileiro aumentou cerca de 45%, tendo a região Norte despontado nesse crescimento, representando, em 2011, 20,3% deste efetivo (IBGE, 2011).

Para manter-se nessa posição de destaque, há uma grande preocupação com o controle e prevenção de doenças. Além disso, uma série de enfermidades capazes de afetar os bovinos podem causar impactos sociais (baixa qualidade dos alimentos e transmissão de doenças zoonóticas) e econômicos (TEODORO et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2004; LEITE, 2012). Dessa forma, pesquisas têm focado os aspectos biológicos das respostas dos organismos aos patógenos, buscando-se avaliar loci gênicos diretamente relacionados à resposta imunológica a essas enfermidades e validá-los como marcadores genéticos. Dentre estes, destaca-se o MHC (*Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade, em português).

O MHC é uma região cromossômica com elevada densidade gênica. É dividido em três regiões, sendo que regiões de Classe I e II possuem genes que atuam diretamente no reconhecimento de patógenos pelas células de defesa do organismo (HUGHES, 2008). Em bovinos, a denominação utilizada para este complexo de genes é *BoLA* (*Bovine Leukocyte Antigens* – Antígenos leucocitários bovinos, em português). Diversos estudos relatam a associação de genes de Classe I e II de *BoLA* com a susceptibilidade ou resistência a vírus, bactérias e parasitas, além de relação com a produção animal (MEJDELL et al., 1994; MAILLARD et al., 2003; MACHADO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005; UNTALAN; PRUETT; STEELMAN, 2007; SHU et al., 2011).

Genes localizados em um mesmo cromossomo podem estar em ligação, formando haplótipos (regiões do genoma onde há baixa frequência de recombinação durante a meiose e, portanto, são herdadas em “blocos”). Devido ao alto polimorfismo alélico dos loci gênicos de *BoLA* (todos muito próximos no cromossomo), há uma grande diversidade de haplótipos mantidos em uma

população (FRITZ, 2009). Maillard et al. (2003) demonstraram uma importante associação entre um haplótipo de *BoLA* e a dermatofilose, utilizando o mesmo como marcador genético para identificar animais susceptíveis à doença. Assim, a avaliação do haplótipo de *BoLA* pode representar uma ferramenta para seleção e reprodução de indivíduos que apresentem resistência elevada a doenças e, portanto, maior qualidade genética.

Uma barreira à utilização em larga escala de análises dos haplótipos de *BoLA* é o fato da maioria dos indivíduos ser heterozigota para os loci, levando à presença de dois haplótipos diferentes (um em cada cromossomo 23, onde se localiza a região). Isso dificulta a definição de quais alelos especificamente compõem cada haplótipo, já que normalmente cada gene é identificado separadamente. No caso de indivíduos heterozigotos em mais de um locus, a combinação alélica dos loci de interesse em cada haplótipo é perdida. Alguns loci duplicados (variação no número de cópias) também não conseguiriam ser determinados facilmente em cada haplótipo de um indivíduo heterozigoto. Pesquisas que descrevem haplótipos de *BoLA* necessitam utilizar animais homozigotos para ter certeza de seus resultados ou inferências a partir da análise da linhagem, comparando os progenitores e a prole.

A frequência de animais homozigotos para MHC é baixa devido à alta diversidade genética em bovinos, restringindo a abrangência de pesquisas com haplótipos de *BoLA* do gado regional do Pará. Assim, uma abordagem prática para o estudo dessa região genômica deve ser capaz de avaliar animais heterozigotos sem a necessidade de informação de linhagem. A investigação dos haplótipos de *BoLA* pode representar importantes ganhos em melhoria genética de rebanhos bovinos ao se selecionar variantes resistentes a enfermidades e possibilitando melhor avaliação da associação com essas patologias. Porém, as abordagens utilizadas na descrição de haplótipos dificultam sua aplicação em larga escala nos rebanhos regionais. Portanto, este trabalho propõe a utilização de células homozigotas derivadas de gametas para o estudo do *BoLA*. Para tal, será necessária a produção de embriões partenogênicos produzidos *in vitro* e expansão das células do trofoblasto.

1.1. HIPÓTESE

A utilização de células de trofoblasto de embriões bovinos partenogênicos é uma alternativa para o estudo de haplótipos de *BoLA*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Validar uma nova abordagem para a descrição de haplótipos de *BoLA* Classe IIa utilizando células de trofoblasto de embriões partenogênicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e expandir células trofoblásticas partenogênicas para isolamento de DNA;
- Validar a homozigose de fêmeas bovinas e de células trofoblásticas partenogênicas para o *BoLA* Classe IIa;
- Descrever haplótipos de *BoLA* de Classe IIa *DRB3-DQA-DQB* de células trofoblásticas partenogênicas bovinas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PECUÁRIA BOVINA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARÁ

O rebanho bovino representa a maior parcela da pecuária no Brasil. Em 2011, totalizavam aproximadamente 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2011), sendo o segundo maior rebanho bovino do mundo (USDA, 2013). Na primeira posição, o rebanho da Índia caracteriza-se como um misto de bovinos e bubalinos, além de não ser um rebanho comercial na sua totalidade. Portanto, o Brasil pode ser o detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo (IBGE, 2011). Assim, o Brasil desponta como potência na produção pecuária mundial, com destaque para a região Norte por possuir 20,3% do efetivo nacional, sendo a segunda maior região em termos de número de cabeças (IBGE, 2011).

O estado do Pará é o principal responsável por esse crescimento regional, possuindo 42% do gado bovino (8,6% de participação do total nacional). Esse *boom* na pecuária pode ser evidenciado tomando-se como referência o município de São Felix do Xingu (PA), que detém 1% do efetivo nacional, e ao fato de Altamira (PA) ter subido 16 posições no *ranking* de cidades com maiores rebanhos, alcançando a 12ª colocação em apenas um ano (IBGE, 2011).

Apesar disso, uma crescente preocupação com o aumento dos rebanhos nacionais tem surgido, visto que ele está localizado predominantemente na Amazônia Legal (80% do aumento do rebanho bovino; BARRETO, 2008). De fato, em dezembro de 2007, a comunidade internacional aprovou o Plano de Ação de Bali com a meta de reduzir as emissões de gases de efeito estufa, com destaque aos provenientes de desmatamento florestal (UNITED NATIONS, 2007). Nesse escopo, o Brasil tem a responsabilidade de promover seu desenvolvimento agropecuário de forma sustentável, sem maior abertura de pastagens.

Com a demanda crescente por carne bovina, uma alternativa ao aumento da produção sem aumentar o desmatamento é o investimento em melhorar a produtividade do rebanho brasileiro, que ainda está muito aquém do ideal. Para ilustrar essa situação, os Estados Unidos da América, com o quarto maior rebanho bovino do mundo, apresentam a maior produção de carne bovina, sendo reflexo da eficiência produtiva deste país (IBGE, 2011).

Dentre as causas da redução da produtividade de um rebanho e sua rentabilidade está a incidência de enfermidades. Toma-se como exemplo a necessidade do controle da febre aftosa para expansão da exportação de carne bovina e conquista de novos mercados. Além desta, diversas outras enfermidades são responsáveis por queda de produtividade, condenação de carcaças e mortes dos animais.

3.2. PERDAS EM DECORRÊNCIA DE ENFERMIDADES

Diferentes doenças podem ser importantes fatores que levam à redução de produtividade. Deve ser entendido que os impactos econômicos à atividade pecuária são decorrentes desde a redução da qualidade de produto até a perda de animal produtivo. Assim, a sanidade animal representa uma ampla perspectiva de crescimento em produção.

Uma das principais causas que afetam a produção de gado em países tropicais é a infestação por ectoparasitas (JONSSON, 2006; BIANCHIN et al., 2007). Dentre estes, a ação do carrapato *Boophilus microplus* é responsável pela perda de 2 bilhões de dólares por ano na pecuária brasileira (JACINTO et al., 2012). Este é responsável pela diminuição da qualidade intrínseca do couro via lesionamento da pele durante o repasto sanguíneo e modificações estruturais no tecido, tornando o couro menos resistente à tração.

Além disso, animais infectados por esse carrapato apresentam redução no ganho de peso e produção de leite, diminuição de fertilidade, maior ocorrência de doenças e morte (TEODORO et al., 2004). Entre as explicações para as perdas estão o aumento do desconforto do animal (afetando a taxa de conversão diária), a espoliação do sangue e a transmissão de patógenos, responsáveis pelo desenvolvimento da “tristeza parasitária bovina” — babesiose e anaplasiose, ambas causadas por protozoários cujo principal vetor é o carrapato (FURLONG, 1993; TRINDADE; ALMEIDA; FREITAS, 2011). Portanto, a incidência de ectoparasitas impacta toda atividade pecuária, seja para gado de corte ou gado de leite.

Como exemplo de doença própria de gado leiteiro tem-se a mastite, caracterizada por uma reação inflamatória na glândula mamária. Esta enfermidade pode ser causada por diversos microorganismos (desde bactérias

e fungos a vírus e algas), sendo a principal causa de perdas econômicas na cadeia produtiva do leite, seja na forma clínica ou subclínica (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012). Como revisado por estes autores, as perdas econômicas acarretadas pela mastite no gado bovino são amplamente estudadas. A redução na produção leiteira pode alcançar 64% em alguns rebanhos, onde a valoração da perda por vaca acometida por mastite pode chegar a US\$ 200,00 ao ano. Esta enfermidade afeta o próprio valor de descarte do animal (quando o animal é destinado ao abate), podendo ocorrer uma desvalorização de 67% do mesmo (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

Diversas outras doenças que acometem o gado afetam a rentabilidade da pecuária, como a dermatofilose (MAILLARD et al., 2003), a leucose viral bovina (TOSTES, 2005), a brucelose e a tuberculose (BRASIL, 2006). De forma a atenuar as perdas econômicas, busca-se a utilização de técnicas sanitárias mais adequadas, bem como o tratamento com fármacos (antibióticos e acaricidas, por exemplo) e a vacinação do gado. Em contraponto, a utilização de antibióticos e acaricidas eleva o custo de manutenção do rebanho, além de potencialmente selecionar linhagens de patógenos e parasitas gradativamente mais resistentes aos tratamentos (FRAGA et al., 2003; IBELLI et al., 2011). Pensando em longo prazo, deve-se tomar precaução quanto à administração de tais produtos.

Como alternativa, a vacinação do gado é uma prática bem estabelecida na bovinocultura brasileira, onde diversas vacinas são utilizadas para controlar enfermidades como a febre aftosa, brucelose e clostridiose. A ampliação de programas de vacinação para outras enfermidades é limitada pela inexistência de vacinas eficazes ou por complexidade da enfermidade, como é o caso de mastite (TIWARI et al., 2013), leucemia bovina viral (GUTIÉRREZ et al., 2014), anaplasmosse e babesiose (SUAREZ; NOH, 2011). Não obstante, uma série de mecanismos governamentais são implementados para redução ou erradicação de algumas enfermidades, como brucelose, tuberculose, raiva e encefalopatias (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009), implementando tecnologias e normatizações de controle, prevenção e gestão voltadas à sanidade animal.

Outra forma de controlar a incidência de doenças é a seleção de animais mais resistentes (ou eliminação dos mais susceptíveis). Conta-se, portanto, com o fator genético para melhorar a resistência do rebanho a algumas doenças endêmicas de cada região. Por exemplo, no geral os touros zebuínos

apresentam maior resistência a carrapatos que as raças taurinas (ALENCAR; FRAGA; DA SILVA, 2005). Assim, gado zebuino pode ser utilizado preferencialmente em áreas tropicais, onde a incidência de carrapatos é mais elevada.

Além disso, mesmo rebanhos de raças puras apresentam variação individual na resposta às enfermidades, onde alguns animais são fenotipicamente mais resistentes. Esses indivíduos são verdadeiros reservatórios genéticos de características de interesse agropecuário. Dessa forma, é possível utilizar-se de técnicas de biologia molecular para revelar quais regiões do genoma do animal estão conferindo essa resistência natural às doenças, utilizando marcadores genéticos que ajudarão na seleção dos animais de interesse zootécnico.

As bases genéticas para a resistência a doenças estão continuamente sendo investigadas, levando ao desenvolvimento do campo da genética animal, imunologia e imunogenética. Dentre as regiões que merecem destaque nesse contexto, o MHC reúne genes importantes para a imunidade adaptativa do organismo e a própria resposta a programas de vacinação (FRITZ, 2009; BEHL et al., 2012). A composição genética e diversidade únicas desta região são responsáveis pela grande atenção dada a ela, visto que acredita-se ser moldada pela interação patógeno-hospedeiro, em um processo coevolutivo (BORGHANS; BELTMAN; DE BOER, 2004; ZHANG; HE, 2013).

3.3. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)

O MHC, presente em todos os vertebrados com mandíbula (OKAMURA et al., 1997; FLAJNIK; KASAHARA, 2001; HUGHES, 2008), apresenta uma importante ferramenta imunológica na proteção do organismo. Como o próprio nome sugere, sua descoberta está associada ao estudo de como o organismo reconhece o que é próprio e o que não é (na rejeição de tecidos e órgãos implantados; GORER, 1936; SNELL, 1948; SNELL; HIGGINS, 1951; VAN ROOD et al., 1968). Portanto, algumas de suas proteínas atuam na distinção das moléculas do corpo e moléculas invasoras, armando uma resposta imunológica para combatê-las.

É uma região única ao se levar em consideração a alta densidade gênica e sua evolução. Porém, para melhor entender o contexto no qual se insere dentro da defesa do organismo, é preciso entender como suas proteínas diferem nos seus alvos e se complementam na resposta imunológica.

3.3.1. Organização do MHC

O estudo do MHC foi desenvolvido inicialmente em humanos e camundongos. Nestes, os genes de MHC estão reunidos em três regiões, conhecidas como região (ou sub-região) de Classe I, II e III (MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999). As regiões de Classe I e II reúnem os genes que codificam as proteínas apresentadoras de antígenos (denominadas antígenos leucocitários humanos — *HLA* — nesta espécie), enquanto que a Classe III reúne genes com diversas funções, incluindo algumas relacionadas ao sistema imune (por exemplo proteínas do sistema complemento e fator de necrose tumoral; MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999).

As moléculas de *HLA* apresentam domínios com evidências de homologia com a família das imunoglobulinas (HUGHES, 2008). Apesar disso, ainda é desconhecido como este loci se formou, evento que provavelmente ocorreu concomitante à evolução do sistema imune adaptativo dos vertebrados. Ao estudar a homologia das regiões do MHC em diferentes espécies, é possível inferir que a estrutura da região de Classe II é relativamente estável em mamíferos placentários, organização tal que deve ter se formado antes da irradiação das ordens de mamíferos (HUGHES, 2008). Já a região de Classe I sofreu grandes modificações na história evolutiva, mesmo comparando-se ordens de mamíferos, por processos de duplicações e deleções (HUGHES; NEI, 1989).

A região de Classe III é a região mais conservada do MHC, apresentando genes que são compartilhados até mesmo com ouriço do mar, mosca-da-fruta e *Caenorhabditis elegans* (SMITH; SHIH; DACHENHAUSEN, 1998; TRACHTULEC; FOREJT, 2001; DANCHIN, et al., 2003). A partir do desenvolvimento do sistema imune adaptativo e evolução das regiões de Classe I e II, é possível que os loci de Classe III sejam a região original que se ligou por

acaso, na evolução do sistema adaptativo, aos demais loci de MHC (FRITZ, 2009).

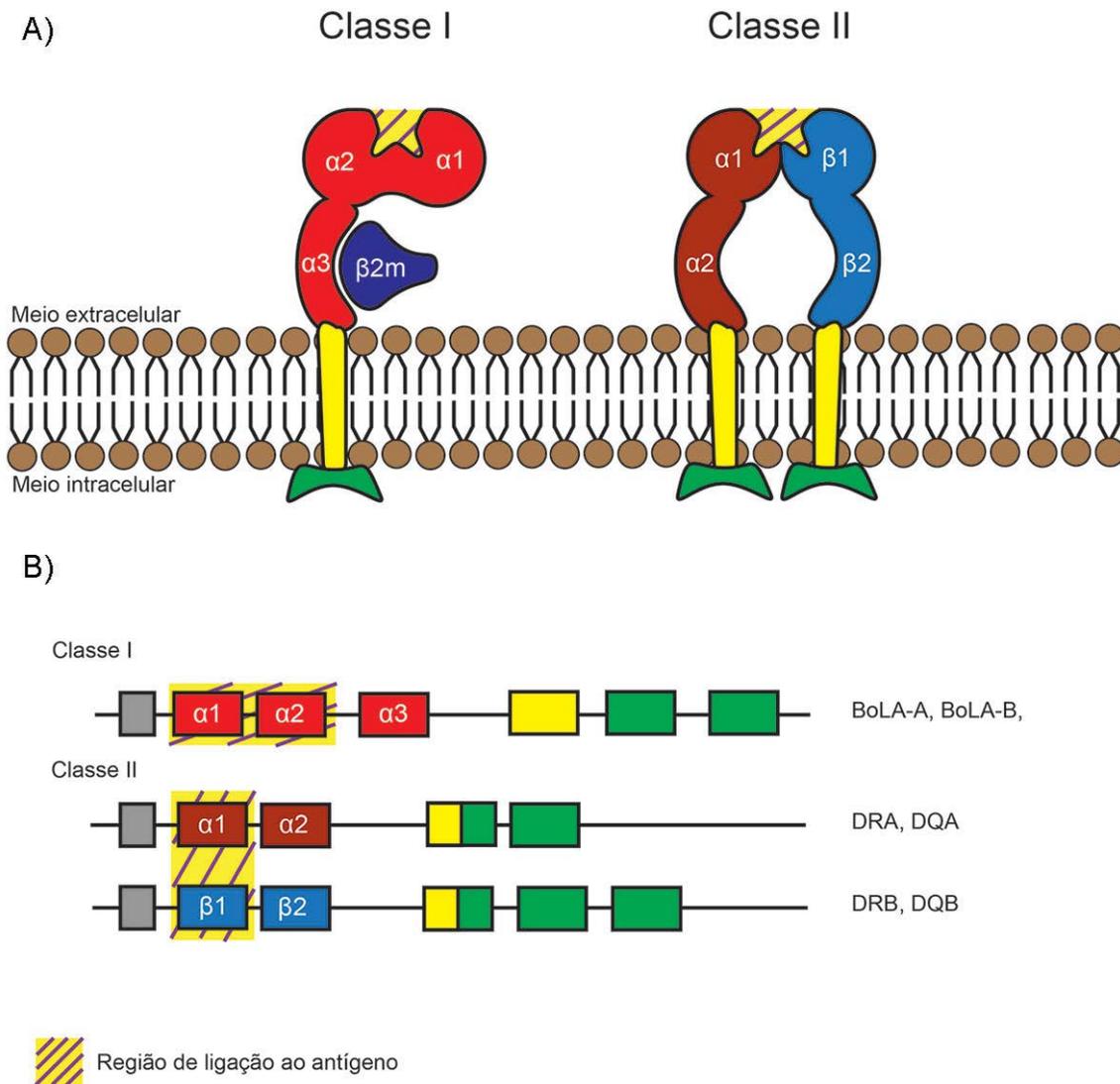
Em termos gerais, podemos entender a ação das proteínas do MHC de Classe I e II como glicoproteínas apresentadoras de antígenos (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1974). Estudos realizados com cristalografia de raios-X revelaram a estrutura tridimensional dessas proteínas, ajudando a elucidar como atuam na apresentação antigênica (BJORKMAN et al., 1987; BROWN et al., 1993). Tanto as de Classe I quanto as de Classe II apresentam sítios de ligações de antígenos e interação com linfócitos T (Figura 1). As características moleculares que distinguem essas duas classes proteicas são importantes para o entendimento da sua ação tanto no contexto da resposta imune, seja no combate a patógenos ou no controle de células cancerígenas (BEHL et al., 2012).

3.3.2. Estrutura dos Genes de Classe I e II

Os éxons dos genes de Classe I e II estão ilustrados na Figura 1. É possível observar que as sequências codificadoras da região de ligação ao antígeno nestas proteínas encontram-se nos éxons 2 e 3 para as moléculas de Classe I e no éxon 2 para as moléculas de Classe II (KUBY, 1997). Estas proteínas são altamente polimórficas e as diferenças alélicas se concentram principalmente nesses éxons, devido a sua importância na ligação aos antígenos (SENA, 2003; RADWAN; BIEDRZYCKA; BABIK, 2010).

A proporção de substituições nucleotídicas não-sinônimas (que levam à modificação de aminoácidos), é elevada em comparação com a proporção de substituições nucleotídicas sinônimas (que não levam à substituição de aminoácidos) na região de ligação ao antígeno, demonstrando estar sofrendo um processo evolutivo que favorece a diversificação da proteína (seleção positiva), enquanto que nos outros domínios ocorre o oposto (NEI; HUGHES, 1991). O elevado polimorfismo também evidencia a manutenção das variantes alélicas nas populações naturais.

Figura 1 — Estrutura das proteínas do MHC de Classe I e II.



A, é possível observar a conformação das proteínas, com destaque aos domínios extracelulares. B, a estrutura dos genes, onde destacam-se quais éxons contribuem para cada parte estrutural da proteína e exemplos de genes do MHC bovino para cada Classe. A região de ligação aos antígenos está destacada, sendo o sítio onde pequenos peptídeos de origem endógena (Classe I) ou exógena (Classe II) se ligam para serem apresentadas às células T citotóxicas (Classe I) ou às células T auxiliares (Classe II). É possível perceber que a proteína de Classe II é codificada em dois genes distintos, responsáveis pela cadeia α e β , respectivamente, que juntas formaram uma molécula de MHC Classe II funcional. Boxes indicam éxons e linhas indicam íntrons. Modificado de Kuby (1997).

No contexto da apresentação de antígenos, a diversidade representa a possibilidade de reconhecer um maior número de peptídeos dos agentes patogênicos. Já que esta região irá de fato reconhecer os antígenos exógenos, uma maior variabilidade genética na população pode torná-la mais resistente à pressão exercida pelos patógenos.

3.4. A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

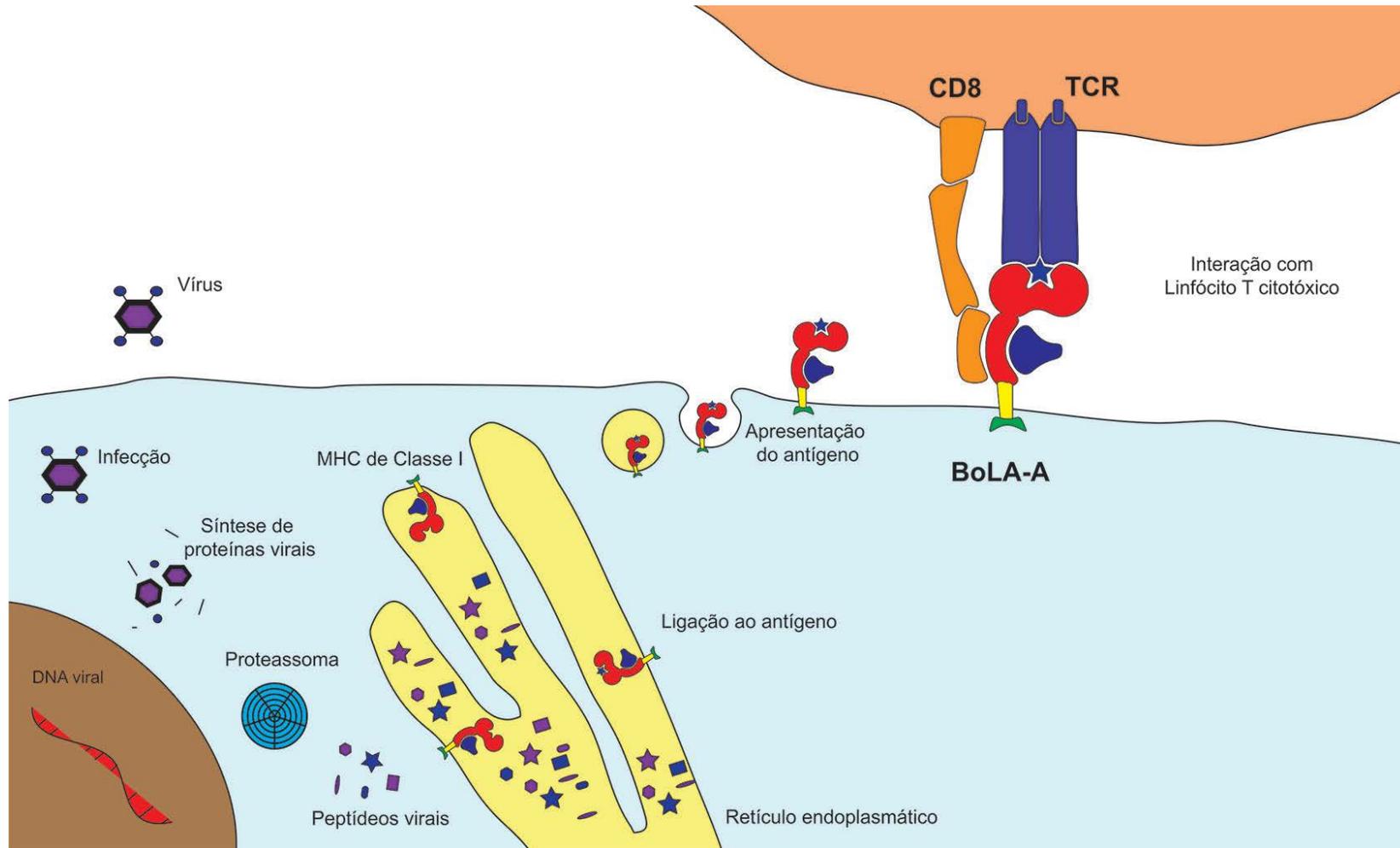
No contexto fisiológico do animal, a apresentação de antígenos por moléculas de MHC regula o funcionamento da resposta imunológica e atua no controle da homeostase do organismo. Em última análise, as moléculas de MHC serão importantes para desencadear mecanismos de defesa específicos contra o agente infectante. De forma simplificada, estas proteínas têm entre suas funções deflagrar se há infecção no organismo, identificar o agente infectante e que grau de resposta necessário para combatê-lo (JANEWAY et al., 2007; SOMPAYRAC, 2012).

As moléculas de Classes I e II diferem em seus alvos. Resumidamente, antígenos endógenos (sejam eles próprios ou provenientes de patógenos intracelulares) serão ligados a moléculas de Classe I, enquanto antígenos exógenos (sejam eles próprios ou provenientes de patógenos extracelulares) serão ligados a moléculas de Classe II. Ambas as moléculas são altamente expressas em células apresentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cells), sendo componente essencial para a ativação dos linfócitos T, que são células responsáveis pela resposta imune celular adaptativa.

Entretanto, as moléculas de Classe I também são expressas em quase todas as células nucleadas do organismo. Essa característica é importante, pois entende-se que patógenos intracelulares poderiam infectar qualquer tipo de célula e, assim, evitar o sistema imunológico, escapando da eliminação (JANEWAY et al., 2007; SOMPAYRAC, 2012).

Na Figura 2 é possível observar, de forma resumida, como o sistema imunológico identifica essas ameaças. Após a infecção por vírus e outros patógenos intracelulares, a célula passa a ser hospedeira responsável pela replicação e síntese de muitas de suas moléculas. Como parte do mecanismo endógeno de degradação proteica, uma parcela de todas as proteínas presentes na célula é degradada em peptídeos menores, sendo transportados ao retículo endoplasmático. Nesse momento, entram em contato com moléculas de Classe I. O sítio de ligação ao antígeno irá se complexar às cadeias peptídicas que apresentarem afinidade química com o mesmo, englobando tanto proteínas próprias da célula quanto proteínas do parasita.

Figura 2 — Modelo esquemático da apresentação de antígenos pelas moléculas de Classe I.



Da esquerda para a direita, observa-se a infecção por um vírus, clivagem das proteínas virais nos proteassomas, interação das mesmas e moléculas de MHC de Classe I, no retículo endoplasmático, exocitose do complexo proteína de MHC-antígeno e interação com linfócitos T citotóxicos. TCR, receptor de célula T; BoLA-A é um exemplo de proteína de MHC de Classe I bovino; CD8, *cluster of differentiation 8* (co-receptor de célula T citotóxica). Baseado em Sompayrac (2012).

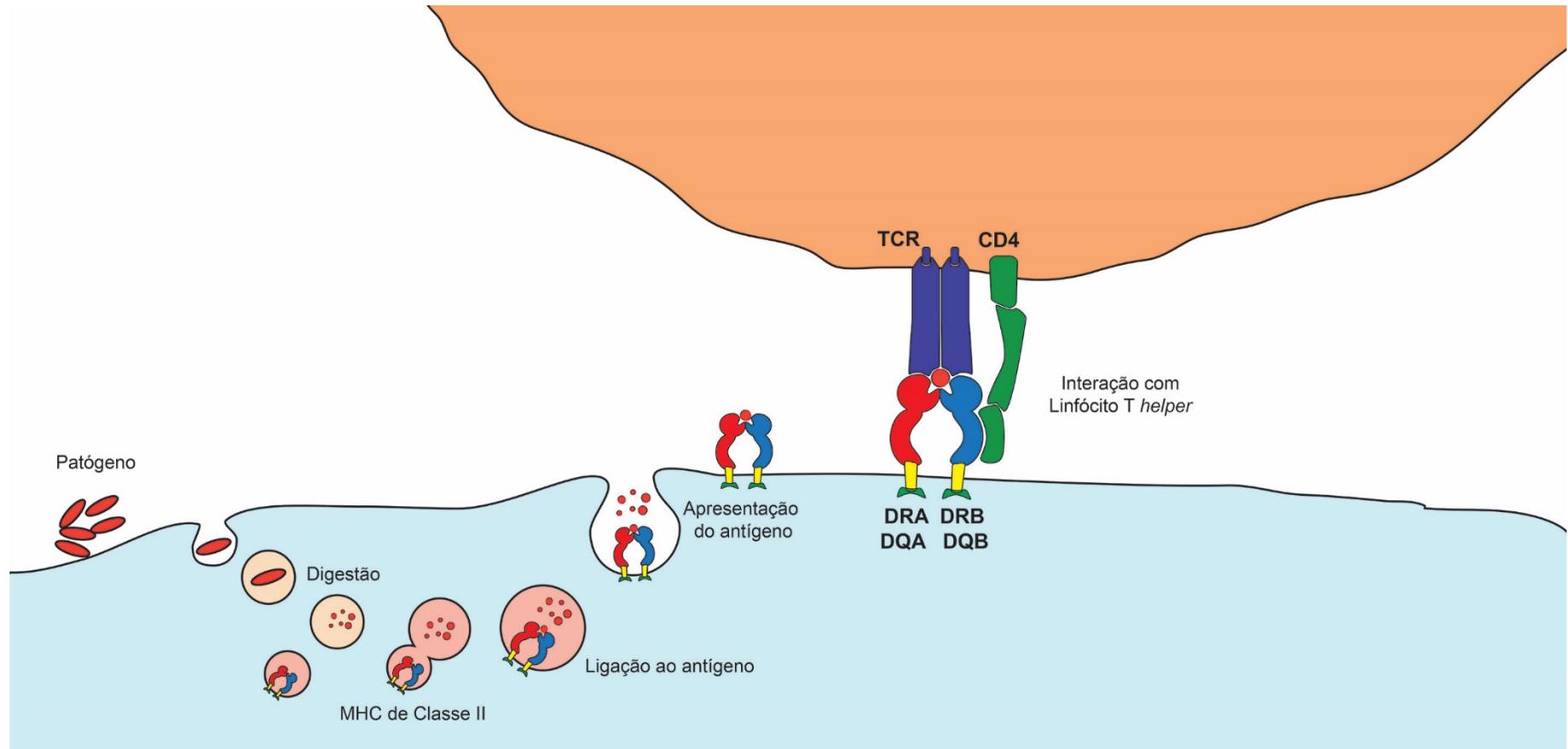
Ao ser exportado para a superfície da membrana plasmática, proteínas de Classe I ligadas a peptídeos do patógeno podem ser reconhecidas por linfócitos T citotóxicos através de seus receptores de células T (TCR) e co-receptor CD8. Visto que as moléculas de TCR são selecionadas para não reconhecerem peptídeos do nosso organismo, os linfócitos T citotóxicos, ao reconhecerem que a célula está infectada, iniciam uma sinalização em cadeia que culminará na apoptose da mesma. Assim, o organismo é capaz de eliminar as células hospedeiras e impedir uma maior proliferação do patógeno (JANEWAY et al., 2007; SOMPAYRAC, 2012).

As moléculas de Classe II estão presentes apenas em APCs e linfócitos B e são reconhecidas por linfócitos T *helper* CD4 (auxiliares) no combate às infecções. Patógenos no organismo são fagocitados por macrófagos ou suas moléculas captadas por células dendríticas, onde serão digeridos em peptídeos menores nos endossomos. Nesse sítio as moléculas de Classe II são capazes de se complexar a esses antígenos exógenos, sendo externalizadas a partir da exocitose (JANEWAY et al., 2007). Na superfície celular serão capazes de interagir com as moléculas de TCR dos linfócitos T *helper* e, caso sejam reconhecidas pelas mesmas, iniciarão uma cadeia de liberação de citocinas para hiperativação de outras células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos (Figura 3).

Assim, as moléculas de Classe II são importantes para o controle do estado de infecção local. A liberação de citocinas servirá como sinalizador para o recrutamento de células do sistema imune para o combate aos patógenos, além de sinalizarem a hiperativação das mesmas, tornando-as mais eficazes na função de eliminar os agentes infectantes (JANEWAY et al., 2007; SOMPAYRAC, 2012).

Devido à diversidade destas moléculas nas populações, indivíduos diferentes reconhecerão peptídeos distintos de um mesmo patógeno, montando uma resposta de acordo com a interação entre suas moléculas de MHC e esses peptídeos exógenos. Portanto, é possível perceber o papel que tais moléculas apresentam no contexto da sanidade animal e, portanto, tornaram-se alvos para a seleção de marcadores genéticos para resistência a doenças em animais domésticos, como os bovinos.

Figura 3 — Modelo esquemático da apresentação de antígenos pelas moléculas de Classe II.

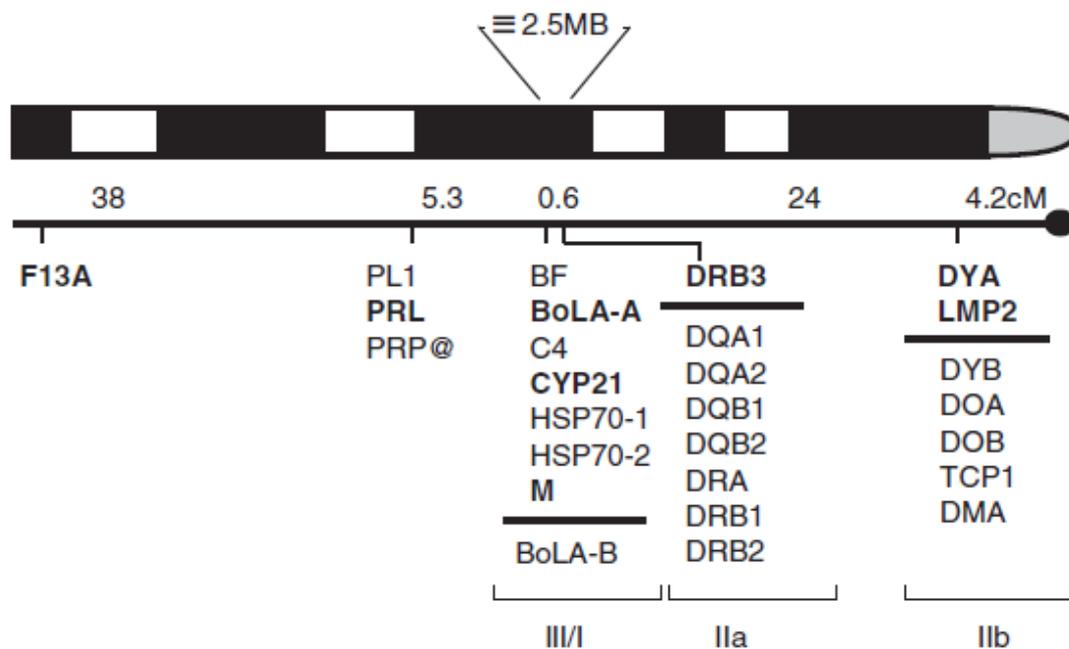


Da esquerda para a direita, observa-se a infecção por patógenos extracelulares, fagocitose pela célula apresentadora de antígeno, digestão e clivagem dos peptídeos do patógeno, interação de moléculas de MHC de Classe II com peptídeos do patógeno, exocitose do complexo molécula de MHC e antígeno, apresentação antigênica e interação com linfócito T *helper* (auxiliar). TCR, receptor de célula T; CD4, *cluster of differentiation* 4 (co-receptor de linfócitos T *helper*); DRA, DRB, DQA e DQB, exemplos de polipeptídeos que compõem o MHC de Classe II bovino, sendo a molécula DQ funcional formada por DQA e DQB, e a molécula DR por DRA e DRB. Baseado em Sompayrac (2012).

3.5. *BoLA* – BOVINE LEUKOCYTE ANTIGENS

O MHC bovino, denominado *BoLA*, está localizado no cromossomo 23 (AMILLS et al., 1998). No início dos estudos desta região, percebeu-se que sua organização difere dos outros mamíferos. Agregando informações de outras espécies próximas (bubalinos, caprinos e ovinos, por exemplo), chegou-se à conclusão de que em ruminantes aconteceu um evento de inversão cromossômica, levando à separação dos loci de Classe II em duas (sub)regiões: região IIa e região IIb (VAN EIJK et al., 1995; CHILDERS et al., 2006; Figura 4).

Figura 4. Mapa genético do cromossomo 23 bovino, com destaque às sub-regiões do MHC bovino (Classe III/I, IIa e IIb).



Na figura é possível observar os principais genes em cada região de *BoLA*, bem como a distância entre estas em cM. Imagem retirada de Takeshima & Aida (2006).

A Classe IIb se encontra separada por aproximadamente 20 cM do restante do *BoLA* (CHILDERS et al., 2006; BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009). Esta região apresenta em torno de 450 kb, onde se localizam alguns genes que codificam moléculas apresentadoras de antígenos (ex. *DMA*, *DMB*, *DYA* e *DYB*; BALLINGALL et al., 2004) e outros de funções diversas (ex. *DNA* e

DOB com função reguladora, *LMP2* e *LMP7* atuando no proteossoma). Também está presente um gene de histona (*H2B*) e um gene de transporte *TAP2.1* (AMILLS et al., 1998; BALLINGALL et al., 2004; CHILDERS et al., 2006).

O segundo “bloco” de *BoLA*, reúne continuamente as regiões de Classe IIa, III e I. Como em muitos mamíferos, a região de Classe III se interpõe entre as de Classe I e II (BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2009). Com o restante dos genes de Classe II, encontram-se na Classe IIa os genes altamente polimórficos *DQA*, *DQB* e *DRB3* (61, 78 e 130 alelos descritos, respectivamente; IPD-MHC, 2014). A duplicação de loci também é uma característica marcante do MHC (BONTROP, 2006; HUGHES, 2008). Em bovinos, por exemplo, os cromossomos podem apresentar uma ou duas cópias de *DQB* (já foram descritas cinco variantes não alélicas deste gene); até três cópias de *DQA* (do total de cinco loci distintos; PARK et al., 2004; MIYASAKA et al., 2012); e três cópias de *DRB*, sendo o *DRB3* o mais polimórfico, *DRB1* um pseudogene e *DRB2* um gene monomórfico (FRITZ, 2009; BEHL et al., 2012).

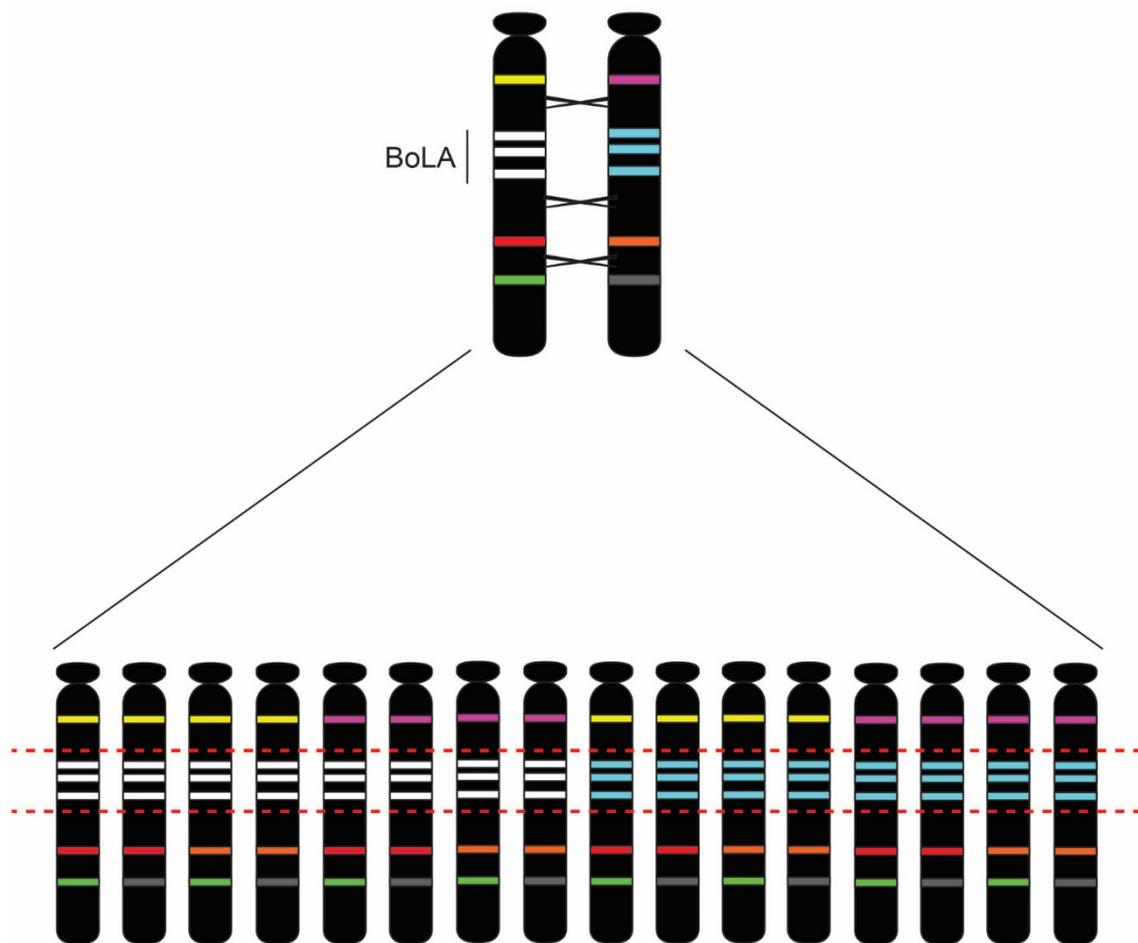
Os demais loci com atuação na apresentação de antígenos localizam-se na região de Classe I. Esta região apresenta pelo menos seis genes expressos por cromossomo. No total, já foram descritos 96 alelos para os genes clássicos (ubiquamente expressos) de *BoLA* Classe I, além de 18 alelos nos loci não clássicos (de expressão restrita; BIRCH et al., 2006; IPD-MHC, 2014).

Considerados em conjunto, (i) o alto polimorfismo dos genes, (ii) a variação em termos de número de loci entre indivíduos, e (iii) a presença de duas regiões de *BoLA* em cada organismo (uma em cada cromossomo 23), é possível perceber que a diversidade de MHC na população é elevada. Porém, esses loci estão ligados no cromossomo. No caso de *BoLA*, devido à proximidade dos loci, as regiões de Classe IIa-III-I estão em desequilíbrio de ligação (FRITZ, 2009). Portanto, os genes adjacentes são herdados em blocos (haplótipos), onde as combinações desses alelos são mantidas em ligação no decorrer das gerações (Figura 5). Esse desequilíbrio de ligação também engloba genes no entorno do *BoLA*.

A manutenção de algumas combinações de loci e alelos nos haplótipos pode ter importância evolutiva, visto que essa configuração altamente polimórfica provavelmente foi selecionada frente a pressão exercida por patógenos, de forma altamente dinâmica. De forma simplificada, a variação

genética individual e populacional impede que parasitas sejam capazes de levar uma espécie a extinção e, ao que tudo indica, esse é o principal motor da diversidade de MHC (RADWAN; BIEDRZYCKA; BABIK, 2010). Ademais, estas características tornam essa região o principal alvo de estudos relacionando o *background* genético de um indivíduo com a incidência de doenças, tanto em humanos (STEWART et al., 2004; BASCHAL et al., 2009) quanto em bovinos.

Figura 5 — Representação gráfica do desequilíbrio de ligação na região de *BoLA*.



Acima o genótipo parental e abaixo as possíveis combinações de alelos na formação do gameta. Cada barra colorida representa um alelo de um determinado locus. É possível perceber que não há recombinação entre os alelos de *BoLA*, enquanto que em outros loci a recombinação ocorre, demonstrando, assim, a manutenção de alelos ligados na região de *BoLA*.

3.5.1. Associação de *BoLA* com Doenças

Desde 1982, pesquisadores buscam associações entre a diversidade de *BoLA* e doenças (SOLBU; SPOONER; LIE, 1982 *apud* LIE et al., 1986). O

advento de novas técnicas de biologia molecular e redução dos custos possibilitaram a realização em maior escala de tais estudos. Hoje, é abundante a quantidade de pesquisas nesta área, utilizando diferentes técnicas, enfocando a relação entre alelos de *BoLA* e uma série de enfermidades que acometem os animais, dentre elas mastite, leucemia bovina viral, dermatofilose, quetose e ectoparasitoses (Tabela 1).

Tais pesquisas foram bem sucedidas em identificar alelos que se relacionam com a susceptibilidade ou resistência às enfermidades. Para mastite, estudos têm focado os genes de Classe II, com destaque ao *DRB3* (para referências, ver Tabela 1). Sharif et al. (1998a) e Sharif, Mallard e Sargeant (2000) trouxeram importantes contribuições nesse campo, onde foram capazes de identificar alelos associados com a susceptibilidade à mastite clínica severa e posições de aminoácidos importantes nesta susceptibilidade.

Apesar disso, existem resultados contraditórios entre estudos no que diz respeito ao efeito de alguns alelos específicos (DIETZ et al., 1997; KELM et al., 1997; SHARIF et al., 1998a; STARKENBURG et al., 1997; MACHADO et al., 2005). Tais contradições podem ser decorrentes do tamanho amostral e modelo estatístico, diferentes ambientes e patógenos responsáveis pela enfermidade e do próprio haplótipo de *BoLA* dos animais estudados. Esse último se deve ao fato de que estudos utilizando marcadores moleculares não necessariamente revelam efeito causal do alelo estudado, podendo representar indiretamente o efeito de regiões próximas mantidas em ligação (como acontece em estudos utilizando associação ampla do genoma; BUSH; MOORE, 2012). Portanto, diferentes populações, apesar de terem o mesmo alelo para um gene de *BoLA*, podem ter este ligado a variantes distintas de outros genes responsáveis pelo fenótipo resistente ou suscetível observado. Estudos com quadros clínicos provocados por diversos agentes tornam a identificação de associações com *BoLA* mais elusiva e complexa.

Enfermidades causadas por apenas um agente etiológico também foram avaliadas. Como exemplo disso, tem-se o vírus da leucemia bovina (Tabela 1). Juliarena et al. (2008) identificaram alelos associados tanto à resistência quanto à susceptibilidade a perfis de infecção pelo vírus. O alelo que conferia maior susceptibilidade à enfermidade já foi correlacionado em outros estudos com susceptibilidade à mastite e contagem de células somáticas (KELM et al., 1997).

Esses resultados podem indicar a possibilidade de seleção de animais resistentes a múltiplas enfermidades.

Uma vez que essas doenças, como discutido anteriormente, afetam a produção do animal, é possível relacionar alelos de *BoLA* com tais parâmetros (Apêndice A). Tais associações mostram o efeito indireto dos loci de MHC sobre o desempenho do sistema imune, podendo ser reflexo de resistência e susceptibilidade às condições ambientais que o rebanho enfrenta. Mejdell et al. (1994) demonstraram associação de alelos de *BoLA* de Classe I com a fertilidade, sendo que os indivíduos com os alelos *A2* e *A11* eram, no geral, mais férteis pela avaliação de taxa de não-retorno ao estro após 60 dias de inseminação. Mais recentemente, Machado et al. (2005) encontraram alelos de *DRB3* associados à maior produção de leite em rebanhos da raça Gir do Estado de Minas Gerais. Percebe-se assim a importância de *BoLA* nos aspectos produtivos da pecuária.

Em populações naturais da ave Chapim-real (*Parus major*), foi observado associação do MHC com o *fitness* do organismo, com impacto tanto na sobrevivência quanto no sucesso reprodutivo (SEPIL; LACHISH; SHELDON, 2013). A associação de MHC com aspectos da vida de animais silvestres e domésticos, como a quantidade de prole durante a vida, tempo de vida produtiva e tamanho da prole, apresentam-se como um interessante campo de estudos em genética animal e ganho genético.

Ressalta-se, assim, a importância destes estudos para o manejo do rebanho bovino. Pesquisas com este objetivo devem preocupar-se principalmente com o número de animais avaliados, o(s) agente(s) etiológico(s) presente(s) no quadro clínico e os loci estudados. A avaliação do haplótipo de genes de Classe I, II e/ou III pode ajudar a solucionar inconsistências entre estudos, bem como a real relação da resistência e susceptibilidade de alguns animais a doenças.

Tabela 1 — Associação de alelos de *BoLA-DRB3* com doenças.

Doença ¹	Raça	Alelo ²	Associação ³	Técnica ⁴
Ectoparasitoses				
Martinez et al. 2005	Crioulo e Brahman	*2701, *2801	Resistência	PCR-RFLP
Martinez et al. 2006	Raça mista	*18, *20, *27	Resistência	PCR-RFLP
Untalan et al. 2007	Raça mista	*4401	Resistência	PCR-RFLP, Clonagem
Duangjinda et al. 2013	Sahiwal, Raça Mista	*2, *3, *16, *20 *14, *10, *41, *51	Susceptibilidade Resistência	PCR-RFLP
Brucelose				
Martinez et al. 2005	Crioulo e Brahman	*0601	Susceptibilidade	PCR-RFLP
Mastite				
Kelm et al. 1997	Holstein	*23, *24 *16	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP PCR-RFLP
Starkenbug et al. 1997	Holstein	*24 *8	Susceptibilidade Resistência	PCR-RFLP
Duangjinda et al. 2008	Holstein x Zebu	*15, *22, *51 *1, *52	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP
Rupp et al. 2007	Holstein	*3 *8	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP
Sharif et al. 1998a	Holstein	*23	Susceptibilidade	PCR-RFLP
Hameed et al. 2008	Holstein	*23	Susceptibilidade	MPT-PCR
Kulberg et al. 2007	Nowergian Red	*11, *18, *24 *22, *26	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP
Yoshida et al. 2009	Holstein	*0101, *1501 *1101, *1201	Susceptibilidade Resistência	PCR-SBT
Yoshida et al. 2012	Holstein	*1201, *1501 *0101, *1101, *2703	Susceptibilidade Resistência	PCR-SBT
Cetose				
Sharif et al 1998a	Holstein		Sem associação	
Ovário cístico				
Sharif et al. 1998a	Holstein	*16, *22	Resistência	PCR-RFLP

Tabela 1 — Continuação

Infecção por BLV e PL					
Juliarena et al. 2008	Holstein		*11, *12 *16	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP, PCR-SSO
Juliarena et al. 2009	Holstein		*11, *12 *11, *12, *02	Resistência Resistência	PCR-RFLP, PCR-SSO
Miyasaka et al. 2013	Japanese Black		*0902, *1101 *1601	Resistência Susceptibilidade	PCR-SBT
Painei et al. 2009	Holando-Argentino		*23, *25, *28, *40 *22, *24	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP
Febre Aftosa					
Garcia-Briones et al. 2001	Hereford		*1, *3, *7 *12, *18	Resistência Susceptibilidade	PCR-RFLP
Gowane et al. 2013	Raça mista		*0201, *0801, *1501 *1801	Resistência Susceptibilidade	PCR-SBT
Baxter et al. 2010	Holstein x Charolais		*0901, *1001 *1601, *2707	Resistência Susceptibilidade	PCR-SBT
Retenção de placenta					
Sharif et al. 1998a	Holstein		*3	Resistência	PCR-RFLP
Paratuberculose					
Ratislav & Mangesh 2012	Holstein x Slovak spotted	Val53Glu, Val53Leu, Asp57His, Arg84Glu Asp57Asn, Phe60Tyr		Susceptibilidade Resistência	PCR-SSCP
Pancitopenia neonatal bovina					
Ballingal et al. 2011	Holstein			Sem associação	
Infecção por Neospora caninum					
Schwab et al. 2009	Holstein			Sem associação	

¹Trabalhos que relatam associação de alelos RFLP utilizando apenas 1-2 enzimas foram omitidos. BLV, bovine leukemia virus; PL, persistente lymphocytosis;

²A nomenclatura utilizada para o alelo varia dependendo da técnica utilizada para determiná-lo;

³A forma de diagnóstico da enfermidade e modelo estatístico variaram entre cada estudo;

⁴PCR-RFLP, polymerase chain reaction (PCR) using restriction fragment length polymorphism; MPT-PCR, multi-primer target PCR; PCR-SBT, PCR using sequence based typing; PCR-SSO, PCR using sequence-specific oligonucleotides; PCR-SSCP, PCR using single stranded conformation polymorphism.

3.5.2. Importância de se Avaliar Haplótipos

É necessário ressaltar que Maillard et al. (2003) estudaram a associação entre alelos de *DRB3* e *DQB* com a susceptibilidade à dermatofilose, descrevendo a melhor associação com o haplótipo *DRB3-DQB*, sendo validada em diversos rebanhos bovinos (MAILLARD et al., 2003). Esse trabalho permitiu a visualização da importância que a combinação de dois alelos tem na incidência da patologia nos indivíduos. A correlação entre este haplótipo e a dermatofilose é tão elevada que permitiu aos pesquisadores aplicarem uma seleção eugênica, removendo do rebanho todos os animais que apresentavam tal haplótipo. O resultado, como relatado por Maillard et al. (2003), foi a redução da prevalência da doença de 70% para 2% em 5 anos de seleção.

Seguindo esta linha de estudo, Park et al. (2004) relataram associação significativa entre um haplótipo de Classe IIa, englobando alelos de *DRB3-DQA-DQB*, e mastite em rebanho Holstein. O próprio número de cópias de genes *DQA* pareceram relacionar-se com a susceptibilidade à doença, onde animais com poucos alelos eram mais prevalentes no grupo de indivíduos susceptíveis à mastite (PARK et al., 2004).

É possível perceber que a combinação entre os alelos de *BoLA* pode ter importância na etiologia das enfermidades, sendo necessárias avaliações mais detalhadas desses loci nos estudos que abordam o assunto. A própria variação no número de cópias de alguns loci de *BoLA* pode ser importante ao avaliar a relação com características de interesse zootécnico. Além disso, é possível utilizar haplótipos como marcadores genéticos, da mesma forma que Maillard et al. (2003), e a aplicá-los à produção pecuária.

O desequilíbrio de ligação que mantém a composição do haplótipo também mantém unidos outros genes não relacionados com a apresentação antigênica. Como exemplos disso, tem-se o fator de necrose tumoral (*TNF*), na região de Classe III, cujo polimorfismo na região promotora relaciona-se com a susceptibilidade a uma série de doenças em humanos (QIDWAY; KHAN, 2011). Variantes deste gene também foram identificados em bovinos (AGABA et al., 1996; BOJAROJC-NOSOWICZ et al., 2011) bem como a associação entre seus alelos com a leucemia viral bovina (KONNAI et al., 2006). Na literatura é possível identificar outros exemplos de polimorfismos em genes na região de Classe III

que se associam a aspectos produtivos ou imunológicos dos indivíduos, como os genes *C4* e da prolactina (*PRL*) bovina (afetando a produção de leite; HE et al., 2006; BOLECKOVA et al., 2012; YANG et al., 2012) e o gene *HSP70* (como perspectiva de seleção de animais termotolerantes; BASIRICÒ et al. 2011, MAROTIS-AGOTIS et al., 2011).

A ligação entre esses genes e outros da região de *BoLA* torna complexa a identificação do real marcador genético para alguma característica de interesse. Apesar disso, em teoria, também permite a seleção de animais com haplótipos com múltiplas qualidades (termotolerância, resistência à mastite e produção de leite, por exemplo). A ampliação de estudos para a descrição de haplótipos de *BoLA* pode contribuir para o melhoramento dos rebanhos. Porém, o alto polimorfismo encontrado na região de *BoLA* impõe algumas limitações ao estudo dos haplótipos bovinos. Essa distinção nem sempre é possível ao se utilizar técnicas de biologia molecular comumente utilizadas em laboratório.

3.6. TÉCNICAS UTILIZADAS NO ESTUDO DE *BoLA*

Como foi possível observar na Tabela 1, diversas técnicas são empregadas no estudo de *BoLA*, dentre as quais a PCR-RFLP é a mais utilizada. RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) denota a utilização de enzimas de restrição na discriminação entre alelos. Assim, na técnica de PCR-RFLP, primers amplificam o gene de interesse (no caso, *DRB3*, *DQA* ou *DQB*) durante a PCR (*Polymerase Chain Reaction* — reação em cadeia da polymerase), cujo produto é clivado por três enzimas de restrição separadamente. Como resultado, cada alelo apresentará um padrão de bandas de acordo com os sítios de clivagem para cada enzima de restrição, sendo possível assim descrever quais alelos cada indivíduo apresenta para determinado gene (VAN EIJK; STEWART-HAYNES; LEWIN, 1992).

Como essa técnica se baseia em diferenças na sequência de DNA afetando os sítios de clivagem para cada enzima, nem sempre é possível discriminar todos os alelos existentes, principalmente se a diferença entre os mesmos for menor que quatro aminoácidos. Assim, diversos alelos apresentam os mesmos padrões de bandamento. Portanto, a técnica de PCR-RFLP, apesar

de barata e prática, possui baixa resolução, sendo incapaz de descrever todos os alelos de *BoLA* e gerando ambiguidade nos resultados.

Como alternativa, foram desenvolvidas técnicas baseadas no sequenciamento do gene. Enquanto muitos trabalhos utilizavam vários primers para englobar toda diversidade de *DRB3*, Miltiadou, Law e Russel (2003) desenvolveram um ensaio robusto e de alta resolução, baseado no sequenciamento do segundo éxon do gene *DRB3*, permitindo assim uma maior capacidade de distinção entre alelos de diversos rebanhos. Para distinção entre alelos, conta-se com a utilização de softwares capazes de distinguir entre alelos de animais heterozigotos ou clonagem.

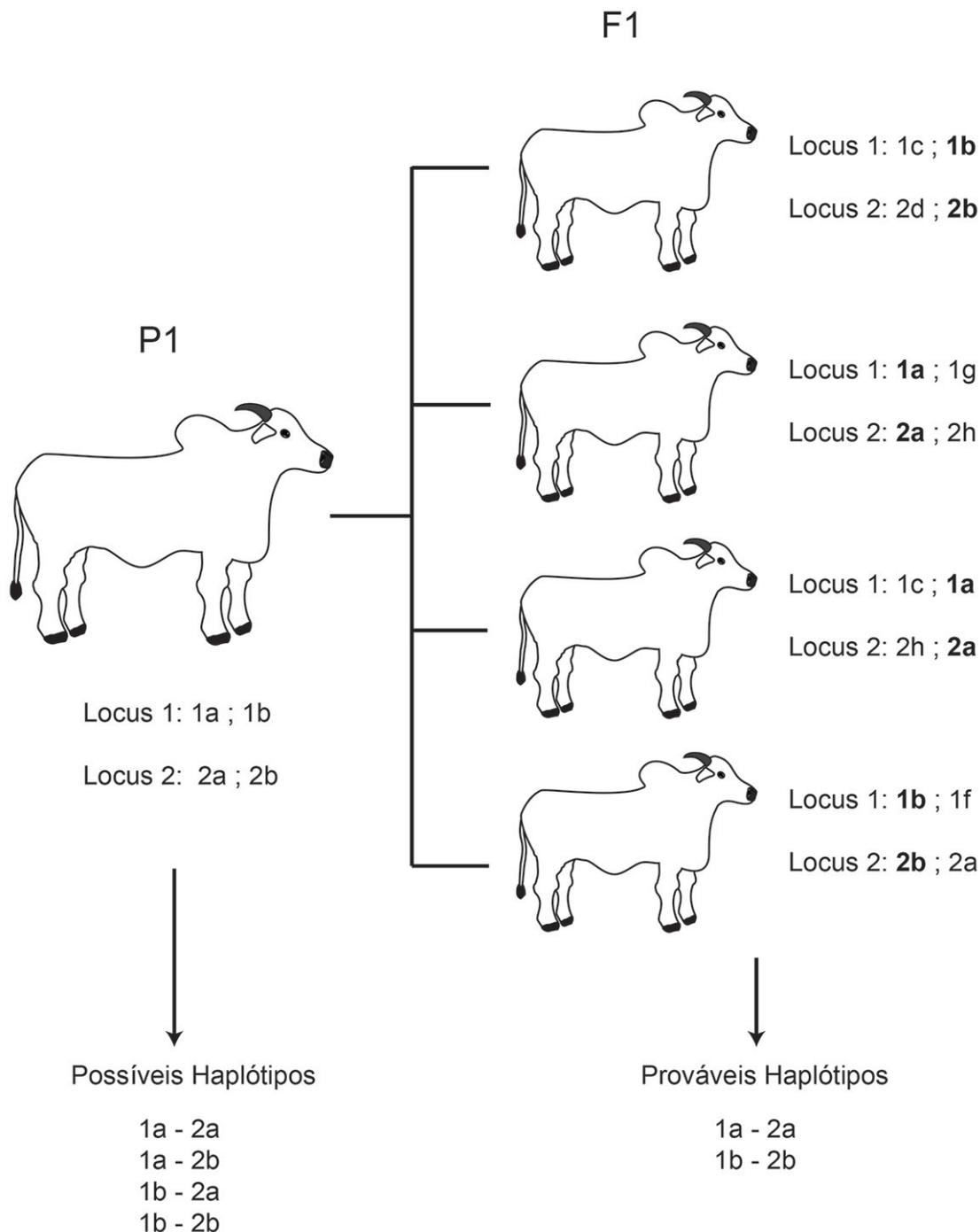
Com a utilização de ambas as técnicas é possível descrever quais alelos cada animal apresenta para cada um dos loci de *BoLA* de Classe II. Porém, para a descrição de haplótipos é preciso conhecer quais alelos estão ligados entre si, compondo uma das moléculas de DNA do cromossomo 23. Para tal, outras abordagens são utilizadas.

3.6.1. Dificuldades no Estudo de Haplótipos

No estudo de haplótipos é comumente empregada a avaliação de animais homozigotos para a região do MHC. Assim, ao determinar que o indivíduo é homozigoto (a partir da análise de SNPs ou microssatélites), basta sequenciar cada loci para compor um haplótipo. A partir da descrição dos principais haplótipos que compõem uma população, é possível realizar inferências para determinar os haplótipos de indivíduos heterozigotos a partir dos alelos que eles possuem (FRITZ, 2009; MIYASAKA et al., 2012).

Outras abordagens para descrição da composição e estrutura do MHC utilizam a comparação dos alelos parentais com o da prole para inferir quais estão ligados em cada haplótipo (MAILLARD; MARTINEZ; BENSAID, 1996; MIYASAKA et al., 2012). Na Figura 6, hipoteticamente, um touro com os alelos 1a e 1b para um locus, e 2a e 2b para o segundo locus, apresenta quatro possíveis haplótipos para esta região. Se sua prole invariavelmente apresentar a combinação 1a e 2a ou 1b e 2b, sabemos assim quais alelos estão ligados em cada haplótipo.

Figura 6 — Descrição de haplótipos de *BoLA* utilizando comparações entre alelos parentais e de sua prole.



Na esquerda, observa-se os alelos em dois *loci* hipotéticos de *BoLA* no indivíduo P1. O animal é heterozigoto para ambos os loci, apresentando portanto quatro possibilidades de haplótipos a partir da combinação entre os alelos. Sua prole (F1) apresenta metade de seus alelos provenientes de cada progenitor. Avaliando os alelos de cada indivíduo, nota-se que os alelos parentais 1a e 2a e os alelos 1b e 2b sempre encontram-se juntos na prole, sendo inferido que os mesmos estão em desequilíbrio de ligação. Assim, os prováveis haplótipos parentais são 1a-2a e 1b-2b. Necessário ressaltar que análises mais profundas são usadas para determinar com precisão os haplótipos, incluindo a herança familiar de até três gerações (F3).

Acredita-se que a diversidade de *BoLA* seja mantida por sobredominância ou seleção dependente de frequência, de forma que há a manutenção de elevados níveis de diversidade genética e animais heterozigotos [para melhor entendimento das teorias acerca da evolução do MHC, ver PIERTNEY; OLIVER (2006)]. Assim, a porcentagem de animais homozigotos para o MHC nas populações é baixa (MILTADOU; LAW; RUSSEL, 2003; TAKESHIMA et al., 2003), restringindo a possibilidade de estudos mais amplos.

Por outro lado, a comparação dos alelos parentais e da prole só é possível em rebanhos onde é realizado o registro dos cruzamentos e reprodução controlada dos indivíduos. Rebanhos criados em sistemas menos intensivos, particularmente em que os animais sejam criados livres e não haja controle da reprodução, impossibilitariam a utilização dessa abordagem. Nesse âmbito, a composição de haplótipos de grande parte dos rebanhos no estado do Pará seria difícil de se obter.

Novas metodologias que sejam capazes de avaliar o haplótipo de animais heterozigotos ou sem registro da reprodução poderiam tornar mais viável a disseminação de estudos com o *BoLA*, com destaque para sua aplicação em raças regionais, visto que a maior parte das pesquisas publicadas com *BoLA* foi realizada em outros países e os relatos de haplótipos de gado zebuino são escassos.

3.7. BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO COMO ALTERNATIVA AO ESTUDO DE *BoLA*

Haja vista a necessidade de animais homozigotos para uma determinação haplotípica mais eficaz, a utilização de células haploides de indivíduos heterozigotos poderia suprir essa necessidade. Sabe-se que, em mamíferos, durante a meiose, uma célula diploide origina um (óvulo) ou quatro espermatozoides com metade do seu componente genético, que são portanto haploides e apresentam apenas uma cópia de cada cromossomo materno ou paterno, respectivamente. Assim, naturalmente é possível obter-se célula com apenas um haplótipo de MHC a partir de indivíduos heterozigotos.

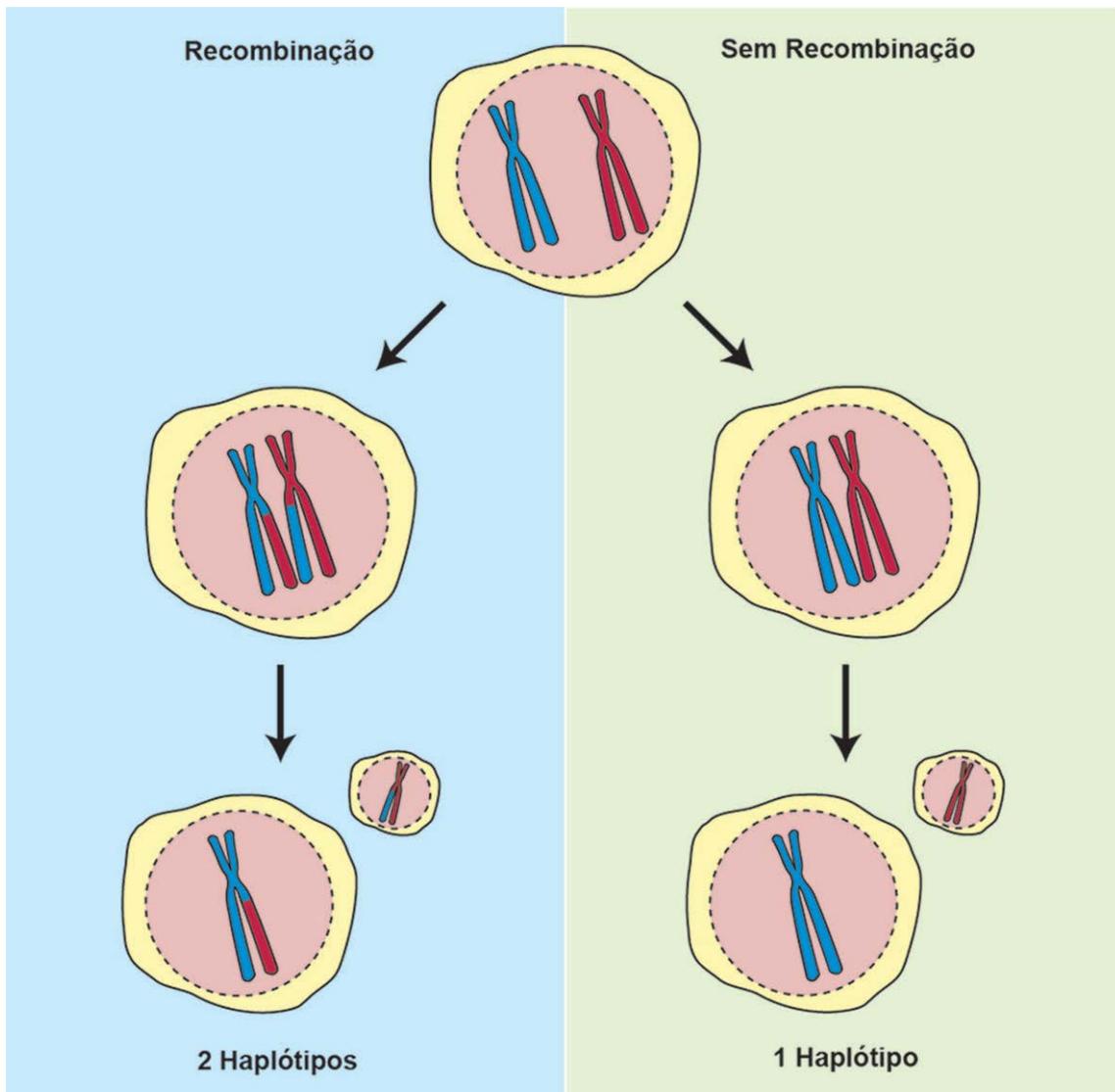
Com técnicas como a *Ovum pick-up* e punção de ovários obtidos de abatedouros, é possível se obter o gameta feminino (oócito) e utilizar seu

genoma haploide para o estudo de *BoLA*. Tal abordagem já foi utilizada para definir a posição relativa de três genes de *BoLA*, a partir da taxa de recombinação entre estes, no cromossomo 23 bovino (JARREL et al., 1995). Uma barreira para a utilização destas células para o estudo do haplótipo de animais heterozigotos seria a recombinação que ocorre durante a meiose. Após a meiose I, os cromossomos possuem cromátides irmãs unidas pelo centrômero. Caso estas tenham sofrido recombinação com as cromátides do cromossomo homólogo, cada cromátide-irmã pode apresentar alelos diferentes em loci para o quais a mãe fosse heterozigota (Figura 7).

No entanto, a porcentagem de recombinação dentro de *BoLA* é baixa, exceto entre as Classes IIb e IIa/III/I (FRITZ, 2012). Além disso, teoricamente espera-se que alguma porcentagem dos gametas não sofra recombinação upstream a essa região. Portanto alguns destes gametas teriam cromátides irmãs com o mesmo haplótipo de *BoLA*, sendo virtualmente homozigotas nesta região. Apesar disso, se a utilização de células gaméticas pode ser uma alternativa viável para o estudo dos haplótipos de *BoLA* ainda precisa ser elucidada.

A utilização de oócitos apresenta o problema da quantidade de DNA presente em cada gameta. Um único núcleo torna análises de sequenciamento desafiadoras. Para tal, é possível realizar a ativação partenogenética de oócitos para a produção de embriões não fertilizados (PAFFONI et al., 2008), sendo necessário mimetizar as sinalizações intracelulares que ocorrem no oócito durante a fecundação. É possível alcançar tal resultado utilizando um ionóforo de cálcio combinado com inibidor de proteínas quinase ou de síntese protéica (ALEXANDER; FRAGA; DA SILVA, 2006), entre diversas outras metodologias possíveis de serem utilizadas para ativação deste gameta (KARCHE & BIRADE, 2013). Assim, inicia-se o desenvolvimento embrionário com apenas o complemento genético do oócito.

Figura 7 — Representação simplificada da Meiose I, ilustrando um cromossomo que sofreu recombinação e um que não sofreu.



Durante a maturação *in vitro*, o primeiro corpúsculo polar é extruído no final da Meiose I. Após a ativação partenogenética, o embrião apresenta um estado diploide, resultando em perfil genômico homozigoto ou heterozigose associada aos eventos de recombinação (PAFFONI et al., 2008).

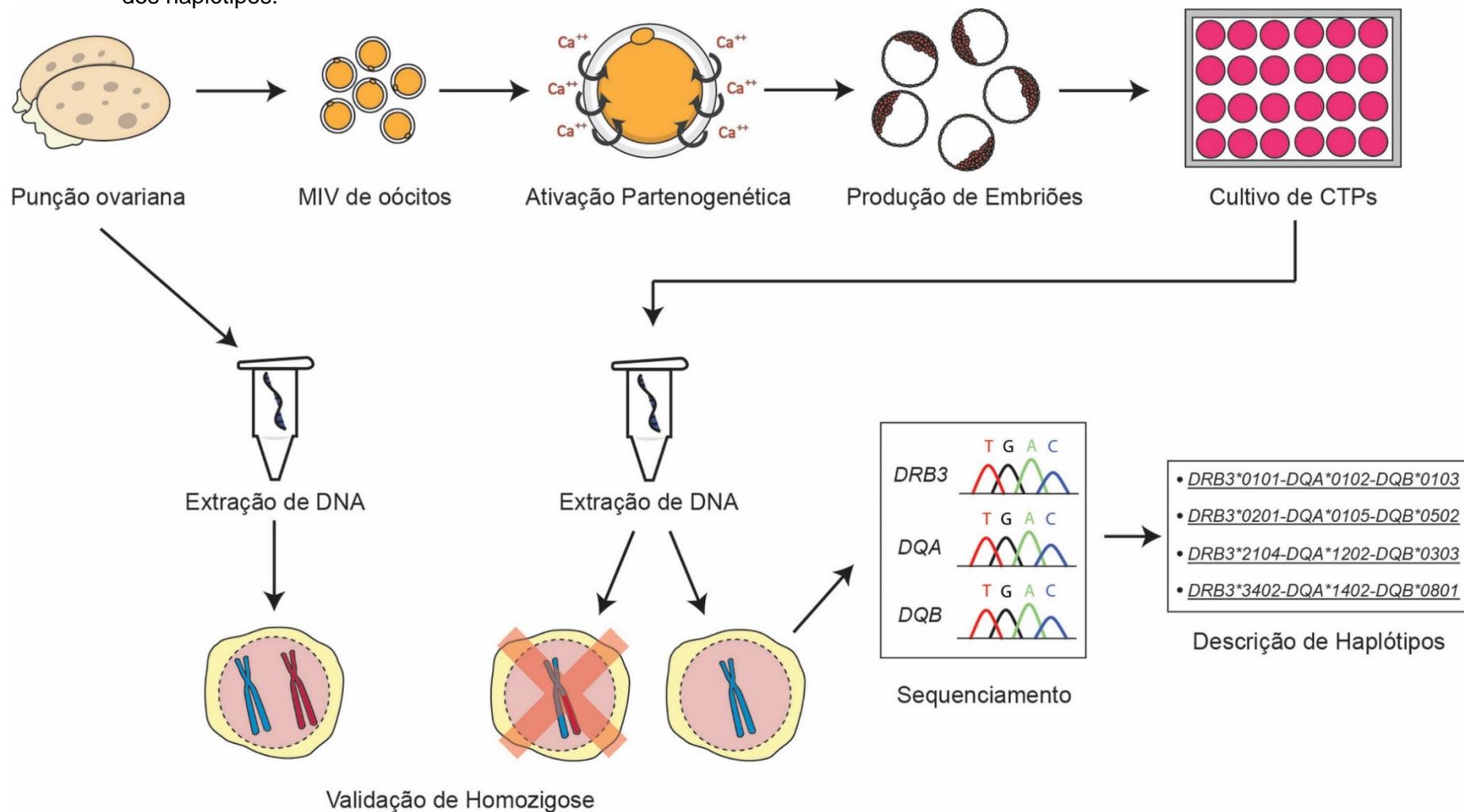
Dessa forma, partindo de uma única célula é possível alcançar um embrião com em torno de cem células. Utilizando protocolos de isolamento e cultivo de células de trofoblasto (DOUGLAS et al, 2009; GOLDINIG, 2012), é possível expandir as células da camada mais superficial do embrião. Assim, hipoteticamente, a combinação de ativação partenogenética com a expansão de células trofoblásticas pode ser utilizada para elevar o número de cópias do genoma do oócito e permitir analisar os haplótipos de *BoLA*. No Brasil, onde as biotecnologias da reprodução estão se disseminando cada vez mais (visto que é o país que mais produz embriões *in vitro* no planeta, representando 86% da produção mundial; IETS, 2012), esta abordagem pode ser mais viável que outros métodos para descrição de haplótipos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

De forma a validar a utilização de células trofoblásticas partenogenéticas na descrição de haplótipos de *BoLA*, pares de ovários de fêmeas bovinas foram obtidos em abatedouro frigorífico que foram submetidos a punção folicular para recuperação dos complexos *cumulus-oophorus* (CCOs). Todas as etapas experimentais foram realizadas de forma a não misturar o material biológico de cada fêmea. Paralelamente, uma biópsia ovariana de cada fêmea foi retirada para extração de DNA. Após maturação *in vitro* dos oócitos, estes foram ativados partenogeneticamente e cultivados até o décimo terceiro dia de cultivo. Todos os embriões eclodidos obtidos foram plaqueados em placa de 24 poços para isolamento e expansão das células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs). Estas, após proliferação, foram estocadas e tiveram seu DNA extraído para validação da sua homozigose em *BoLA*. Por fim, todas as CTPs consideradas homozigotas em *BoLA* tiveram seu haplótipo de *BoLA-DRB3-DQA-DQB* descrito (Figura 8).

Figura 8 — Esquema geral do experimento, ilustrando as etapas desde a obtenção dos oócitos até o sequenciamento dos alelos e descrição dos haplótipos.



MIV, maturação in vitro; CTP, célula trofoblástica partenogênética.

4.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PARTENOGENÉTICOS

4.2.1. Coleta de Ovários

Os ovários bovinos foram obtidos do matadouro frigorífico da Sociedade Cooperativa dos Pecuáristas - SOCIPE, em Belém (PA). O gado abatido é na sua maioria zebu mestiço, com forte influência da raça Nelore. Após a coleta, os ovários foram lavados e transportados em solução salina, dentro de recipiente térmico, em um período máximo de três horas. Todas as etapas de punção folicular, ativação partenogenética, cultivo *in vitro* e expansão das células foram realizadas no Laboratório de Fertilização *In Vitro*, da Universidade Federal do Pará (Belém/PA).

Para descrever os haplótipos das fêmeas, a coleta foi realizada de forma a isolar os pares de ovários de cada fêmea, desde o momento da coleta e transporte, tendo as etapas da punção e rastreio, bem como todo o cultivo subsequente, sido realizada isolando o material biológico de cada fêmea. Uma biópsia do ovário foi realizada utilizando lâmina de bisturi, estocando-a em 96% de etanol a -20 °C. As fêmeas foram selecionadas baseado na maior quantidade de folículos de 2 a 8 mm. Em laboratório, foi feita a punção dos folículos utilizando agulha 40 x 12, estocando-se o líquido folicular em tubos de 1,5 ml.

4.2.2. Rastreio e Maturação *In Vitro* (MIV) de Oócitos

Após sedimentação do líquido folicular, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* colocado em placas de 60 mm para rastreio dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs) com auxílio do estereomicroscópio, em fluxo laminar. Foram selecionados todos os CCOs que apresentaram pelo menos uma camada de células do *cumulus*. Esta metodologia foi utilizada visto que a punção de apenas dois ovários resulta numa população reduzida de oócitos, onde poucos teriam boa qualidade morfológica.

Para a maturação *in vitro*, até 15 CCOs foram incubados em gotas de 100 µl de meio de maturação por 24 horas, consistindo de TCM 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 µg/ml de FSH, 50 IU/ml de LH, 100 µg/ml de gentamicina, 50 µM β-mercaptoetanol. As gotas foram cobertas de óleo mineral

e a incubação realizada em estufa de CO₂ a 5%, com 38,5 °C de temperatura e atmosfera úmida.

4.2.3. Ativação Partenogenética

A ativação partenogenética foi feita de acordo com Miranda et al. (2009). Após 24 horas de MIV, os oócitos foram desnudados através de pipetagens em 0,5 µg/mL de hialuronidase. Com 26 horas a partir do início da maturação, foram submetidos a ativação partenogenética, que consistiu em três etapas: exposição à ionomicina, lavagem em meio saturado de BSA e incubação em 6-DMAP.

A ativação foi iniciada em meio TCM 199 contendo 5 µM de ionomicina e 1 mg/mL de BSA, por um período de 5 minutos, depois do qual os oócitos eram lavados e incubados em gotas de meio saturado com BSA (TCM 199 com 30 mg/mL de BSA) por mais 5 minutos e então incubados por 3 horas em 6-DMAP (SOF - Synthetic Oviductal Fluid - suplementado com 2 mM 6-DMAP). Terminado o período de incubação, os oócitos prosseguiram para o cultivo embrionário.

4.2.4. Cultivo *In Vitro* de Embriões

O cultivo dos embriões partenogenéticos foi realizado em gotas de 100 µl de meio SOF suplementado com 10% de SFB, piruvato, BSA e gentamicina, durante sete dias nas mesmas condições da maturação *in vitro*. Não foi utilizado sistema de cocultivo para evitar contaminação com células da granulosa no momento do isolamento de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs). No segundo dia (D2) foi observado a taxa de clivagem e no oitavo dia (D8) a taxa de produção embrionária.

4.3. CULTIVO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS (CTPs)

O protocolo descrito a seguir é uma modificação dos protocolos de isolamento e cultivo de células-tronco trofoblásticas de Hashizume et al. (2006); Vandevoort, Thirkill e Douglas (2007); e Golding (2012). É necessário a utilização de monocamada de fibroblastos fetais de camundongo ou meio condicionado

por esse tipo celular e/ou fatores de crescimento para cultivo de células-tronco trofoblásticas. Visto que a utilização de fibroblastos fetais poderia representar contaminação de células diploides ao cultivo, os mesmos não foram utilizados. Os fatores de crescimento são necessários para manter a pluripotência das linhagens, portanto não foram utilizados já que não é o objetivo deste trabalho obter células pluripotentes. O meio descrito a seguir foi denominado meio de cultivo de CTPs.

Embriões partenogênicos eclodidos foram recolhidos do oitavo dia (D8) ao 13º dia de cultivo (D10+). Os mesmos foram plaqueados individualmente na placa de 24 poços em meio de cultivo de CTPs, composto de Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Life Technologies) com 15% de soro fetal bovino, 1% de MEM, 10 µg/ml de Gentamicina, 100 µM de β -mercaptoetanol e 1µg/ml de heparina e o meio trocado de 1-2 dias. As CTPs eram mantidas em cultivo até atingirem a confluência e, por fim, estocadas para a extração de DNA. Para tal, após sucessivas lavagens em PBS, as células eram removidas da placa a partir de pipetagens e as células estocadas em 200 µL de PBS a -20°C até o momento da extração.

4.4. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das CTPs e das biópsias ovarianas foi realizada utilizando o QIAmp DNA Blood mini kit (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. A extração de DNA foi feita no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

4.5. VALIDAÇÃO DA HOMOZIGOSE

Para validar a abordagem da utilização de células de trofoblasto de embriões partenogênicos na descrição de haplótipos de *BoLA*, se faz necessário confirmar que a amostra é homocigota e que foi possível descrever haplótipos de animais heterocigotos. Portanto, foi realizado a validação da homocigose, comparando o genoma da fêmea (a partir das biópsias dos ovários) com o genoma das linhagens CTPs que foram obtidas a partir de seus oócitos.

Para tal, duas abordagens foram utilizadas. Inicialmente, em parceria com o prof. Dr. Loren C. Skow da Texas A&M University, 15 amostras de CTPs e a fêmea da qual cada uma destas foi derivada foram submetidas a análise de SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphism*) usando um ensaio customizado de genotipagem *GoldenGate*, utilizando SNPs do chip Illumina BovineHD. Estas amostras eram provenientes de fêmeas diversas, onde a ativação não foi feita isoladamente para cada fêmea. Portanto, não se sabia a origem de cada CTP (excetuando-se uma, cujo DNA da fêmea também foi genotipado). Estas 15 amostras CTPs e uma fêmea bovina foram obtidas durante as repetições piloto que deram origem ao presente trabalho.

O ensaio incluía 445 SNPs na região de *BoLA* (BTA 23, coordenadas 26,101,031-29,483,933; Apêndice B). Os SNPs foram distribuídos nas regiões de Classe I (172 SNPs), Classe I estendida (Classe I-ex; 42 SNPs), Classe IIa (98 SNPs) e Classe III (133 SNPs). A genotipagem foi realizada na Texas A&M Agrilife Genomics and Bioinformatics Services Facility, onde as leituras dos genótipos foram fornecidas para análise no presente trabalho.

A segunda abordagem foi a comparação entre os alelos do gene *DRB3* entre a fêmea e as CTPs derivadas da mesma. Para esta análise, utilizou-se outras 41 linhagens de CTPs produzidas durante as repetições experimentais do presente trabalho. Para tal, o gene *DRB3* das fêmeas e amostras CTPs foram submetidos a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciadas, de acordo com o protocolo descrito na próxima seção.

3.6. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE *BoLA* CLASSE IIa

A descrição dos haplótipos de *BoLA* de Classe IIa foi realizada através do sequenciamento do éxon 2 dos genes *DRB3*, *DQA* e *DQB*. Para tal, as CTPs homozigotas foram submetidas à PCR utilizando pares de primers para cada gene (Tabela 2). A reação de PCR para os genes difere apenas na temperatura de anelamento, conforme mostra a Tabela 3. As mesmas foram realizadas em um volume final de 25 µL, utilizando tampão de reação (10x), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 5 pmoles de cada primer e 0,5 IU de Taq Polymerase. A quantidade de DNA foi otimizada individualmente para cada amostra. Tais

rotinas de amplificação foram realizadas no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

O produto de PCR foi confirmado em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio. Os produtos foram então purificados por Illustra ExoProStar 1-Step e utilizados para a reação de sequenciamento no equipamento 3130 Genetic Analyzer. As sequências foram lidas nas duas direções e pelo menos duas reações de sequenciamento foram feitas para confirmar o alelo de cada amostra. Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Polimorfismo do DNA da UFPA. A partir das sequências para cada gene, os haplótipos foram anotados manualmente.

Tabela 2 — Sequência dos primers utilizados na PCR e sequenciamento dos genes *BoLA-DRB3*, *-DQA*, *-DQB*.

Gene	Primer	Sequência 5'-3'
<i>DRB3</i> ¹	F - LA-31	GATGGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCT
	R - LA-32	CTTGAATTCGCGCTCACCTCGCCGCTG
<i>DQA</i> ²	F	CGACTCAGCTGACCACATTG
	R	TGGGGACACATACTGTTGGTAG
<i>DQB</i> ³	F - LA-40	ACTGGATCCCCCGCAGAGGATTTCTG
	R - LA-41	ATAGAATTCACCT(A/T)GCCGCTGCCAGG

¹ Sigurdardóttir et al. (1991); ² Baseado em sequências parciais dos primers AG3 e AG4 descrito por Gelhaus et al. (1995); ³ R – LA-41 utilizado foi baseado em Sigurdardóttir et al. (1992) porém teve a última base da extremidade 3' removida devido ao polimorfismo A/T presentes nos alelos deste gene.

Tabela 3 — Condições de termociclagem para os genes *DRB3*, *DQA* e *DQB*.

Gene	Desnaturação				
	Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
	1 ciclo		35 ciclos		1 ciclo
<i>DRB3</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 seg	60°C, 30 seg	72°C, 30 seg	72°C, 10 min
<i>DQA</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 seg	55°C, 30 seg	72°C, 30 seg	72°C, 10 min
<i>DQB</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 seg	55°C, 30 seg	72°C, 30 seg	72°C, 10 min

3.7. ANÁLISE DE DADOS

As médias e porcentagens utilizadas neste trabalho foram calculados nos softwares Microsoft Excel 2013 e SigmaPlot 11.0. As genotipagens de SNPs foram analisadas utilizando o software Microsoft Excel 2013. Para comparação entre proliferação até extração e dia do plaqueamento do embrião (em relação ao dia do matadouro), foi realizado o teste de Chi-Quadrado. Para comparação entre quantidade de SNPs heterozigotos entre amostras heterozigotas e homozigotas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. A diferença entre ausência de genotipagem entre amostras homozigotas e heterozigotas foi avaliada por Teste T. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% e a avaliação foi feita no software SigmaPlot 11.0.

5. RESULTADOS

5.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES, CULTIVO E EXPANSÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS

Um total de 60 fêmeas bovinas foram selecionadas para a ativação partenogenética de seus oócitos, divididas em quatro repetições. O número de oócitos por fêmea foi variável, tendo em média $9,1 \pm 5,6$. Destas, 56 possuíam oócitos viáveis. As taxas de clivagem e blastocistos para cada fêmea estão resumidas na Tabela 4. Após o plaqueamento para isolamento das CTPs, os embriões eclodidos exibiam diferentes morfologias durante o cultivo. Alguns regrediam e sofriam necrose após 1 ou 2 semanas. Os demais exibiam aspectos morfológicos similares aos descritos para células tronco trofoblásticas: formação de uma camada de células fortemente unidas, com a emissão de vesículas similares ao trofocotoderma de embriões (HASHIZUME et al., 2006; VANDEVOORT; THIRKILL; DOUGLAS, 2007; GOLDING, 2012; Figura 9).

A grande adesão que as células mantinham entre si, sendo similar a um tecido, impediam a observação da morfologia individual de cada célula e dificultaram a estimativa da quantidade de células em cada cultivo. Essa unidade não era rompida mesmo por tratamentos prolongados (>1 hora) em tripsina a 0,25%. Entretanto, isto não dificultava a recuperação para extração de DNA, pois leves pipetagens eram o suficiente para remover este tecido da placa e retirá-lo por completo da superfície de cultivo. Da mesma forma, durante as trocas diárias de meio, era necessária cautela para que este tecido não fosse retirado indevidamente. Não obstante, a proliferação das células na placa de 24 poços permitia realizar estes procedimentos a olho nu.

As CTPs foram cultivadas de forma a permitir máxima expansão na placa de 24 poços. Todavia, nenhuma foi capaz de expandir até ocupar toda área de cultivo. Não obstante, as que alcançaram pelo menos 50% de confluência e estacionaram no crescimento também foram recuperadas para a extração. Apesar de a troca do meio de cultivo ser feita diariamente, era comum observar uma sensível alteração no pH do meio. Portanto, o método de cultivo empregado ainda pode ser otimizado.

Tabela 4 — Resumo dos dados de produção de embriões partenogênicos e plaqueamento de células trofoblásticas partenogênicas (CTPs) para cada fêmea usada neste estudo.

Fêmeas 1	N de Oócitos	Clivados (D2)	Taxa de Clivagem	Blastocistos (D8)	Taxa de Blastocistos	D8/D2	N de Embriões Plaquetados	N de CTPs Extraídas
1Ov01	19	16	84,21%	10	52,63%	62,50%	8	5
1Ov02	7	6	85,71%	4	57,14%	66,67%	2	1
1Ov03	15	13	86,67%	11	73,33%	84,62%	8	4
1Ov04	3	2	66,67%	0	0,00%	0,00%	0	0
1Ov05	4	3	75,00%	1	25,00%	33,33%	1	0
1Ov06	6	4	66,67%	1	16,67%	25,00%	0	0
1Ov07	12	9	75,00%	3	25,00%	33,33%	3	1
1Ov09	15	12	80,00%	1	6,67%	8,33%	0	0
1Ov10	10	8	80,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
1Ov11	5	3	60,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
1Ov12	9	8	88,89%	5	55,56%	62,50%	3	0
1Ov13	3	1	33,33%	0	0,00%	0,00%	0	0
1Ov14	2	2	100,00%	1	50,00%	50,00%	1	1
1Ov15	2	2	100,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
1Ov16	1	1	100,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov01	7	5	71,43%	4	57,14%	80,00%	4	3
2Ov02	9	7	77,78%	2	22,22%	28,57%	1	0
2Ov03	1	0	0,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov04	6	4	66,67%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov05	5	5	100,00%	1	20,00%	20,00%	1	1

Tabela 4 — Continuação.

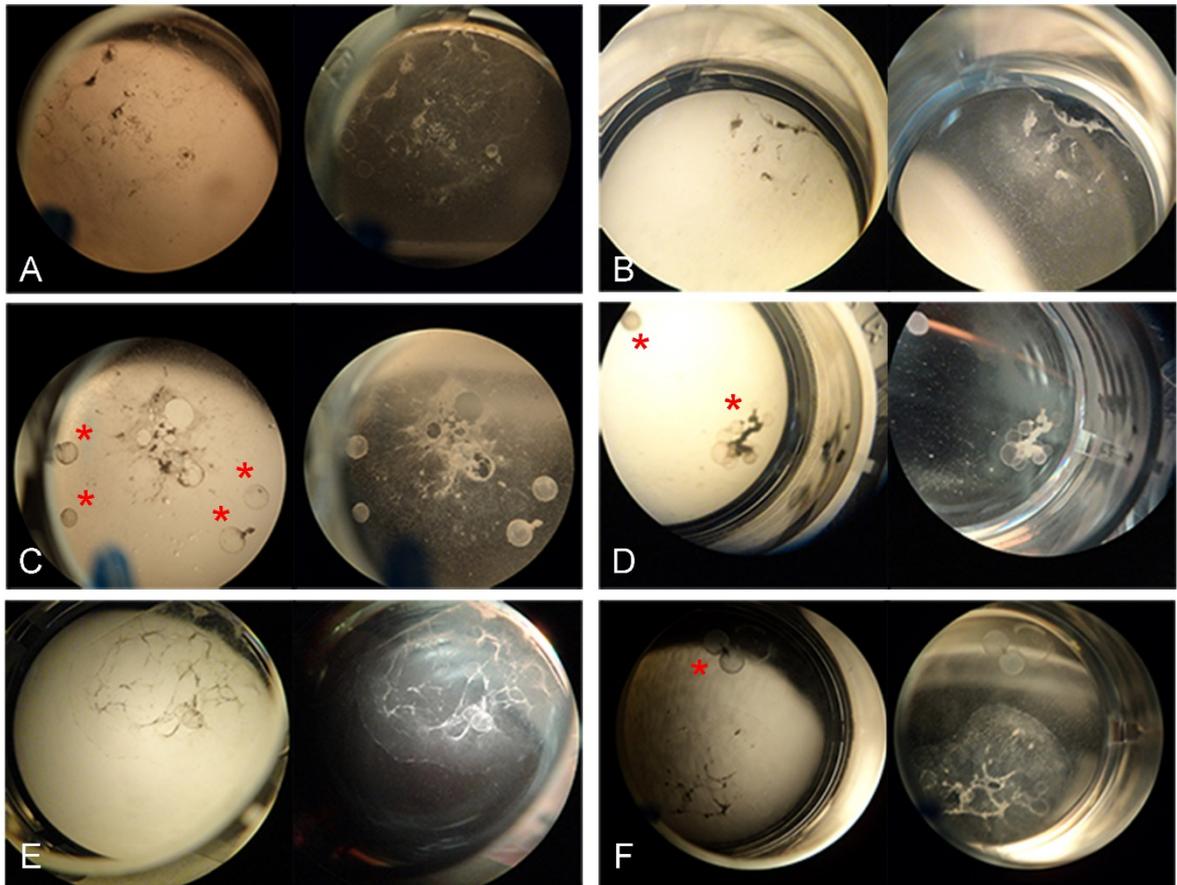
Fêmeas	N de Oócitos	Clivados (D2)	Taxa de Clivagem	Blastocistos (D8)	Taxa de Blastocistos	D8/D2	N de Embriões Plaqueados	N de CTPs Extraídas
2Ov07	12	9	75,00%	7	58,33%	77,78%	7	7
2Ov08	5	5	100,00%	1	20,00%	20,00%	1	1
2Ov09	2	0	0,00%	1	50,00%	0,00%	1	1
2Ov10	2	2	100,00%	1	50,00%	50,00%	1	1
2Ov11	4	3	75,00%	0	0,00%	0,00%	1	1
2Ov12	12	12	100,00%	3	25,00%	25,00%	3	1
2Ov13	11	6	54,55%	2	18,18%	33,33%	2	0
2Ov14	3	2	66,67%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov15	8	3	37,50%	1	12,50%	33,33%	1	0
2Ov16	12	4	33,33%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov17	5	1	20,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
2Ov18	16	1	6,25%	2	12,50%	200,0%	2	0
2Ov19	8	6	75,00%	2	25,00%	33,33%	2	0
2Ov20	11	6	54,55%	2	18,18%	33,33%	2	0
3Ov01	15	11	73,33%	3	20,00%	27,27%	2	0
3Ov02	8	4	50,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
3Ov03	11	7	63,64%	3	27,27%	42,86%	2	1
3Ov04	12	10	83,33%	6	50,00%	60,00%	6	0
3Ov05	8	3	37,50%	0	0,00%	0,00%	0	0
3Ov06	30	9	30,00%	1	3,33%	11,11%	0	0
3Ov08	14	11	78,57%	7	50,00%	63,64%	5	1

Tabela 4 — Continuação.

Fêmeas	N de Oócitos	Clivados (D2)	Taxa de Clivagem	Blastocistos (D8)	Taxa de Blastocistos	D8/D2	N de Embriões Plaqueados	N de CTPs Extraídas
3Ov09	15	11	73,33%	4	26,67%	36,36%	3	2
3Ov10	9	9	100,00%	7	77,78%	77,78%	5	1
3Ov11	4	2	50,00%	1	25,00%	50,00%	1	0
3Ov12	5	3	60,00%	0	0,00%	0,00%	0	0
3Ov13	3	1	33,33%	2	66,67%	200,0%	2	0
3Ov14	7	5	71,43%	4	57,14%	80,00%	1	0
3Ov15	9	6	66,67%	6	66,67%	100,0%	5	3
3Ov16	9	8	88,89%	2	22,22%	25,00%	2	0
4Ov01	17	15	88,24%	4	23,53%	26,67%	2	0
4Ov02	22	14	63,64%	8	36,36%	57,14%	7	1
4Ov04	16	12	75,00%	5	31,25%	41,67%	6	2
4Ov05	13	13	100,00%	7	53,85%	53,85%	3	1
4Ov06	10	8	80,00%	2	20,00%	25,00%	2	0
4Ov07	9	8	88,89%	3	33,33%	37,50%	1	0
4Ov08	12	11	91,67%	4	33,33%	36,36%	3	1
Média	9,11	6,29	68,63%	2,59	26,35%	37,74%	2,01	0,73
Total	510	352	-	145	-	-	113	41

¹Cada fêmea está representada por uma linha. A nomenclatura utilizada segue a seguinte regra: XOvYY, onde "X" representa a em qual repetição esta fêmea foi selecionada (de 1 a 4); "Ov" diz respeito ao fato de ser DNA ovariano; e YY refere-se ao número da fêmea dentro da repetição (01 referindo-se à primeira fêmea e assim por diante). Esta nomenclatura foi utilizada de forma a individualizar cada fêmea durante os experimentos, bem como correlacionar com a nomenclatura utilizada para cada amostra CTP (de forma a saber de que fêmea cada CTP era proveniente).

Figura 9 — Células trofoblásticas partenogénéticas (CTPs) em cultivo na placa de 24 poços.



As imagens foram capturadas de forma manual, na tentativa de observar toda a área do poço de 24 poços (21,4 mm de diâmetro). Em cada imagem é possível observar cada cultivo em dois contrastes distintos. *A-B*, CTPs com pouca formação de vesículas similares a camada de trofoectoderma de blastocistos (vesículas encontram-se indicadas por asteriscos vermelhos); *C*, CTP com grande emissão de vesículas; *D*, CTP que não aderiu à superfície de cultivo, porém continuou crescendo em forma de vesículas; *E*, após alcançar expansão máxima, CTP apresentava grande liberação de restos celulares, formando espaços vacuolizados e sem células; *F*, após a emissão de vesículas, estas esporadicamente se aderiam a placa e começavam a formar uma nova camada de células. A primeira coluna (*A*, *C* e *E*) são imagens de CTPs logo antes da recuperação para extração de DNA.

Foram feitas tentativas de expansão das CTPs para aumentar a quantidade de células para extração. Pipetagens sucessivas para rompimento de parcela do tecido e plaqueamento dos fragmentos resultantes em dois poços diferentes não demonstrou bom resultado, pois as células perdiam viabilidade. Da mesma forma, a ruptura do tecido utilizando uma ponta afiada (pipeta de vidro ou bisturi) também resultava em perda de viabilidade, pois eram necessárias pipetagens para sua remoção da placa e expansão. A melhor forma de expandir as CTPs foi o plaqueamento das vesículas similares a células do trofoectoderma, emitidas espontaneamente durante cultivo. Estas, no geral, eram capazes de plaquear e proliferar em um novo poço.

Apenas 8% dos oócitos cultivados produziram CTPs viáveis para a extração (Tabela 5). Apesar disso, 36,2% dos embriões que foram plaqueados foram capazes de proliferar até uma confluência razoável e foram extraídos. O dia do plaqueamento do embrião (plaqueado em D8, D9 ou D10+) não afetou a capacidade proliferativa da CTP para extração ($P = 0,104$).

Tabela 5 — Resumo da eficiência da utilização de ativação partenogenética de oócitos bovinos para produção de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) para extração de DNA.

	Oócitos	Clivados	Blastocistos D8	N de Embriões Plaqueados	CTPs Extraídas
N	510	352	145	113	41
	100,00%	69,02%	28,43%	22,15%	8,03%
%¹		100,00%	41,19%	32,10%	11,65%
			100,00%	77,93%	28,28%
				100,00%	36,28%

¹ Porcentagem do total de fêmeas utilizadas em cada etapa.

5.2. EXTRAÇÃO DE DNA E PCR DOS GENES ALVOS

Quarenta e uma CTPs foram extraídas neste estudo, num total de 114 cultivadas (Tabela 5). A eficiência de expansão para extração foi de 36,2%. Devido a maior quantidade de embriões produzidos por algumas fêmeas e CTPs de maior capacidade proliferativa, a quantidade de cultivos por fêmea foi variável (Tabela 4). Ainda assim, 44% das fêmeas neste estudo produziram CTPs que foram analisadas.

Após a extração, a quantidade de DNA recuperado das CTPs variou entre 1-4 µg. Apesar da baixa concentração, o protocolo utilizado permitiu amplificação e sequenciamento de todos os genes. Os produtos de PCR geraram uma única banda que foi submetida ao sequenciamento.

5.3. VALIDAÇÃO DE HOMOZIGOSE

5.3.1. Primeira Abordagem: Genotipagem de SNPs

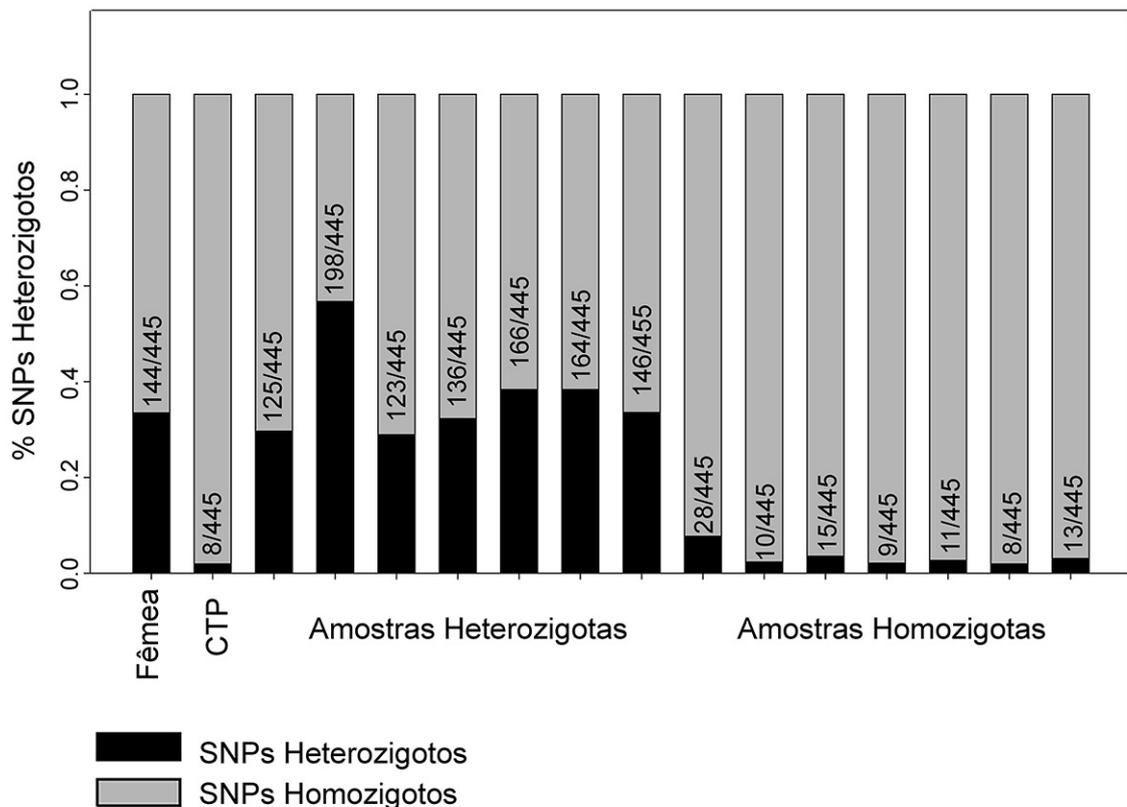
Durante os experimentos pilotos deste trabalho foram produzidas 15 CTPs. Estas foram genotipadas para 445 SNPs distribuídos ao longo de *BoLA*, dessa forma, esperávamos observar diferenças entre possíveis amostras homozigotas e heterozigotas avaliando toda a região de *BoLA*. Para esta análise, foi incluído o DNA de uma fêmea que derivou uma destas CTPs.

A análise do genoma da fêmea revelou que esta era heterozigota para 144/445 SNPs analisados (Figura 10) e para o gene *DRB3*. Porém uma de suas CTPs era heterozigota para apenas 8/445 SNPs (Figura 10), e apresentava um único alelo para o gene *DRB3*. Após análise das demais CTPs, foi possível observar que os embriões se agruparam em dois grupos distintos: um com alta contagem de SNPs heterozigotos (>120 SNPs), que também eram heterozigotos para o gene *DRB3*; e outro com baixa contagem de SNPs heterozigotos (<30 SNPs) e homozigotos para *DRB3* ($P < 0,001$), permitindo assim a descrição de seus haplótipos de *BoLA* (Figura 10). Além disso, o número de ausência de genotipagem (quando o equipamento não consegue observar leitura de um genótipo para um dado SNP) entre as amostras também foi diferente entre amostras homozigotas e heterozigotas, sendo mais elevadas nas primeiras ($P < 0,05$).

Uma análise mais profunda de todas as amostras permitiu observar o perfil dos SNPs das amostras (Apêndice C), e assim localizar os pontos no genoma que são homozigotos, heterozigotos e com ausência de genotipagem dentro de *BoLA*. A Figura 11 possibilita visualizar os genótipos da fêmea e CTP, bem como demais amostras heterozigotas e homozigotas, para cada ponto analisado. Nesta, é possível novamente perceber o perfil homozigoto da CTP em comparação com o perfil heterozigoto da fêmea bovina. Duas amostras tiveram elevada quantidade de erros durante a genotipagem, possivelmente devido à baixa qualidade do DNA extraído.

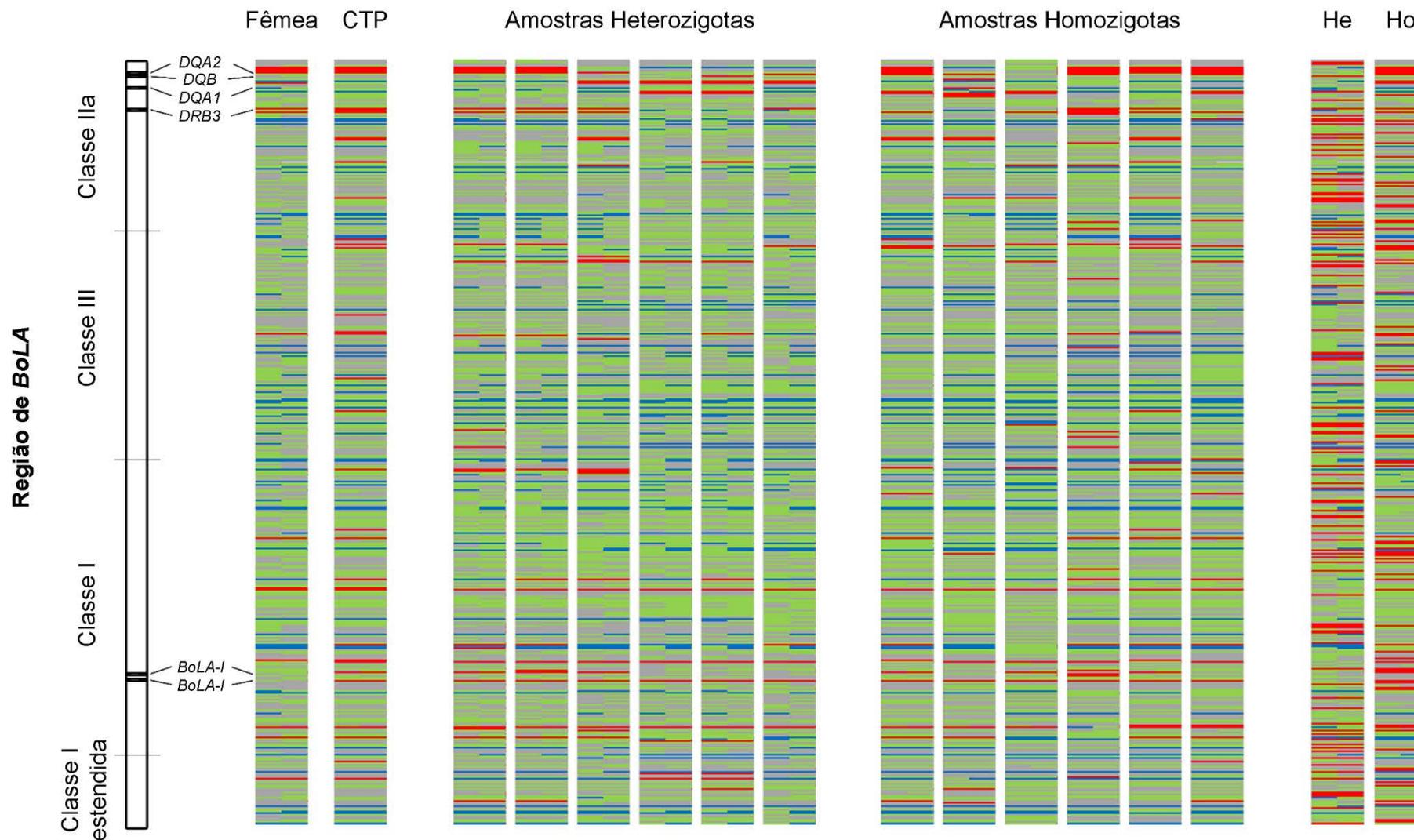
Levando em consideração os SNPs da fêmea e sua CTP, percebe-se que 92,13% dos pontos analisados eram compatíveis, onde a CTP apresentava pelo menos um dos alelos da fêmea (Tabela 6). Os demais foram divididos entre pontos não compatíveis, quando a ausência de genotipagem afetava apenas uma das duas amostras para aquele SNP, e ausência de genotipagem compartilhada, quando ambas as amostras apresentavam erros na mesma posição. No geral, não houve incompatibilidade causada por CTP apresentando alelos que não estavam presentes na fêmea. Estes resultados estão resumidos na Tabela 6. Apesar disso, é possível perceber que a genotipagem provavelmente apresentou algumas falhas, como por exemplo pontos em que a fêmea era homocigota e a sua CTP heterocigota (Tabela 7), apesar de que em baixa frequência. O padrão de correspondências de SNPs heterocigotos, homocigotos e ausência de genotipagem entre fêmea e sua CTP estão resumidos na Tabela 7.

Figura 10 – Perfil de SNPs de *BoLA* de uma fêmea bovina e 15 linhagens de células trofoblásticas partenogênicas (CTPs).



O gráfico apresenta a proporção de SNPs heterocigotos, incluindo dentro de cada barra o número absoluto de SNPs heterocigotos para cada amostra. A primeira amostra de DNA é proveniente de uma fêmea bovina e a segunda amostra é uma de suas CTPs.

Figura 11 — Genótipos de SNPs de *BoLA* em células trofoblásticas partenogênicas (CTP) e uma fêmea bovina.



Em cada coluna é possível observar o genótipo completo de cada amostra para 445 SNPs avaliados, sendo o primeiro par de amostras a fêmea e a CTP derivada de seu embrião partenogênético; as demais CTPs de outras fêmeas. As cores denotam o genótipo para aquela posição, sendo

o nucleotídeo A representado em verde, T em rosa, C em azul, G em cinza e ausência de genotipagem em vermelho. É possível perceber que as amostras homocigotas e a CTP da fêmea apresentam a maioria dos seus SNPs idênticos em cada posição (portanto, apenas uma cor), enquanto as heterocigotas e a fêmea tem maior quantidade de pontos heterocigotos (cores diferentes). Note também que a ausência de genotipagem muitas vezes ocorre na mesma posição em diferentes amostras, com maior incidência nas regiões de Classe IIa e I, com certa correspondência com as posições onde ocorrem genes de *BoLA*. À esquerda, representação da localização de cada Classe de *BoLA* na genotipagem, incluindo genes de *BoLA* Classe II (*DRB3*, *DQA1*, *DQA2* e *DQB*) e genes clássicos de Classe I (representados genericamente como "*BoLA-I*"). À direita uma amostra heterocigota (He) e homocigota (Ho) com grande incidência de ausência de genotipagem, possivelmente devido à baixa qualidade do DNA.

Tabela 6 — Porcentagem de genótipos de SNPs compatíveis entre fêmea bovina e sua célula trofoblástica partenogenética (CTP) em cada Classe de *BoLA*.

Compatibilidade	Classe de <i>BoLA</i>					
	Fêmea-CTP	Ila	III	I	I-ex	<i>BoLA</i>
Sim¹		87,76%	93,98%	92,44%	95,24%	92,13%
Não²		6,12%	5,26%	4,07%	2,38%	4,72%
AGC³		6,12%	0,75%	3,49%	2,38%	3,15%
Total		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

¹Sim, compatibilidade entre os alelos da CTP com pelo menos um alelo da fêmea para um dado SNP;

²Não, ausência de genotipagem em apenas uma das duas amostras para um dado SNP;

³AGC, ausência de genotipagem compartilhada, afetando fêmea e CTP para o mesmo SNP.

Tabela 7 — Correspondência de genótipos de 445 SNPs entre fêmea bovina e sua célula trofoblástica partenogenética (CTP) em *BoLA*.

		SNPs da Fêmea			Total
		Heterozigoto	Homozigoto	AG ¹	
SNPs da CTP	Heterozigoto	6	2	0	8
	Homozigoto	135	267	1	403
	AG ¹	3	17	14	34
	Total	144	286	15	445

¹Ausência de genotipagem.

5.3.2. Segunda Abordagem: Comparação de alelos *DRB3*

A segunda abordagem para confirmação da homozigose se baseou na comparação entre os alelos de *DRB3* entre CTPs e a fêmea que os originou. Se uma fêmea for heterozigota e sua CTPs for homozigota, isso confirma a homozigose da amostra e permite assim a descrição de haplótipos de *BoLA*. Neste estudo, todas as fêmeas avaliadas eram heterozigotas. Apesar disso, foi possível observar a produção de CTPs homozigotas para *DRB3*, portanto, validando esta abordagem.

Do total de 41 CTPs extraídas, 15 (36,5%) amostras foram consideradas homozigotas, enquanto 26 (63,4%) eram heterozigotas para *DRB3*. Estas 15 amostras representavam material genético de 13 fêmeas distintas. A eficiência desta abordagem para descrição de haplótipos de *BoLA* de fêmeas bovinas está resumida na Tabela 8. É possível perceber cerca de 22% das fêmeas utilizadas neste estudo tiveram seus haplótipos analisados.

Tabela 8 – Resumo da eficiência de utilizar-se de células trofoblásticas partenogenéticas (CTPs) para obtenção de material genético homocigoto de fêmeas bovinas heterocigotas para descrição de haplótipos de *BoLA*.

Fêmeas	Total	Com Oócitos	Com CTPs Plaqueadas	Com CTPs Extraídas	Com CTPs Homocigotas
N	60	56	40	22	13
	100,00%	93,33%	66,67%	36,67%	21,67%
%¹		100,00%	71,43%	39,29%	23,21%
			100,00%	55,00%	32,50%
				100,00%	59,09%

¹ Porcentagem do total de fêmeas utilizadas em cada etapa.

5.4. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS E NOVOS ALELOS

A partir das duas abordagens empregadas neste estudo (sendo um total de 23 amostras, das quais 8 CTPs homocigotas foram provenientes da 1ª abordagem e 15 CTPs homocigotas da 2ª abordagem), foi possível descrever 10 haplótipos diferentes de *BoLA* Classe IIa *DRB3-DQA-DQB*, dentre eles, oito ainda não descritos na literatura (Tabela 9). Estavam presentes dois novos alelos do gene *DQA* [*DQA*0207* (número de acesso KM245153) e *DQA*0208* (KM245154)] e um novo alelo do gene *DQB* [*DQB*18042* (KM245155)]. Suas sequências já foram submetidas ao banco de dados especializado de *BoLA* (IPD-MHC *BoLA* Database, disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>), onde foi confirmado que as mesmas se tratam de novos alelos, sendo sua adição ao banco de dados programada para ocorrer na próxima atualização do website (Shirley Ellis, comunicação pessoal). A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos dos novos alelos encontram-se nas Figura 12 a 14.

Os haplótipos 1103A, 3001A, 3501A (que contêm o novo alelo *DQA*0208*) e 3601A estavam presentes em duas amostras de origens diferentes. Possivelmente estes haplótipos podem estar em alta frequência na população estudada. Não foi possível descrever os haplótipos completos de outras nove amostras homocigotas (Tabela 8). Isto se deve ao fato do sequenciamento dos genes *DQA* e/ou *DQB* apontarem múltiplos alelos. Não obstante, os haplótipos parciais destas amostras estão detalhados na Tabela 10. Baseado nos alelos de Classe IIa, é possível inferir que se tratam de novos haplótipos. Os haplótipos listados (Tabela 9 e Tabela 10) são representativos de 21 fêmeas distintas (oito destas provenientes da primeira abordagem e 13 da segunda). Duas fêmeas tiveram seus dois haplótipos descritos, a

partir da análise de duas CTPs distintas (cada uma possuindo um dos haplótipos) derivadas de seus ovários, sendo os pares de haplótipos 2201A/4802A e 2201B/3101A compondo seus genótipos de *BoLA* Classe IIa.

Tabela 9 — Haplótipos de *BoLA* Classe IIa *DRB3-DQA-DQB* em células trofoblásticas de embriões partenogénéticos homozigotas.

N de CTPs	Designação do Haplótipo ¹				
	Autores	Oficial	<i>DRB3</i>	<i>DQA</i>	<i>DQB</i>
1	0201A	DH07A	*0201	*0203	*0201
1	03021A		*03021	*0207	*18042
1	0902A		*0902	*0207	*1803
2	1103A		*1103	*0203	*3602
1	1703A		*1703	*1401	*2301
1	2801A		*2801	*0103	*0402
2	3001A		*3001	*0202	*0402
2	3501A		*3501	*0208	*2201
2	3601A		*3601	*1301	*1802
1	4802A		*4802	*0103	*2501

¹Os haplótipos são definidos por Miyasaka et al. (2012). Novos haplotipos e alelos estão em negrito.

Tabela 10 — Haplótipos parciais de *BoLA* Classe IIa *DRB3-DQA-DQB* em células trofoblásticas de embriões partenogénéticos homozigotas.

N de CTPs	Novos Haplótipos ¹	<i>DRB3</i>	<i>DQA</i>	<i>DQB</i>
1	0101B	*0101	*0801	
1	1703B	*1703	*1401	
1	1801B	*1801		*0302
1	2201A	*2201		*2501
2	2201B	*2201		
1	2801B	*2801		
1	3101A	*3101	*0803	
1	5702A	*5702		

¹Os haplótipos definidos por Miyasaka et al. (2012).

Figura 12 — Sequência de nucleotídeos do éxon 2 de alelos *BoLA-DQA*, incluindo novos alelos (em negrito).

	10		15		20		25		30		35																
<i>BoLA-DQA*0208</i>	GC	GCC	TAT	GGC	ATA	AAC	GTC	TAC	CAC	TCA	TAT	GGT	TCC	TCT	GGC	TAC	TAT	ACC	CAT	GAA	TTT	GAT	GGA	GAT	GAA	GAG	TTC
<i>BoLA-DQA*0207</i>	A..	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0201</i>	.T	CG.	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0202</i>	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0203</i>	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0204</i>	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0205</i>	.T	A..	C..
<i>BoLA-DQA*0206</i>	A..	C..
				40				45				50					55					60					
<i>BoLA-DQA*0208</i>	TAC	GTG	GAC	CTG	GAA	AAG	AGG	GAG	ACT	GTC	TGG	AAT	CTG	CCT	CTG	TTT	AGT	AAA	TTT	AGA	CGT	TTT	GAC	CCT	CAG	GGT	GCG
<i>BoLA-DQA*0207</i>
<i>BoLA-DQA*0201</i>
<i>BoLA-DQA*0202</i>
<i>BoLA-DQA*0203</i>
<i>BoLA-DQA*0204</i>
<i>BoLA-DQA*0205</i>
<i>BoLA-DQA*0206</i>
		65					70					75				80						85					
<i>BoLA-DQA*0208</i>	CTG	AGA	AAC	ATA	GCT	ACA	GCG	AAG	CAC	AAT	TTG	GAG	ATT	ATG	ATT	CAA	GAG	TCC	AAC	TCT	ACT	GCT	G				
<i>BoLA-DQA*0207</i>	AG.
<i>BoLA-DQA*0201</i>	AG.
<i>BoLA-DQA*0202</i>	AG.
<i>BoLA-DQA*0203</i>	AG.
<i>BoLA-DQA*0204</i>	AG.
<i>BoLA-DQA*0205</i>	AG.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>BoLA-DQA*0206</i>	AG.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Pontos representam nucleotídeos idênticos aos da primeira sequência. Número de acesso no GenBank para os alelos de *BoLA-DQA* encontrados em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>. Número de acesso para os novos alelos são KM245153 (*DQA*0207*) e KM245154 (*DQA*0208*).

Figura 13 — Sequência de nucleotídeos do éxon 2 de alelos *BoLA-DQB*, incluindo novo alelo (em negrito).

		10		15		20		25		30		35																						
BoLA-DQB*18042	G	TAC	CAG	TTT	AAG	TGC	CTG	TGT	TAC	TTC	ACC	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	TAC	GTG	ACC	AGA	TAC	ATC	TAC	AAC	CAG	GAG	GAG	TAC	GTG			
<i>BoLA-DQB*1804</i>	-		
<i>BoLA-DQB*1801</i>	-	CT.	G..	AGTA.		
<i>BoLA-DQB*1802</i>	-	GT.	G..	C..		
<i>BoLA-DQB*1803</i>	-	-T.	G..		
<i>BoLA-DQB*1805</i>	-	CT.	G..	AGTA.		
<i>BoLA-DQB*1806</i>	-	G..	
<i>BoLA-DQB*1807</i>	.	GT.	G..	
<i>BoLA-DQB*1808</i>	.	GT.	G..
<i>BoLA-DQB*1809</i>	-	CT.	G..
		40		45		50		55		60		65																						
BoLA-DQB*18042	CGG	TTC	GAC	AGC	GAC	TGG	GAC	TTG	TAC	CGG	GCG	CTG	ACC	CCG	CTG	GGG	CGG	CCG	GAC	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	ATC	CTG				
<i>BoLA-DQB*1804</i>	
<i>BoLA-DQB*1801</i>	GA.C.	
<i>BoLA-DQB*1802</i>
<i>BoLA-DQB*1803</i>
<i>BoLA-DQB*1805</i>	GA.
<i>BoLA-DQB*1806</i>	GA.C.	...	CT.
<i>BoLA-DQB*1807</i>	C..
<i>BoLA-DQB*1808</i>	T..	
<i>BoLA-DQB*1809</i>	GA.C.	
		70		75		80		85		90																								
BoLA-DQB*18042	GAG	CAG	ACG	CGG	GCC	GAG	GCG	GAC	ACG	GTG	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	CAG	GCG	GAG	CTC	ATC	ACA	T												
<i>BoLA-DQB*1804</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1801</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1802</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1803</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1805</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1806</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1807</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1808</i>	-												
<i>BoLA-DQB*1809</i>	-												

Pontos representam nucleotídeos idênticos aos da primeira sequência. Número de acesso no GenBank para os alelos de *BoLA-DQB* encontrados em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>. Número de acesso para o novo alelo é KM245155 (*DQB*18042*).

Figura 14 — Sequência de aminoácidos de alelos de éxon 2 de *BoLA-DQA* (A) e *-DQB* (B), incluindo novos alelos (em negrito).

A

	10	20	30	40	50	60	70	80	
	X X	X X X	XX	X	X XXX	X	X X XX	X X	
<i>BoLA-DQA*0208</i>	A	YGINVYHSYG	SSGYTHEFD	GDEEFYVDLE	KRETVWNLPL	FSKFRRFDPO	GALRNIATAK	HNLEIMIQUES	NSTA
<i>BoLA-DQA*0207</i>I..T..	P.....V..R.	
<i>BoLA-DQA*0201</i>	RT..	P.....V.V..R.	
<i>BoLA-DQA*0202</i>T..	P...F....V.V..R.	
<i>BoLA-DQA*0203</i>T..	P.....V.V..R.	
<i>BoLA-DQA*0204</i>T..	P.....V..R.	
<i>BoLA-DQA*0205</i>T..	P.....VL..R- ----	
<i>BoLA-DQA*0206</i>T..	P.....V..R- ----	

B

	10	20	30	40	50	60	70	80	
	X X X	X X X	XX	X	X	X X X	X X X X	X X XX XX X	
<i>BoLA-DQB*18042</i>	YQ	FKCLCYFTNG	TERVRYVTRY	IYNQEEYVRF	DSDWDLYRAL	TPLGRPDAEY	WNSQKDILEQ	TRAEADTVCR	HNYQAELI
<i>BoLA-DQB*1804</i>	
<i>BoLA-DQB*1801</i>	L.	..G.....	..S.N..E....	..A....	
<i>BoLA-DQB*1802</i>	V.	..G.....	..H....	
<i>BoLA-DQB*1803</i>	-.	..G.....	
<i>BoLA-DQB*1805</i>	L.	..G.....	..S.N..E....	
<i>BoLA-DQB*1806</i>G.....E....	..A..L	
<i>BoLA-DQB*1807</i>	V.	..G.....L...	
<i>BoLA-DQB*1808</i>	V.	..G.....F...	
<i>BoLA-DQB*1809</i>	L.	..G.....E....	..A....	

Pontos representam aminoácidos idênticos aos da primeira sequência. X = Sequências de ligação aos peptídeos, segundo Brown et al. (1993) e Fremont et al. (1998). Número de acesso no GenBank para os alelos de *BoLA-DQA* e *-DQB* encontrados em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>. Número de acesso para os novos alelos são KM245153 (*DQA*0207*), KM245154 (*DQA*0208*) e KM245155 (*DQB*18042*).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, células trofoblásticas partenogénicas (CTPs) bovinas foram utilizadas como fonte de DNA homocigoto em *BoLA*, permitindo a descrição de haplótipos de Classe IIa em animais heterocigotos. Esta abordagem é inédita na descrição de haplótipos de MHC bovino. Para tal, foi utilizado método de ativação para obtenção de embriões partenogénicos diploides. Como alternativa para aumento da quantidade de DNA, um protocolo para expansão de células do trofoblasto, denominadas células trofoblásticas partenogénicas (CTPs) foi desenvolvido e avaliado quanto ao seu potencial de gerar linhagens homocigotas em *BoLA*, para descrição de haplótipos de Classe IIa.

De fato, gametas e embriões partenogénicos já haviam sido utilizados no estudo do MHC, apesar de não objetivarem a descrição de haplótipos. Oócitos secundários, corpúsculos polares e espermatozóides foram empregados na investigação da recombinação (e, portanto, desequilíbrio de ligação) entre *BoLA* Classe IIa e IIb em bovinos (JARREL et al., 1995; PARK; FRANK; LEWIN, 1999). A utilização de células homocigotas haploides também já foi amplamente explorada, a partir da produção de células-tronco embrionária partenogénicas, usado majoritariamente para a análise de características genéticas recessivas (KOKUBU; TAKEDA, 2014)

No entanto, Revazova et al. (2008) usaram células-tronco embrionárias partenogénicas humanas para produzir linhagens homocigotas em *HLA*, pelo potencial de utilizá-las em terapia celular. Todavia, o protocolo de isolamento e cultivo de células-tronco embrionárias requer um sistema caro e complexo, além de difícil acesso para a maioria dos laboratórios e espécies. A utilização de células-tronco embrionárias só está bem estabelecida para humanos e camundongos, enquanto que relatos em bovinos e outras espécies domésticas são escassos, recentes e de difícil reprodução (EZASHI; TELUGU; ROBERTS, 2012; KOH & PIEDRAHITA, 2014), dificultando sua aplicação para descrever haplótipos para estas espécies. Não obstante, o estudo destes autores permitiu o estabelecimento de quatro linhagens homocigotas de doadores homocigotos e heterocigotos para *HLA*, usando um método de ativação que produz embriões haploides. A utilização de embriões haploides permitiria a descrição de haplótipos de *BoLA*, porém esta abordagem não foi utilizada

aqui devido a limitação de crescimento que estes apresentam (KAUFMAN & GARDNER, 1974, LAGUTINA et al., 2004). Apesar de optar por embriões de maior capacidade de desenvolvimento e não utilizar cultivo de células-tronco embrionárias, a expansão das células trofoblásticas produzidas foi necessária para permitir a avaliação do seu potencial para o estudo de *BoLA*. Assim, foi desenvolvido um protocolo para expansão das células do trofoblasto dos embriões partenogênicos.

6.1. PRODUÇÃO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS PARTENOGENÉTICAS

Levando-se em consideração a quantidade total de oócitos utilizados, apenas 8% destes geraram CTPs capazes de expansão *in vitro* para análise. Esta baixa eficiência deve ser analisada com cautela, tendo que se levar em consideração o desenho experimental utilizado. Esta pode ser explicada devido à utilização de todos os CCOs de cada fêmea selecionada, sem seleção para qualidade morfológica. A grande maioria dos oócitos usados eram de grau II e III, grupos morfológicos historicamente relacionados com baixa capacidade de desenvolvimento *in vitro* (KHURANA & NIEMANN, 2000).

Isto foi feito para assegurar maiores chances de que o haplótipo das fêmeas fosse estudado, enquanto mantivesse segurança de que não haveria contaminação de material biológico, sendo passo necessário para a validação desta metodologia. Apesar de a correlação entre morfologia oocitária e capacidade de desenvolvimento estar em debate (RUVOLO et al., 2013), uma seleção de oócitos por este ou outros parâmetros provavelmente elevaria a quantidade de CTPs viáveis.

A própria eficiência de expansão de CTPs foi de 36,28% do total de embriões eclodidos plaqueados. Esta taxa possivelmente poderia ser elevada por melhoria da qualidade embrionária, sendo afetada tanto pela seleção de oócitos quanto pelo cultivo embrionário. Para evitar qualquer possível contaminação com células diploides, não foi utilizado cocultivo com células da granulosa, comumente empregado para dar suporte a embriões cultivados em alta tensão de oxigênio (GOOVAERTS et al., 2009). Apesar disso, a recuperação de blastocistos eclodidos sem a contaminação com células da granulosa é relativamente fácil de ser feita. Alternativamente, cocultivo com células de outras espécies também pode ser empregada, já que a utilização de primers específicos para a espécie bovina impediria a amplificação de possíveis

células contaminantes provenientes do cocultivo. Entretanto, se o aperfeiçoamento do sistema de cultivo, seja pelo emprego de cocultivo ou com suplementações diversas, afeta a proliferação das CTPs, por melhoria na qualidade embrionária, ainda precisa ser elucidado.

Nesse âmbito, a eclosão de blastocistos é usada como parâmetro qualitativo da produção *in vitro* de embriões (SAKAGAMI et al., 2015), pois esta é uma etapa importante para a implantação do mesmo na parede uterina. Portanto, espera-se que embriões que eclodam mais tardiamente sejam de menor qualidade que aqueles que eclodem mais cedo. Porém, não houve diferença na proliferação de CTPs entre embriões plaqueados em D8, D9 e D10+. Dentro do desenho experimental deste trabalho, outros fatores podem estar afetando o desenvolvimento das CTPs, com destaque ao efeito da fêmea: idade e categoria (TAKEO et al., 2013; VIEIRA et al., 2014), score corporal (DOMÍNGUEZ, 1995), estágio do ciclo estral (ACAR et al., 2013; DIAS et al., 2013); composição do líquido folicular (IWATA et al., 2006), entre outros. Infelizmente tal fato não pode ser averiguado já que não houve repetições de cada fêmea. A utilização de cada embrião como repetição de cada fêmea para elucidar esta questão também é inviável, visto que o número de embriões produzidos por fêmea é muito variado, diminuindo o poder estatístico.

6.2. VALIDAÇÃO DE HOMOZIGOSE

Sem a validação de homozigose, não seria possível saber se uma amostra é homozigota por possuir apenas um alelo *DRB3* ou heterozigota, possuindo dois haplótipos que compartilham o mesmo alelo. Da mesma forma, validar pela homozigose nos três loci estudados aqui excluiria parte dos haplótipos de *BoLA*, caso este apresentasse duplicação de loci (*DQA/DQB*). Para acurácia dos resultados é necessária alguma forma de se conhecer o perfil genético das amostras.

Entre estas, é possível utilizar-se da comparação do DNA da CTP com a fêmea que a originou, utilizar SNPs para investigar o perfil de *BoLA* ou outros marcadores neutros, como microssatélites dentro de *BoLA*, cujos ensaios já foram utilizados em outras pesquisas (CREIGHTON et al., 1992; ELLEGREN; DAVIES; ANDERSSON, 1993; FRITZ, 2009). Neste trabalho, foram investigadas duas dessas abordagens: o perfil de SNPs de *BoLA* e a comparação entre fêmea e CTP.

6.2.1. Genotipagem de SNPs

Os perfis de SNPs de 15 amostras CTPs e uma fêmea bovina foram informativos acerca do comportamento genômico frente a recombinação que acontece durante a Meiose, para produção de células haploides. Comparando-se uma fêmea heterozigota com uma de suas CTPs, foi possível perceber que a amostra derivada de seu oócito apresentava baixa quantidade de SNPs heterozigotos, comparado ao genótipo parental. Para excluir a possibilidade de que a CTP não tenha sido derivada desta fêmea, seus alelos para cada SNPs foram comparados, bem como sua sequência de *DRB3*. Como esperado, mais de 90% dos SNPs eram compatíveis e no geral não houve incompatibilidade genotípica de alelos de SNPs ou de *DRB3*.

A partir do comportamento observado para este par, foi possível inferir que amostras com baixa quantidade de SNPs heterozigotos são de fato homozigotas em *BoLA* (sendo confirmado pela presença de um único alelo *DRB3*). A baixa quantidade de SNPs heterozigotos nas amostras homozigotas podem ser reflexo de falhas na leitura do genótipo. A incidência de mutações, duplicações, deleções e conversão alélica/gênica dentro do MHC (TROWSDALE & KNIGHT, 2013) também poderiam explicar a ocorrência de SNPs heterozigotos e ausência de genotipagem nas amostras. Além disso, alguns pontos de ocorrência de ausência de genotipagem podem estar relacionadas a falha do ensaio em amplificar SNPs dos rebanhos utilizados, visto que o ensaio foi desenvolvido para populações taurinas nos EUA.

Alternativamente, a qualidade do DNA poderia em tese causar falhas na genotipagem, porém a incidência destes até na amostra da fêmea bovina, proveniente de biópsia de tecido, não corrobora este fato, pelo menos para todas as posições. Em contraponto, duas amostras (uma CTP homozigota e uma heterozigota) apresentavam maior quantidade de ausência de genotipagem que as demais, podendo ser reflexo da baixa qualidade do material genético contido nestas amostras. A aparente maior incidência de ausência de genotipagem nas regiões de Classe I e IIa parecem indicar um significado biológico para a ocorrência de ausência de genotipagem em alguns pontos do genoma analisados, sendo discutido posteriormente. Não obstante, Novos testes são necessários para elucidar este quadro.

6.2.2. Comparação de alelos *DRB3*

A segunda abordagem para validação da metodologia foi a comparação de alelos *DRB3* entre fêmea e sua CTP. Para excluir a possibilidade de erros na descrição de haplótipos (fêmea heterozigota possuindo dois haplótipos que compartilhem mesmo alelo *DRB3*), apenas fêmeas heterozigotas para este locus foram utilizadas. Portanto, se uma CTP fosse homozigota para *DRB3* vindo de uma fêmea heterozigota, confirmaria a homozigose da CTP e permitiria a descrição de haplótipos. De qualquer forma, nenhuma das fêmeas analisadas era homozigota para *DRB3*.

Apenas 36% das CTPs extraídas eram homozigotas para *DRB3*, portanto, mais de 60% destas haviam sofrido recombinação *upstream* a este locus. Devido ao pequeno número amostral, não é possível tirar conclusões definitivas acerca da porcentagem de CTPs homozigotas. Se somarmos a quantidade de CTPs homozigotas das duas abordagens utilizadas para validação da metodologia, é possível perceber que a eficiência se aproxima de 41% de homozigose.

As amostras homozigotas da segunda abordagem representavam material genético de 13 fêmeas distintas, portanto resultando na capacidade de descrever haplótipos de 21,67% das fêmeas utilizadas neste trabalho. Como discutido anteriormente, esta eficiência é reflexo do desenho experimental utilizado, que contou com a seleção de oócitos sem parâmetros de qualidade e ativação de todos, independentemente de extrusão do 1º CP (indicador da maturação nuclear).

Apesar dessa etapa ser comumente empregada na ativação partenogenética, neste trabalho ela não foi feita devido a dois principais fatores. O primeiro diz respeito à logística do trabalho experimental. De cada matadouro, foram ativados oócitos de até 20 fêmeas bovinas. Todas as etapas desde punção, rastreio, maturação, desnudamento, ativação e cultivo foram feitas isoladamente para cada, de modo a evitar contaminação de amostras. Portanto, demandava muito tempo de manipulação, que poderia ser ampliado pela seleção do 1º CP e prejudicar a capacidade destes oócitos de produzirem embriões viáveis devido ao estresse ambiental (PALASZ et al., 2008; ZHANG et al., 2010; AGARWAL; DURAIRAJANAYAGAM; DU PLESSIS, 2014). Em última análise, para evitar a possível redução da quantidade e qualidade das CTPs produzidas, esta etapa não foi realizada. O segundo fator diz respeito às

características dos oócitos utilizados. Já que todos os oócitos de cada fêmea foram recuperados, a maioria destes era de má qualidade morfológica, portanto muitos apresentavam o citoplasma heterogêneo, o que dificultava a observação da extrusão do CP. Uma seleção de CP poderia excluir uma quantidade de oócitos possivelmente viáveis, reduzindo a capacidade de descrição de haplótipos deste trabalho. Novos testes com diferentes desenhos experimentais poderiam elevar a porcentagem de fêmeas analisadas, já que a metodologia está validada.

6.3. DESCRIÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE *BoLA*

A utilização de CTPs permitiu a identificação dos haplótipos de 13 fêmeas do total de 60 (21,67%). Esta eficiência é elevada se levar em consideração que se tratavam de fêmeas heterozigotas, sem parentesco ou informações de pedigree, onde naturalmente apenas as homozigotas poderiam ser analisadas. A porcentagem de animais homozigotos em populações bovinas é de $9,2 \pm 5,9\%$ (mediana 8,7%, máximo 20,5% e mínimo 0%), levando em consideração estudos com sequenciamento dos alelos *DRB3* (na sua totalidade taurina, incluindo um estudo com gado de origem mista; TAKESHIMA et al., 2003; UNTALAN; PRUETT; STEELMAN, 2007; BALLINGALL et al., 2011; MIYASAKA et al., 2011; MIYASAKA et al., 2012; GIOVAMBATISTA et al., 2013). Em rebanhos zebuínos as informações são escassas, mas devido a um pobre histórico de manipulação genética e reprodutiva, é possivelmente ainda menor.

Em populações nos EUA, num total de 23 mil bovinos, foram selecionados apenas 600 indivíduos (2,6%) com alta possibilidade de serem homozigotos baseado em informações de pedigree (L. C. Skow, Texas A&M University - EUA, comunicação pessoal). Portanto, a metodologia utilizada aqui é pelo menos 2-10 vezes mais eficiente na descrição segura de haplótipos de *BoLA*, com o diferencial de potencialmente descrever o haplótipos de qualquer fêmea. O estudo de Miyasaka et al. (2012), que fez o maior apanhado de haplótipos de *BoLA* Classe IIa em bovinos até o presente momento, reuniu informações de haplótipos de 164 indivíduos de duas raças taurinas japonesas. Porém, foi necessário a informação de linhagem e genotipagem de 650 indivíduos, resultando numa eficiência de 25,2% de animais com haplótipos descritos, próxima da descrita neste trabalho.

Em humanos, é comumente utilizada a análise em softwares para inferência de fase de genótipos e haplótipos de MHC, por análises estatísticas, partindo ou não de expectativas *a priori* das frequências esperadas para as populações (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; ADAMS et al., 2004; ABBOTT et al., 2006; BETTENCOURT et al., 2008; BONTADINI, 2012). Os softwares que se baseiam em informações *a priori* são aplicáveis em humanos devido ao grande volume de informações reunidas de diversas populações e grupos étnicos. Apesar disso, esta análise gera ambiguidade nos resultados e erros, por não poder afirmar com certeza os alelos e haplótipos de cada indivíduo, principalmente em populações multirraciais (ADAMS et al., 2004; BETTENCOURT et al., 2008; JUN et al., 2014). A metodologia descrita neste trabalho não apresenta este viés, podendo melhorar os estudos populacionais e de associação com doenças.

Cerca de 44,4% (8/18) das amostras homozigotas não tiveram seu haplótipo completo de Classe IIa descrito por problemas no sequenciamento do gene *DQA* ou *DQB*. Isto se deve a provável ocorrência a múltiplos *loci* de *DQA/DQB*. Em torno de 48,2% (27/56) dos haplótipos de *BoLA* descritos apresentam alguma duplicação de *DQA* ou *DQB* (MIYASAKA et al., 2012), portanto este fato não era inesperado. Além disso, alguns haplótipos descritos por estes autores apresentavam ausência de amplificação de *DQA* e/ou *DQB*. Não obstante, todos os alelos *DQA* identificados no presente estudo correspondem a alelos de *DQA1* (Miyasaka et al., 2012), evidenciando a limitação do ensaio utilizado aqui para detecção dos demais *loci*.

Já que foi validada a homozigose da amostra, uma inferência de fase poderia suprir a necessidade de genotipagem dos alelos para cada locus. Porém, devido a grandes diferenças apresentadas no éxon 2 entre diferentes linhagens de *DQA/DQB*, especialmente na extremidade 5', é necessária a utilização de clonagem ou primers mais específicos, como os usados por Miyasaka et al. (2012). Infelizmente, no presente trabalho não foi possível a utilização dessas alternativas, ficando a descrição completas destes haplótipos para futuras investigações.

Da mesma forma, isso impediu que se descrevesse o segundo haplótipo de cada fêmea analisada. Assim, a utilização das alternativas descritas acima não só permitiria a definição de haplótipos com duplicação em *DQA* e *DQB*, mas também a definição de ambos haplótipos de uma fêmea a partir da análise de apenas uma CTP homozigota, desde que a fêmea tivesse tido seus alelos sequenciados.

6.4. LIMITAÇÕES DA METODOLOGIA

Dentre as principais limitações da metodologia descrita neste trabalho é possível destacar: necessidade de biotecnologias reprodutivas aliadas à biologia molecular; os custos elevados; e a descrição de haplótipos apenas de fêmeas.

A metodologia desenvolvida neste trabalho utilizou técnicas avançadas em biotecnologias reprodutivas (produção *in vitro* de embriões e ativação partenogênética) e ferramentas de biologia molecular (extração de DNA, PCR, sequenciamento, genotipagem de SNPs e softwares de bioinformática). Portanto, requer o trabalho de pessoas qualificadas em ambas metodologias ou parceria entre instituição/laboratórios com domínio em cada uma. Este fato teoricamente poderia limitar o emprego desta metodologia em outros lugares do Brasil ou do mundo. Porém, em bovinos essa não é uma realidade distante, visto o grande interesse e investimento em pesquisas genéticas que tem sido feito para esta espécie, em parte devido ao seu apelo comercial (ELLIS; HAMMOND, 2004). O emprego de biologia molecular no estudo produtivo e evolutivo é histórico, onde a fronteira reside na aplicação de estudos de associação genômica ampla na investigação do impacto da diversidade genômica nos caracteres de importância produtiva.

A própria utilização de biotecnologias reprodutivas já está bastante disseminada nesta espécie, principalmente no Brasil, que desponta na produção *in vitro* de embriões (IETS, 2012). Laboratórios de biotecnologia reprodutiva, tanto de pesquisa quanto comerciais, são instalações abundantes tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, onde as técnicas empregadas neste trabalho já são amplamente dominadas e reproduzidas no resto do planeta. Apesar da disseminação de recursos humanos com treinamento em biologia molecular e reprodutiva em bovinos, outro aspecto que pode limitar a aplicação de CTPs no estudo de *BoLA* são os custos elevados. Não só em termos de material de consumo e permanente necessários para a implementação, mas também o elevado período de cultivo (em torno de 3-4 semanas) e o próprio esforço laboral demandado pela produção e manutenção das células *in vitro*.

Este é resultado principalmente da necessidade de assegurar que o material genético da fêmea e de suas CTPs não seria contaminado por células provenientes de outras fêmeas. Esse fato dificultou otimizações de reagentes e tempo de trabalho.

Apesar disso, se comparar ao esforço e gastos demandados para descrição de haplótipos em animais heterozigotos, os custos podem ser comparáveis. Se levar em consideração a possível aplicação em qualquer rebanho, independentemente de linhagem familiar conhecida, e a redução na ambiguidade dos resultados, é possível enxergar a metodologia desenvolvida aqui como uma alternativa viável ao estudo de *BoLA*.

Por fim, uma limitação difícil de se contornar é a possibilidade de descrever haplótipos apenas de fêmeas. Para aplicar esta abordagem em machos seria necessária a produção de embriões androgenéticos (a contraparte masculina de embriões partenogéticos, ou seja, aqueles derivados apenas com genoma paterno; LAGUTINA et al., 2003), que requer a enucleação de oócitos e fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmáticas de espermatozóide. Assim, apesar de possível, torna-se pouco prática por demandar maiores investimentos técnicos. Portanto, machos bovinos, especialmente de rebanhos sem registros de reprodução, teriam poucas possibilidades de terem seus haplótipos descritos diretamente por esta metodologia. Não obstante, a identificação dos principais haplótipos do rebanho pelo estudo com as fêmeas, serviriam para inferir os haplótipos dos machos, seja pela diversidade alélica ou pela análise de herança de sua linhagem.

6.5. PERSPECTIVAS

Apesar das limitações apresentadas pela utilização de células CTPs para descrição de haplótipos de *BoLA* Classe IIa, algumas perspectivas são levantadas para ampliação do uso da metodologia ou sua otimização. A seguir serão discutidas com mais detalhes a possibilidade de: otimização da metodologia; descrição de haplótipos de *BoLA* Classe I; outros estudos genéticos no gado bovino; e ampliação dos estudos no gado paraense. Importante salientar que estas proposições requerem novos testes para sua validação, o que estava fora do escopo deste trabalho. Não obstante, são possíveis desdobramentos e linhas de pesquisas a serem investigadas no futuro.

6.5.1. Otimização da Metodologia

Como apontado anteriormente, a validação da homozigose é uma etapa necessária à descrição acurada de haplótipos. Apesar da comparação dos alelos de *DRB3* entre amostras CTPs e respectivas fêmeas ser um método prático para esse fim, em contrapartida aumenta os custos e esforço experimental na medida em que todos os processos devem ser feitos isoladamente para cada fêmea. Em comparação, a validação através da genotipagem de SNPs em *BoLA* permite validar a homozigose de amostras provenientes de oócitos mistos, sem precisar conhecer o genoma da fêmea, embora exija maior aporte tecnológico e eleve os custos da validação em si.

Uma abordagem mais barata seria a utilização de um menor número de marcadores em *BoLA* que permitisse uma segura definição da homozigose das CTPs. Dentre os principais candidatos estão os marcadores de microssatélites. De qualquer forma, o desenvolvimento de ensaios robustos é necessário para utilizar esse tipo de marcador. Apesar de alguns já terem sido descritos na literatura (CREIGHTON et al., 1992; ELLEGREN; DAVIES; ANDERSSON, 1993; FRITZ, 2009), é necessário validar o polimorfismo destes na população para que seja possível utilizá-los.

Outra possibilidade seria utilizar um menor número de SNPs informativos. Neste trabalho, quatro posições de SNPs foram consistentemente heterozigotas nas CTPs classificadas como tal, e homozigotas nas demais, sendo um na Classe IIa, um na Classe III e dois na Classe I (posições 26322003, 27076887, 27418216, 28820469, respectivamente; Quadro 2). Os alelos para os SNPs nessas posições apresentavam alta frequência, além de não ocorrer pontos de ausência de genotipagem, potencialmente representando uma região com pouca variação estrutural, mas com alta frequência de heterozigose na população avaliada. A presença de apenas um alelo *DRB3* e para mais quatro marcadores espalhados em *BoLA* poderia ser o suficiente para confirmar a homozigose da amostra e reduzir sensivelmente (ou anular) a descrição de haplótipos falsos. Naturalmente, apesar de serem pontos promissores, uma população amostral maior seria necessária para assegurar a validade desses SNPs para descrição de haplótipos de *BoLA* do gado regional.

A eficiência da expansão de CTPs para extração foi próxima a 40%. Melhorias no protocolo de cultivo, particularmente maior investimento em fatores de crescimento, poderiam aumentar esta taxa. Porém, a perda de 60% dos embriões plaqueados

poderia ser evitada ao se empregar técnicas de extração e amplificação mais sensíveis, evitando a necessidade de cultivo e expansão de CTPs. Esforços estão sendo feitos para permitir a extração e sequenciamento de apenas uma célula (LIANG; CAI; SUN, 2014), e já é possível acesso a protocolos com cada vez maior sensibilidade.

Já estão descritas metodologias para extração de DNA e RNA de um único embrião em estágio de pré-implantacional. Huffman, Almamun e Rivera (2012) descrevem o sequenciamento e análise de bissulfito de embriões isolados. Teoricamente, a utilização dos embriões partenogênicos ao invés de ter que expandir suas CTPs duplicaria a capacidade de descrição de haplótipos descrita no presente estudo. Porém, a utilização de embriões bovinos individuais para sequenciamento de genes altamente polimórficos, como os do MHC, ainda precisa ser avaliada. Apesar disso, apresenta boas perspectivas, já que a tipagem de *HLA* já é feita rotineiramente em embriões humanos pré-implantacionais (KAKOUREOU et al., 2014). É importante notar que o desenvolvimento dessa metodologia combinada à utilização de embriões haploides permitiria o estudo de haplótipos de MHC sem realizar validação de homozigose. Perspectivas mais otimistas podem revelar o potencial de utilizar os próprios gametas (oócitos secundários e espermatozóides) para descrição de haplótipos.

6.5.2. Descrição de Haplótipos de *BoLA* Classe I

Devido à baixa quantidade de recombinações acontecendo dentro de *BoLA* (FRITZ, 2009; corroborado pelos resultados apresentados aqui), também seria possível descrever haplótipos de englobando genes de Classe I. Enquanto humanos apresentam três genes clássicos em cada haplótipo para esta região, os bovinos têm alta variação estrutural e funcional, apresentando seis loci clássicos descritos, com haplótipos apresentando de um a três genes expressos (ELLIS; HAMMOND, 2014). A própria combinação entre estes genes não parece ser estocástica, formando 13 tipos estruturais distintos identificados atualmente (CODNER et al., 2012). A descrição desses tipos estruturais dependeu da análise de haplótipos de animais homozigotos ou heterozigotos com análise da herança familiar (BIRCH et al., 2006) em conjunto com análises filogenéticas. Justamente devido a essas características, o estudo de

haplótipos de Classe I é difícil e poucos foram descritos, a maioria representativa de raças taurinas (CODNER et al., 2012).

Portanto, a utilização de CTPs poderia ajudar a expandir o número de haplótipos de Classe I estudados, bem como elucidar os processos evolutivos e funcionais que moldaram esta composição única. Porém, o estudo de genes de Classe I é feito utilizando tanto RNA quanto DNA, devido a um grande íntron que atravessa os dois éxons que codificam a região apresentadora de antígeno da molécula (Figura 1; BIRCH et al., 2006).

Apesar da expressão de RNA de Classe I ser ubíqua em células nucleadas (VAN DEN ELSEN, 2011), na maioria das espécies as células embrionárias/fetais apresentam baixos (ou até inexistentes) níveis de transcrição dos genes clássicos (e mais polimórficos), enquanto genes não clássicos podem ser mais expressos (DAVIES et al., 2006). Todavia, em bovinos foram descritas populações de células do trofoblasto que expressam genes clássicos e não clássicos de *BoLA*, durante o final da prenhez (BAINBRIDGE; SARGENT; ELLIS, 2001; DAVIES et al., 2006). De forma similar, é possível detectar a expressão de genes de Classe I em todos os estágios de desenvolvimento embrionário pré-implantacional, em baixos níveis (DOYLE et al., 2009).

Estes estudos indicam que as CTPs possivelmente expressam genes de Classe I e que sua utilização pode servir para descrição de haplótipos para esta região. Não obstante, seriam necessários novos estudos para investigar a expressão de genes de Classe I em CTPs, para assegurar que a composição do haplótipo de Classe I não seja enviesada pela falta de transcrição de algum dos possíveis seis loci presentes no genoma celular, já que poucos estudos funcionais foram feitos entre as diferenças de expressão de cada locus.

6.5.3. Outros Estudos Genéticos do Gado Bovino

Uma análise dos pontos onde a ausência de genotipagem acontece parece indicar a presença de *hotspots* para sua ocorrência (Quadro 2), particularmente na região de Classe IIa. Esse padrão é compatível com a ocorrência de CNVs (*Copy Number Variation* – variação no número de cópias) dentro de *BoLA*. Estas são

definidas como variações estruturais de sequências genômicas interespecíficas maiores de 50 pares de bases (LIU; BICKHARD, 2012).

A ocorrência de CNVs tem sido relacionada a regiões ricas em genes e pontos de duplicação segmental, que podem promover recombinações homólogas não-alélicas, considerado um mecanismo importante de geração de CNVs (STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010). Portanto, não seria incomum encontrar tais variações dentro do MHC bovino já que esta região apresenta estas duas características, onde a ocorrência de CNVs já foi descrita nesta espécie e em outras (LIU; BICKHARD, 2012). Interessante notar que a presença dessas variações normalmente inibe a recombinação, mecanismo que pode ajudar a manter o desequilíbrio de ligação dentro do MHC, apesar de a inibição de conversão gênica e recombinações homólogas não-alélicas serem menos pronunciadas (LINDSAY et al., 2006; WELZ-VOEGELE; JINKS-ROBERTSON, 2008; TROWSDALE; KNIGHT, 2013).

Em bovinos, para descrição de CNVs foram utilizadas diversas abordagens a partir da análise de SNPs (LIU; BICKHARD, 2012), incluindo métodos para estimar a perda de heterozigose (CICCONARDI et al., 2013). Este processo é necessário em um gado heterozigoto, porém desnecessário em amostras homozigotas. Portanto, a utilização de células homozigotas, como as descritas aqui ou por outras abordagens, pode facilitar a descrição de CNVs, na medida em que aumentaria a descoberta de deleções mesmo de pequenas regiões do genoma. Tais eventos são importantes na associação com doenças (WU et al., 2013), inclusive para CNVs dentro do MHC (YANG et al., 2012).

Na região de Classe IIa é possível notar um bloco de ausência de genotipagem, atravessando cinco SNPs, em nove das 16 amostras genotipadas no presente estudo (entre os SNPs chr23:25349535-25361041 na build UMD 3.1 e chr23:26187964-26199461 na build BTA 4.0; Quadro 2). Da mesma forma, a maior quantidade de incompatibilidade de genótipo por ausência de genotipagem em apenas uma amostra ou compartilhada entre fêmea e CTP ocorre na Classe IIa (Tabela 6). Esse bloco inclui o gene *DQA2* e está próxima ao gene *DQB*. Outros pontos de ocorrência de ausência de genotipagem em Classe IIa se aproximam de *DQA1*, *DRB3* e genes clássicos de Classe I.

Se a ausência de genotipagem fosse aleatória, por exemplo devido a problemas técnicos com a leitura pelo equipamento ou qualidade de DNA, era

esperado que estes estivessem em proporção igual entre amostras homozigotas e heterozigotas. Porém, observou-se maior acúmulo de ausência de genotipagem em amostras homozigotas ($P < 0,05$). Este cenário é compatível com a ocorrência de CNVs em *BoLA*, visto que amostras heterozigotas mascarariam parte das CNVs pela presença de dois haplótipos. Nesses casos, nos pontos onde um dos haplótipos apresenta variação estrutural em relação ao outro, estas exibiriam um genótipo homozigoto (referente ao único SNP presente para aquela posição).

Corroborando esta hipótese, a comparação entre fêmea e sua CTP, contidas na Tabela 7, foi informativa, revelando que 93% da ausência de genotipagem na fêmea corresponde a ausência na CTP. Isto é esperado se a ausência de genotipagem tiver significado biológico, ou seja, representar pontos onde ambos os haplótipos da amostra heterozigota não apresentam o SNP, portanto ausentes também na sua CTP. Em contrapartida, 50% da ausência de genotipagem ocorridas na CTP correspondem a pontos que são homozigotos na fêmea, corroborando a noção de que parte dos pontos homozigotos na fêmea são devido a ausência de amplificação em um dos haplótipos.

Portanto, a variação no número de cópias de *DQA* parece se relacionar com o grande bloco de ausência de genotipagem observado na Classe IIa, possivelmente representando um ponto de CNV. Este está presente em aproximadamente metade das amostras, incluindo a fêmea e sua CTP. Já que o ensaio de genotipagem utilizado foi desenvolvido para populações taurinas dos Estados Unidos, esta possível variação pode ser frequente em haplótipos zebuínos ou representar a variação do número de loci *DQA*, já que, mesmo em taurinos, haplótipos com tal duplicação são comuns.

Apesar de a utilização de CTPs no estudo de CNVs ser um campo interessante de investigação, a identificação de CNVs ou variação estrutural do gado zebuíno utilizado está fora do escopo deste trabalho. É necessário ressaltar que o ensaio utilizado foi desenvolvido em rebanhos taurinos dos EUA, e, portanto, a ausência de amplificação pode ser devido a presença de SNPs distintos nas amostras avaliadas aqui, sendo necessário novas etapas de validação para assegurar a ocorrência de CNVs. Não obstante, otimização dos protocolos descritos aqui poderiam ser necessários, principalmente maior expansão de células CTPs para recuperação de maior quantidade de DNA, particularmente para sequenciamento de nova geração.

Não foge à atenção que a genotipagem de SNPs em todo o genoma de CTPs

poderia revelar *hotspots* de recombinação em bovinos. Diversas abordagens têm sido propostas para o estudo da recombinação meiótica dentre as quais poucas são capazes de gerar mapas de recombinação individualizados, apontando apenas médias populacionais (MYERS et al., 2005; BAUDAUT; IMAI; MASSY, 2013). A genotipagem de espermatozoides figura como abordagem promissora para revelar pontos de recombinação de cada indivíduo analisado, permitindo avaliação de milhares de eventos de recombinação (BAUDAUT; IMAI; MASSY, 2013). Em fêmeas, a disponibilidade de gametas para tal investigação é mais restrita. Porém, a utilização de CTPs diploides pode ser alternativa para avaliação em fêmeas, visto que existem evidências de que a recombinação meiótica exhibe padrões diferenciados de acordo com o sexo (POPA et al., 2012).

A utilização de softwares que estimam a perda de heterozigose (comumente usada para estimar a ocorrência deleções/CNVs em populações humanas ou células de câncer; THIAGALINGAM et al., 2001) poderiam ser adaptados para revelar os pontos de recombinação, já que estes estariam associados com a transição do genoma homozigoto para o heterozigoto. Neste caso, refinamentos devem ser propostos para diferenciação entre pontos de recombinação tipo crossover/não crossover e CNVs. A utilização de CTPs para avaliação da recombinação meiótica em bovinos requer novos estudos, podendo dar informações acerca desses eventos pouco estudados nesta espécie.

6.5.4. Ampliação dos Estudos no Gado Paraense

Na sua maioria, os haplótipos descritos de *BoLA* são de raças taurinas (LEWIN; RUSSEL; GLASS, 1999; GLASS; OLIVER; RUSSEL, 2000; NORIMINE. BROWN, 2000; PARK et al., 2004; MIYASAKA et al., 2012). Portanto, os novos haplótipos e alelos relatados no presente estudo podem ser representativos de raças zebuínas. O estudo de *BoLA* em raças zebuínas ainda é restrito. Com base na revisão de literatura feita neste trabalho a partir da análise de relatos com o gene *DRB3* (locus mais estudado de *BoLA*), em torno de 20% destes enfocam raças zebuínas, sendo cerca de metade na raça Gir e o resto distribuído em raças restritas e locais (Apêndice D). Trabalhos publicados com gado brasileiro são mais escassos ainda, com apenas

cinco relatos (MIRETTI et al., 2001; DA MOTA et al., 2002; MACHADO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2006).

Estes enfocaram a raça Gir ou animais híbridos de Gir-Holstein. Já as amostras analisadas no presente trabalho são principalmente derivadas de animais da raça Nelore. O único trabalho, até onde se sabe, estudando diversidade de *BoLA* em Nelores foi feito utilizando análise RFLP de *DRB3*, portanto de baixa resolução para identificação de novos alelos (MIRETTI et al., 2001). A partir do padrão de enzima de restrição pros alelos *DRB3* (IPD-MHC *BoLA* Database, disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>) das amostras CTPs, é possível inferir a presença de 15 alelos RFLP nas 21 fêmeas avaliadas aqui. Miretti et al. (2001) relata a presença de 15 alelos RFLP em 29 fêmeas, portanto a diversidade entre estes dois estudos é similar, apesar de apenas cinco alelos serem compartilhados pelos dois estudos. Isso é devido provavelmente ao baixo número amostral de ambos os estudos e a diferentes populações utilizadas, já que o gado estudado por Miretti et al. (2001) era de Corumbá, MS.

Em conjunto com os demais trabalhos, é possível perceber a escassez de estudos enfocando *BoLA* no rebanho brasileiro, principalmente frente a grande importância que a pecuária bovina tem para o país. A presença de alelos nas amostras CTPs que encontram-se em baixa frequência nos demais gados brasileiros podem indicar uma composição gênica única nos rebanhos locais (os estudos com rebanho brasileiro estão relatados no Apêndice D). Este fato também é corroborado pela presença de alelos *DRB3* com baixa frequência em outros rebanhos sequenciados no planeta (*DRB3*03021*, **1103*, **1703*, **3101*, **3501*, **4802* e **5702*). Indo além, 88% dos haplótipos avaliados aqui são inéditos, apesar do pequeno número amostral, evidenciando a escassez de estudos de *BoLA* em animais paraenses. A presença de novos alelos, sendo que um destes presente em dois haplótipos distintos, demonstra que este fato não deve ser encarado como relato de variantes raras em populações bovinas, e sim de alelos/haplótipos presentes em populações pouco estudadas. Frente a essa lacuna nas investigações enfocando *BoLA*, a aplicação da metodologia descrita aqui pode ajudar a expansão dos estudos de rebanhos brasileiros.

Entre os alelos descritos aqui, alguns já foram correlacionados com enfermidades e características produtivas em bovinos. O alelo *DRB3*0101* está associado com a susceptibilidade à mastite causados por *Escherichia coli* e

Staphylococci coagulase negativa em Holstein (YOSHIDA et al., 2009). Há relato de associação do alelo *DRB3*0201* à resistência febre aftosa (GOWANE et al., 2013). Neste mesmo estudo, também foi relatada susceptibilidade associada ao alelo *DRB3*1801*. Já o alelo *DRB3*0902* está consistentemente associado a resistência a infecção pelo vírus da leucemia bovina (JULIARENA et al., 2008; JULIARENA et al., 2009; MIYASAKA et al., 2013). Portanto, o rebanho paraense apresenta alelos que já foram associados com características positivas e negativas à produção pecuária, podendo utilizar tais rebanhos para se confirmar a associação com tais enfermidades, além de possível seleção para rebanhos mais resistentes. A utilização do haplótipo composto por três genes de *BoLA* pode ajudar a elucidar a real relação de tais marcadores e a incidência de doenças nos rebanhos.

O rebanho paraense tem muito a se beneficiar com estudos genéticos. Aqui estão presentes animais com características de alto interesse para pecuária mundial e local, como a rusticidade, resistência aos carrapatos e termotolerância, características estas essenciais para a atividade nas regiões de clima tropical e subtropical. Porém, ainda são necessários estudos que busquem aliar a manutenção de tais características de interesse conjuntamente com boas características zootécnicas, como a fertilidade, produção de leite e ganho de peso. Assim, é possível utilizar estes animais que evoluíram na própria região, e portanto mais adaptados a ela, para aumentar a produtividade do rebanho amazônico, selecionando indivíduos resistentes às enfermidades que ocorrem aqui e com características adequadas ao abastecimento do mercado local, nacional e internacional.

A ampliação das pesquisas com o MHC bovino podem representar não só ganhos em sanidade e produção animal, mas também em aumento de eficiência da clonagem animal (transferência nuclear de célula somática). Entre as causas da baixa eficiência da clonagem tem-se as perdas durante a prenhez (ARNOLD et al., 2008; CHAVETTE-PALMER et al., 2012). Apesar de pouco estudado, há algumas linhas de evidências de que, pelo menos em parte, as perdas gestacionais podem estar relacionadas a rejeição imunológica do clone pela receptora, como: a expressão anômala de genes de Classe I bovino em embriões clones (PFISTER-GENSKOW et al., 2005) e em placenta de clones (HILL et al., 2002); e maior eficiência de nascimento de clones provenientes de linhagens homocigotas em MHC, em detrimento das heterocigotas (DAVIES et al., 2004). Importante notar que a Prometea, primeiro cavalo

clone, foi gestada pela própria fêmea clonada, levantando a questão se a compatibilidade completa entre feto e fêmea não poderia ser benéfica para o desenvolvimento de animais clonados (GALLI et al., 2003; GALLI et al., 2008). Apesar dessa questão ainda ser controversa (ELLIS, 2004; CHAVETTE-PALMER et al., 2007), este ainda é um campo onde há muito a avançar. Assim, o estudo de *BoLA* ainda figura como perspectiva para a investigação do efeito da seleção de receptoras compatíveis com as linhagens clonadas, de modo a evitar parte das perdas gestacionais observadas em clones.

Em resumo, este é possivelmente o primeiro trabalho a estudar a diversidade de *BoLA* em rebanhos bovinos do estado do Pará, além do primeiro trabalho brasileiro com haplótipos de *BoLA* Classe IIa, propondo uma nova metodologia para a avaliação destes. Parte dos resultados contidos aqui foram aceitos para publicação em revista científica especializada (Apêndice E). A metodologia proposta pode servir de alternativa para expansão de estudos enfocando o gado regional, visto que este parece ser reservatório de alelos e haplótipos únicos. Como discutido anteriormente, alguns aspectos técnicos podem ser otimizados para viabilizar sua aplicação e ampliação para outros estudos genéticos. Espécies onde as biotecnologias reprodutivas estejam bem estabelecidas podem se beneficiar desta metodologia, como camundongos, suínos, demais espécies domésticas e, em especial, bubalinos, pela sua importância no estado do Pará. Em última análise, a expansão de estudos com haplótipos de MHC podem ajudar a elucidar questões ainda debatidas acerca da evolução desta região, associação com doenças e com o desenvolvimento de vacinas.

7. CONCLUSÕES

- É possível obter amostras homocigotas em *BoLA* de fêmeas bovinas heterocigotas, a partir da produção de embriões partenogênicos e expansão de suas células trofoblásticas, aqui validado por duas abordagens distintas.
- A utilização de células trofoblásticas partenogênicas permitiu a descrição de 18 haplótipos de *BoLA* Classe IIa *DRB3-DQA-DQB* do rebanho bovino brasileiro, incluindo oito novos haplótipos e oito haplótipos parciais provavelmente novos.
- Três novos alelos de *BoLA* foram descritos, sendo dois alelos de *DQA* e um de *DQB*.
- O método descrito aqui é mais eficiente e flexível do que estudar haplótipos apenas de indivíduos homocigotos ou de animais com informação de pedigree.
- O método, apesar de inovador, ainda pode ser otimizado para aumentar sua eficácia na descrição de haplótipos de *BoLA*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.G.H. et al. Low-cost, simultaneous, single-sequence genotyping of the *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-C* loci. **Tissue Antigen**, v.68, p.28-37, 2006.
- ACAR, D.B. et al. Effect of the stage of estrous cycle on follicular population, oocyte yield and quality, and biochemical composition of serum and follicular fluid in Anatolian water buffalo. **Animal Reproduction Science**, v.137, p.8-14, 2013.
- ADAMS, S.D. et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. **Journal of Translational Medicine**, v.2, p.1-6, 2004.
- AGABA, M. et al. Polymorphism at the bovine tumor necrosis factor alpha locus and assignment to BTA 23. **Mammalian Genome**, v.7, p.186-187, 1996.
- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S.S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.1-19; 2014.
- ALENCAR, M.M.; FRAGA, A.B.; DA SILVA, A.M. Adaptação de genótipos a ambientes tropicais: Resistência à mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*, LINNAEUS) e ao carrapato (*Boophilus microplus*, CANESTRINI) em diferentes genótipos bovinos. **Agrociencia**, n.1-2, p. 579-585, 2005.
- ALEXANDER, B. et al. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cyclohexamide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. **Molecular Reproduction and Development**, n.73, p20-30, 2006.
- AMILLS, M. et al. The major histocompatibility complex of ruminants. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. epiz.**, n.17, p.108-120, 1998.
- ARNOLD, D.R. et al. Placental insufficiencies in cloned animals – A workshop report. **Placenta**, v.29, p.S108-S110, 2008.
- 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. et al. The DY genes of the cattle MHC: Expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. **Immunogenetics**, n.55, p.748-755, 2004.
- BALLINGALL, K.T. et al. 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.

BALTIAN, L.R. et al. Association between *BoLA-DRB3* and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.7212-7220, 2012.

BARRETO, P.; PEREIRA, R.; ARIMA, E. **A pecuária e o desmatamento na Amazônia na era das mudanças climáticas**. Belém, PA: Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia, 2008. 40p.

BASCHAL, E.E. et al. The frequent and conserved DR3-B8-A1 extended haplotype confers less diabetes risk than other DR3 haplotypes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, n.11, p.25-30, 2009.

BASIRICÒ, L. et al. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphism in Holstein lactating cows. **Cell Stress and Chaperones**, v.16, p.441-448, 2011.

BAUDAUT, F.; IMAI, Y.; MASSY, B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. **Nature Reviews Genetics**, v.14, p.795-806, 2013.

BAXTER, R. et al. *BoLA-DR* peptide binding pocket are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. **Vaccine**, v.28, p.28-37, 2010.

BEHL, J.D. et al. Characterization of genetic polymorphism of the *BoLA* lymphocyte antigen *DRB3.2* locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). **Journal of Dairy Science**, v.90, 2997-3001, 2007.

BEHL, J.D. et al. Genetic variation of the Major Histocompatibility Complex *DRB3.2* locus in the native *Bos indicus* cattle breeds. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.22, p.1487-1494, 2009.

BEHL, J.D. et al. The major histocompatibility complex in bovines: A review. **ISRN Veterinary Science**, 2012.

BETTENCOURT, B.F. et al. Evaluation of two methods for HLA haplotypes inference using a real dataset. **BMC Informatics**, v.9, p.1-11, 2008.

BIANCHIN, I. et al. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. **Tropical Animal Health**, n.39, p.287-296, 2007.

BIRCH, J. et al. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC class I region. **Immunogenetics**, n.58, p.670-679, 2006.

BJORKMAN, P.J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, n. 8, p.506-512, 1987.

BOJAROJC-NOSOWICZ, B. et al. Polymorphism in the promoter region of tumour necrosis factor-alpha gene in cattle herd naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.14, n.4, p.671-673, 2011.

- BOLECKOVA, J. et al. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. **Czech Journal of Animal Science**, v.57, n.2, p.45-53, 2012.
- BONTADINI, A. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. **Methods**, v.56, p.471-476, 2012.
- BONTROP, R.E. Comparative genetics of MHC polymorphisms in different primate species: duplications and deletions. **Human Immunology**, v.67, p.388-397, 2006.
- BORGHANS, J.A.M.; BELTMAN, J.B.; DE BOER, R.J. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. **Immunogenetics**, v.55, p.732-739, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. 188p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2009. 440p.
- BRINKMEYER-LANGFORD, C.L. et al. A high resolution RH map of the bovine major histocompatibility complex. **BMC Genomics**, v.10, n.182, 2009.
- BROWN, J.H. et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v.364, p.33-39, 1993.
- BUKHARI, S. et al. Prolactin gene polymorphism and its associations with milk production traits in Frieswal cow. **International Journal of Molecular Zoology**, v.3, n.3, p.10-13, 2013.
- BUSH, W.S.; MOORE, J.H. Chapter 11: Genome-wide association studies. **PLOS Computational Biology**, v.8, p.1-11, 2012.
- CHAVETTE-PALMER, P. et al. Placental expression of Major Histocompatibility Complex Class I in bovine somatic clones. **Cloning and Stem Cells**, v.9, p.346-356, 2007.
- CHAVETTE-PALMER, P. et al. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v.33, p.S99-S104, 2012.
- CHICZ, R.M. et al. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. **Nature**, n.27, p.764-768, 1992.
- CHILDERS, C.P. et al. Comparative analysis of the bovine MHC class IIb sequence identifies inversions breakpoints and three unexpected genes. **Animal Genetics**, n.37, p.121-129, 2006.

CICCONARDI, F. et al. Massive screening of copy number population-scale variation in *Bos taurus* genome. **BMC Genomics**, v.14, p.1-14, 2013.

CODNER, G. F. et al. Constraints on haplotype structure and variable gene frequencies suggest a functional hierarchy within cattle MHC class I. **Immunogenetics**, v.64, p.435-445, 2012.

CREIGHTON, P. et al. Mapping of bovine markers CYP21, PRL and *BoLA* DRBP1 by genetic linkage analysis in reference pedigrees. **Genomics**, v.14, p.526-528, 1992.

DA MOTA, A.F. et al. Distribution of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). **European Journal of Immunogenetics**, v.29, p.223-227, 2002.

DANCHIN, E.G.J. et al. Conservation of the MHC-like region throughout evolution. **Immunogenetics**, v.55, p.141-148, 2003.

DAS, D.N. et al. Genetic diversity and population genetic analysis of bovine MHC Class II *DRB3.2* locus in three *Bos indicus* cattle breeds of Southern India. **International Journal of Immunogenetics**, v.00, p.1-12, 2012.

DAVIES, C.J. et al. Major Histocompatibility antigens expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.267-280, 2004.

DAVIES, C.J. et al. Evidence for expression of both classical and non-classical Major Histocompatibility Complex class I genes in bovine trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.55, p.188-200, 2006.

DIAS, F.C.F. et al. Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. **Theriogenology**, v.79, p.1177-1183, 2013.

DIETZ, A.B. et al. Genetic association of bovine lymphocyte antigen *DRB3* alleles with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, n.2, p.400-405, 1997a.

DIETZ, A.B. et al. Bovine lymphocyte antigen Class II alleles as risk factor for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.406-412, 1997b.

DOMÍNGUEZ, M.M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v.43, p.1405-1418, 1995.

DOYLE, J. et al. Classical and non-classical Major Histocompatibility Complex class I gene expression in in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproductive Immunology**, v.82, p.48-56, 2008.

DUANGJINDA, M. et al. Detection of bovine leukocyte antigen *DRB3* alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. **Journal of Animal Sciences**, v.87, p.469-476, 2008.

DUANGJINDA, M. et al. Association of *BoLA-DRB3* alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.314-320, 2013.

ELLEGREN, H.; DAVIES, C.; ANDERSSON, L. Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the *BoLA-DRB3* gene: implications for microsatellite stability and PCR-based *DRB3* typing. **Animal Genetics**, v.24, p.269-275, 1993.

ELLIS, S. A. Immune status: Normal expression of MHC Class I in the placenta and what is expected in clones? **Cloning and Stem Cells**, v.6, p.121-125, 2004.

ELLIS, S. A.; HAMMOND, J.A. The functional significance of cattle Major Histocompatibility Complex Class I genetic diversity. **Annual Review of Animal Bioscience**, v.2, p.285-306, 2014.

EZASHI, T.; TELUGU, B.P.V.L.; ROBERTS, R.M. Induced pluripotent stem cells from pigs and other ungulate species: an alternative to embryonic stem cells? **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.92-97, 2012.

FAVATIER, F. et al. Variation in *hsp* gene expression and HSP polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? **Cell Stress & Chaperones**, n.2, p.141-155, 1997.

FERNANDÉZ, I.G. et al. Polymorphism of locus *DRB3.2* in populations of Creole cattle from Northern Mexico. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.880-886, 2008.

FLAJNIK, M.F.; KASAHARA, M. Comparative genomics of the MHC: Glimpses into the evolution of the adaptive immune system. **Immunity**, v. 15, p. 351-362, 2001.

FRAGA, A.B. et al. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.32, p1578-1586, 2003.

FREMONT D.H. et al. Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope lysozyme. **Immunity**, v.8, p305-317, 1998.

FRITZ, K.L. **Analysis of haplotype structure in the bovine major histocompatibility complex**. 299f. Tese (Doutorado em Genética), Texas A&M University, 2009.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.

GALLI, C. et al. Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v.424, p.635, 2003.

GALI, C et al. Somatic cell nuclear transfer in horses. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.331-337, 2008.

GARCÍA-BRIONES, M.M. et al. Association of bovine *DRB3* alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. **Vaccine**, n.19, p.1167-1171, 2001.

GELHAUS, A.; WIPPERN, C.; MEHLITZ, D.; HORSTMANN, R.D. Sequence polymorphism of *BoLA-DQA*. **Immunogenetics**, v.42, p.296-298, 1995.

GILLIESPIE, B.E. et al. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen *DRB3.2* alleles in Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2049-2053, 1999.

GIOVAMBATISTA, G. et al. Gene frequencies of *DRB3.2* locus of Argentine Creole cattle. **Animal Genetics**, v.27, p.55-56, 1996.

GIOVAMBATISTA, G. et al. Characterization of bovine MHC *DRB3* diversity in Latin American Creole cattle breeds. **Gene**, v.519, p.150-158, 2013.

GLASS, E.J.; OLIVER, R.A.; RUSSEL, G.C. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. **The Journal of Immunology**, v.165, p.134-138, 2000.

GOLDING, M.C. Generation of trophoblast stem cells. In: ENGEL, N. **Genomic Imprinting: Methods and Protocols**, p.49-59, 2012.

GOOVAERTS, I.G.F. et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, v. 71, p.729-738, 2009.

GORER, P.A. The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. **Journal of Genetics**, n.32, p17-31, 1936.

GOWANE, G.R. et al. Association of *BoLA DRB3* alleles with variability in immune response among the crossbred cattle vaccinated for foot-and-mouth disease (FMD). **Research in Veterinary Science**, v.95, p.156-163, 2013.

GUTIÉRREZ, G. et al. Vaccination against δ -Retroviruses: The bovine leukemia virus paradigm. **Viruses**, n.6, p.2416-2427, 2014.

HAMEED, K.G.A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. An association of *BoLA* alleles *DRB3.2*16* and *DRB3.2*23* with occurrence of *mastitis* caused by different bacterial species in two herds of dairy cows. **Animal Science Papers and Reports**, n.1, p.37-48, 2008.

HASHIZUME, K. et al. Bovine trophoblast cell culture systems: A technique to culture bovine trophoblast cells without feeder cells. In: SOARES, M.J.; HUNT, J.S. **Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols**, p.179-188, 2006.

HE, F. et al. Association between SNPs within prolactin gene and milk performance traits in Holstein dairy cattle. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v.19, n.10, p.1384-1389, 2006.

HERNANDÉZ, D. et al. Polimorfismos del gen *BoLA-DRB3.2** en ganado criollo colombiano. **Revista MVZ Córdoba**, v.18, p.3665-3671, 2013.

HILL, J.R. et al. Abnormal expression of trophoblast Major Histocompatibility Complex Class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, v.67, p.55-63, 2002.

HUGHES, A.L.; NEI, M. Evolution of the major histocompatibility complex: Independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. **Molecular Biology and Evolution**, n. 6, p.559-579, 1989.

HUFFMAN, S.R.; ALMAMUN, M.; RIVERA, R.M. Isolation of RNA and DNA from single preimplantation embryos and a small number of mammalian oocytes for imprinting studies. In: ENGEL, N. (org.). **Genomic Imprinting: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Springer, v.925, p.201-209, 2012.

HUGHES, A.L. Major histocompatibility complex (MHC) genes: Evolution. **Encyclopedia of life sciences**, John Wiley & Sons, 2008.

HUNT, D.F. et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. **Science**, n.6, p.1261-1263, 1992.

IBELLI, A.M.G. et al. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, n.25, p.425-430, 2011.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**, v. 39, p.1-63, 2011.

IETS. Internation Embryo Transfer Society. **Statistics and Data Retrieval Comitee Report**, 2012.

IPD-MHC. Immuno Polymorphism Database. **Cattle MHC (BoLA)**. Disponível em:< <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html>>. Acesso em: 04/02/2015.

IWATA, H. et al. Comparisons between the characteristics of the follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.215-223, 2006.

JACINTO, M.A.C. et al. **Influência dos defeitos na qualidade intrínseca de couros bovinos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. p.1-32. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento nº 31).

JANEWAY, C.A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença 6ª Edição**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 848p.

JARREL, V.L. et al. Gene-centromere mapping of bovine *DYA*, *DRB3*, and *PRL* using secondary oocytes and first polar bodies: Evidence for four-strand double crossovers between *DYA* and *DRB3*. **Genomics**, v. 27, p.33-39, 1995.

JEONG, H.J. et al. Characterization of *BoLA-DRB3.2* alleles in Hanwoo (Korean cattle) by sequence based typing (SBT). **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.20, p.1791-1797, 2007.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, n.137, p1-10, 2006.

JULIARENA, M.A. et al. Association of BLV infection profiles with alleles of the *BoLA-DRB3.2* gene. **Animal Genetics**, n.39, p.432-438, 2008.

JULIARENA, M.A. et al. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen *DRB3.2* alleles associated with bovine leukemia virus resistance. **Journal of Dairy Science**, n.92, p.375-381, 2009.

JUN, J.-H. et al. Estimation of 6-digit level allele and haplotype frequencies of *HLA-A*, *-B* and *-C* in Koreans using ambiguity-solving DNA typing. **Tissue Antigens**, v.84, p.277-284, 2014.

KAKOUROU, G. et al. A generic, flexible protocol for preimplantation human leukocyte antigen typing alone or in combination with monogenic disease, for rapid case work-up and application. **Hemoglobin**, v.38, p.49-55, 2015.

KAUFMAN, M.H. & GARDNER, R.L. Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following in vitro activation and embryo transfer. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.31, p.635-642, 1974.

KELLY, L. et al. Polimorfismos del gen *DRB3.2* en bovinos criollos del Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, v.52, p.77-80, 2003.

KELM, S.C. et al. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, n.8, p.1767-1775, 1997.

KHARCHE, S.D. & BIRADE, H.S. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review. **Advances in Biosciences and Biotechnology**, v.4, p.170-182, 2013.

KHURANA, N.K. & NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741-756, 2001.

KOH; S. & PIEDRAHITA, J.A. From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. **Theriogenology**, v. 81, p.103-111, 2014.

KOKUBU, C.; TAKEDA, J. When half is better than the whole: Advances in haploid embryonic stem cell technology. **Cell Stem Cells**, v.14, p.265-267, 2014.

KONNAI, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. **Microbes and Infections**, v.8, p.2163-2171, 2006.

KUBY, J. **Immunology**. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1997. 664p.

KULBERG, S. et al. Study on the association of *BoLA-DRB3.2* allele with clinical mastitis in Norwegian Red Cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, p.201-207, 2007.

LAGUTINA, I. et al. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: A comparative study. **Biology of Reproduction**, v.70, p.400-405, 2004.

LEE, B.-Y. et al. Identification of *BoLA-DRB3.2* alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using next generation sequencer. **Animal Genetics**, v.43, p.438-441, 2011.

LEITE, B.M. **Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras livres de brucelose e tuberculose bovina**. 88f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília, 2012.

LEWIN, H.A. et al. Association between *BoLA* and subclinical bovine leukemia virus infection in a herdo f Holstein-Friesian cows. **Immunogenetics**, n.27, p.338-344, 1988.

LEWIN, H.A.; RUSSEL, G.C.; GLASS, E.J. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domestic cattle. **Immunological Reviews**, v.167, p.145-158, 1999.

LIANG, J.; CAI, W.; SUN, Z. Single-cell sequencing technologies: Current and future. **Journal of Genetics and Genomics**, v.41, p.513-528, 2014.

LIE, O. et al. Possible association of antibody response to human serum albumin and (T,G)-A--L with the bovine major histocompatibility complex (*BoLA*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.11, p.333-350, 1986.

LIEN, B.A.; THORSBY, E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. **Current Opinion in Immunology**, n.17, p.526-231, 2005.

LINDSAY, S.J. et al. A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. **The American Journal of Human Genetics**, v.79, p.890-902, 2006.

LIU, G.E.; BICKHART, D.M. Copy number variation in the cattle genome. **Functional & Integrative Genomics**, v.12, p.609-624, 2012.

LOTFOLLAHZADEH, S. et al. Evaluation of presence of MHC Class II susceptible and resistant alleles to oncovirus in seropositive and seronegative Holstein-Frisian dairy cattle in Iran. **Austin Journal of Clinical Medicine**, v.1, p.1-3, 2014.

MACHADO, M.A. et al. Associação do loco *BoLA-DRB3.2* com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.380-389, 2005.

MAGALHÃES, H.R. et al. Perdas econômicas decorrentes da contagem de células somáticas. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, 2004, Pirassununga-SP. **Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004**. Disponível em: <http://sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos/>. Acesso em: 07/05/2015.

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

MAILLARD, J.C. et al. Selection assisted by *BoLA-DR/DQ* haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. **Genetics Selection Evolution**, nº35, s193-200, 2003.

MARÓTI-AGÓTS, Á. et al. Possible genetic sign of heat stress adaptation in hungarian Grey *Bos taurus* breed. **Acta Biologica Hungarica**, v.62, n.1, p.65-72, 2011.

MARTINEZ, R. et al. Caracterización del locus *BoLA-DRB3* em ganado criollo colombiano y asociación con resistência a enfermedades. **Archivos de Zootecnia**, n.54, p.349-356, 2005.

MARTINEZ, M.L. et al. Association of *BoLA-DRB3.2* alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.513-524, 2006.

MEHMANNAVAZ, Y. et al. Effects of bovine prolactin gene polymorphism within exon 4 on milk related traits and genetic trends in Iranian Holstein bulls. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.19, p.4797-4801, 2009.

MEJDELL, C.M. et al. Association of major histocompatibility complex antigens (*BoLA-A*) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian cattle. **Animal Genetics**, n.25, p.99-104, 1994.

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

MILTADOU, D.; LAW, A.S.; RUSSEL, G.C. Establishment of a sequence-based typing system for *BoLA-DRB3* exon 2. **Tissue Antigens**, n. 62, p.55-65, 2003.

MIRANDA, M.S. et al. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. **Cloning and Stem Cells**, n.4, p.565-573, 2009.

MIRETTI, M.M. et al. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in Exon 2 of the *BoLA-DRB3* gene in South American cattle. **Biochemical Genetics**, v.39, p.311-324, 2001.

MIYASAKA, T. et al. The diversity of bovine MHC class II *DRB3* and *DQA1* alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. **Gene**, v.472, p.42-49, 2011.

MIYASAKA, T. et al. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. **Journal of Dairy Sciences**, n.95, p.420-431, 2012.

MIYASAKA, T. et al. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variation in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. **Tissue Antigens**, v.81, p.72-82, 2013.

MOHAMMADI, A. et al. Distribution of *BoLA-DRB3* allele frequencies and identification of new alleles in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). **Russian Journal of Genetics**, v.45, p.198-202, 2009.

MOSAFER, J.; NASSIRY, M.R. Identification of bovine lymphocyte antigen *DRB3.2* alleles in Iranian Golpayegani cattle by DNA test. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.18, p.1691-1695, 2005.

MYERS, S. et al. A fine-scale map of recombination rate and hotspots across the human genome. **Science**, n.14, p.321-324, 2005.

NASCIMENTO, C.S. et al. Association of the bovine major histocompatibility complex (*BoLA*) *BoLA-DRB3* gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.641-647, 2006.

NASSIRY, M.R. et al. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) alleles in Iranian Holstein cattle. **Russian Journal of Genetics**, v.41, p.664-668, 2005.

NASSIRY, M.R. et al. The diversity of *BoLA-DRB3* gene in Iranian native cattle. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v. 21, p.465-470, 2008.

NEI, M.; HUGHES, A.L. Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In: SELANDER, R.; CLARK, A.; WHITTAM, T. **Evolution at the molecular level**. Sinauer associates, 1991.

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.

OKAMURA, K. et al. The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic MHC class I genes comparable to those of humans. **Immunity**, v. 7, p.777-790, 1997.

OPRZADEK, J. et al. Frequency of *BoLA-DRB3* alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v. 30, p.91-101, 2012.

PALASZ, A.T. et al. The effect of different zwitterionic buffers and PBS used for out-of-incubator procedures during standard *in vitro* embryo production on development, morphology and gene expression of bovine embryos. **Theriogenology**, v.70, p.1461-1470, 2008.

PAFFONI, A. et al. Parthenogenetic activation: Biology and applications in the ART laboratory. **Placenta**, v.29, p.S121-S125, 2008.

PANEI, C.J. et al. Association of *BoLA-DRB3* alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected cattle in Argentina. **International Journal of Dairy Science**, v.4, p.123-128, 2009.

PASHMI, M. et al. Polymorphism of bovine lymphocyte antigen *DRB3.2* alleles in Iranian native Sarabi cows. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.19, p.775-778, 2006.

PASHMI, M. et al. PCR based RFLP genotyping of Bovine Lymphocyte Antigen *DRB3.2* in Iranian Holstein population. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.10, p.383-387, 2007.

PASHMI, M. et al. Analysis of relationship between Bovine Lymphocyte Antigen *DRB3.2* alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.126, p.296-303, 2009.

PARK, C.; FRANK, M.T.; LEWIN, H.A. Fine-mapping of a region of variation in recombination rate on BTA23 to the D23S22-D23S23 interval using sperm typing and meiotic breakpoint analysis. **Genomics**, v.59, p.143-149, 1999.

PARK, Y.H. et al. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. **Journal of Veterinary Science**, n.1, p.29-39, 2004.

PFISTER-GENSKOW, M. et al. Identification of differentially expressed genes in individual bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: Improper reprogramming of genes required for development. **Biology of Reproduction**, v.72, p.546-555, 2005.

PIERTNEY, S.B.; OLIVER, M.K. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. **Heredity**, n. 97, p.7-21, 2006.

POPA, A. et al. The sex-specific impact of meiotic recombination on nucleotide composition. **Genome Biology and Evolution**, v.4, p.412-422, 2012.

QIDWAY, T.; KHAN, F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, n.74, p.522-547, 2011.

RADWAN, J.; BIEDRZYCKA, A.; BABIK, W. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? **Biological Conservation**, n.143, p.537-544, 2010.

RATISLAV, M.; MANGESH, B. *BoLA-DRB3* exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v.192, p.517-519, 2012.

REVAZOVA, E.S. et al. HLA Homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic embryos. **Cloning and Stem Cells**, v.10, p.11-24, 2008.

RIPOLLI, M.V. et al. Gene frequency distribution of the *BoLA-DRB3* locus in Saavedreño creole dairy cattle. **Biochemical Genetics**, v.42, p.231-240, 2004.

RUPP, R.; HERNANDÉZ, 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.

RUVOLO, G. et al. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.30, p.207-212, 2013.

RUZINA, M.N. et al. Polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene in the mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. **Russian Journal of Genetics**, v.46, p.456-463, 2010.

SADEGHI, B. et al. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen *DRB3.2* locus in Sistani cattle of Iran (*Bos indicus*). **Biotechnology**, v.7, p.333-337, 2008.

SAKAGAMI, N. et al. Relationships between oxygen consumption rate, viability, and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. **Theriogenology**, v.83, p.14-20, 2015.

SCHWAB, A.E. et al. 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.S. **Polimorfismo dos genes DRA, DRB, DQA e DQB – Complexo principal de histocompatibilidade de Classe II – em búfalo d'água (*Bubalus bubalis*)**. 2003. 162 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas com ênfase em Genética e Biologia Molecular) — Universidade Federal do Pará, 2003.

SENDER, G. et al. Association of *BoLA-DRB3* alleles with estimated breeding value for somatic cell count in Polish dairy cattle. **Archiv Tierzucht**, v.51, p.111-119, 2008.

SEPIL, I.; LACHISH, S.; SHELDON, B.C. MHC-linked survival and lifetime reproductive success in a wild population of great tits. **Molecular Ecology**, v.22, p.384-396, 2013.

SHARIF, S. et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex *DRB3* (*BoLA-DRB3*) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.185-193, 1998a.

SHARIF, S. et al. Associations of bovine Major Histocompatibility Complex *DRB3* (*BoLA-DRB3*) with production traits in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.30, p.157-160, 1998b.

SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; SARGEANT, J.M. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the *BoLA-DR* antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis cause by *Staphylococcus* species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, p.231-238, 2000.

SHU, L. et al. Non-classical major histocompatibility complex class make a crucial contribution to reproduction in the dairy cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, n.5, p.569-575, 2011

SIGURDARDÓTTIR, S.; BORSCH, C.; GUSTAFSSON, K.; ANDERSSON, L. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v.22, p.199-209, 1991.

SIGURDARDÓTTIR, S.; BORSCH, C.; GUSTAFSSON, K.; ANDERSSON, L. Gene duplications and sequence polymorphism of bovine class II *DQB* genes. **Immunogenetics**, v.35, p.205-213, 1992.

SIMÕES, T.V.M.D.; OLIVEIRA, A.A. **Mastite bovina, considerações e impactos econômicos**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. Disponível em:<
http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf>. Acesso em 04/02/2015.

SMITH, L.C.; SHIH, C.; DACHENHAUSEN, S.G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of Factor B, the second component in the Sea Urchin complement system. **The Journal of Immunology**, v.161, p.6784-6793, 1998.

SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of Genetics**, n.49, p87-108, 1948.

SNELL, G.D.; HIGGINS, G.F. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. **Genetics**, n.36, p306-310, 1951.

SOLBU, H.; SPOONER, R.; LIE, O. A possible influence of the bovine major histocompatibility complex (*BoLA*) on mastitis. In: _____ **Proceedings of the 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, n. 7, 368-371, 1982.

SOMPAYRAC, L. **How the immune system works**. 4 ed. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell, 2012.141p.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J.R. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annual Review of Medicine**, v.61, p.437-455, 2010.

STARKENBURG, R.J. et al. Frequencies and effects of alternative *DRB3.2* alleles of bovine lymphocyte antigen for Holstein in milk selection and control lines. **Journal of Dairy Science**, n.80, p.3411-3419, 1997.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetics**, v.68, p.978-989, 2001.

STEWART, C.A. et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. **Genome Research**, n.14, p.1176-1187, 2004.

SUAREZ, C.E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, n.180, p.109-125, 2011.

TAKEO, S. et al. Effect of maternal age on the ratio of cleavage and mitochondrial DNA copy number in early developmental stage bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, p.174-179, 2013.

TAKESHIMA, S. et al. Characterization of *DRB3* alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1630-1632, 2002.

TAKESHIMA, S. et al. The diversity of bovine MHC class II *DRB3* genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. **Gene**, v. 316, p.111-118, 2003.

TAKESHIMA, S. & AINDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v. 77, p.138-150, 2006.

TEORODO, R.L. et al. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, Pirassungua-SP. **Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2004. Disponível em: <http://sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos/>. Acesso em: 07/05/2015.

THIAGALINGAM, S. et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancer. **PNAS**, v.98, p.2698-2702, 2001.

TIWARI, J. et al. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: An overview. **Journal of Vaccines & Vaccination**, n.4, 2013.

TORBATI, F.M. et al. Frequency of bovine lymphocyte antigen *DRB3.2* alleles in Sarabi cows. **Iranian Journal of Biotechnology**, v.2, p.101-105, 2004.

TOSTES, R.A. Situação da leucose bovina no Brasil: Uma revisão. **Colloquium Agrariae**, nº 1, p. 42-50, 2005.

TRACHTULEC, Z.; FOREJT, J. Synteny of orthologous genes conserved in mammals, snake, fly, nematode, and fission yeast. **Mammalian Genome**, v.12, p.227-231, 2001.

TRAHERNE, J.A. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. **International Journal of Immunogenetics**, n.35, p.179-192, 2008.

TRINDADE, H.I.; ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C. Tristeza Parasitária Bovina — Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.16, p.1-21, 2011.

TROWSDALE, J.; KNIGHT, J.C. Major Histocompatibility Complex genomics and human diseases. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.14, p.301-323, 2013.

United Nations. **Report of the conference of the parties on its thirteenth session, held in Bali from 3 to 15 December 2007**. Framework Convention on Climate Change. 2007. Disponível em:<<http://unfccc.int/resource/docs/2007/cop13/eng/06a01.pdf>>. Acesso em 04/02/2015.

UNTALAN, P.M.; PRUETT, J.H.; STEELMAN, C.D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II *DRB3*4401* allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, n.145, p.190-195, 2007.

USDA (United States Department of Agriculture). **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Foreign Agricultural Service. 2014. Disponível em:<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em 04/02/2015.

USDA (United States Department of Agriculture). Livestock. **PSD: production, supply and distribution online**. Reports. 2013. Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em 04/02/2015.

VAN DEN ELSEN, P.J. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. **Frontiers in Immunology**, v.2, p.1-9, 2011.

VAN EIJK, M.J.T.; STEWART-HAYNES, J.A.; LEWIN, H.A. Extensive polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v.23, p.483-496, 1992.

VAN EIJK, M.J.T. et al. Genetic mapping of *BoLA-A*, *CYP21*, *DRB3*, *DYA*, and *PRL* on BTA23. **Mammalian Genome**, v.6, p.151-154, 1995.

VAN ROOD, J. et al. Human histocompatibility antigens in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res.**, n.28, p.1415-1422, 1968.

VANDEVOORT, C.A.; THIRKILL, T.L.; DOUGLAS, G.C. Blastocyst-derived trophoblast stem cells from the Rhesus monkey. **Stem Cells and Development**, n.16, p.779-788, 2007.

VIEIRA et al. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, v.82, p.204-212, 2014.

WANG, K.; SUN, D.; ZHANG, Y. Sequencing of 15 new *BoLA-DRB3* alleles. **International Journal of Immunogenetics**, v.35, p.331-332, 2008.

WELZ-VOEGELE, C.; JINKS-ROBERTSON, S. Sequence divergence impedes crossover more than noncrossover events during mitotic gap repair in yeast. **Genetics**, v.179, p.1251-1262, 2008.

WU, X.-X. et al. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the *BoLA-DRB3* gene in Chinese Holstein of the South China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v.3, p.221-225, 2010.

WU, C-C et al. Whole-genome detection of disease-associated deletions or excess of homozygosity in a case-control study of rheumatoid arthritis. **Human Molecular Genetics**, v.22, p.1249-1261, 2013.

YANG, H. et al. A genome-wide homozygosity association study identifies runs of homozygosity associated with rheumatoid arthritis in the human Major Histocompatibility Complex. **PLoS One**, v.7, p.1-10, 2012.

YANG, Y. et al. Three novel single-nucleotide polymorphisms of complement component 4 gene (C4A) in Chinese Holstein cattle and their associations with milk performance traits and CH50. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.145, p.223-232, 2012.

YOSHIDA, T. et al. Allelic frequency of PCR-RFLP type of the *BoLA-DRB3* in Japanese Holstein herds and the relation to mastitis. **Animal Science Journal**, v.79, p.409-416, 2008.

YOSHIDA, T. et al. 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.

YOSHIDA, T. et al. Association of *BoLA-DRB3* alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. **Animal Science Journal**, v.83, p.359-366, 2012.

ZAMBRANO, J.C.; EECHEVERRI, J.; LÓPEZ-HERRERA, A. Polimorfismo del gen *BoLA-DRB3.2* en vacas Holstein y BONxHolstein usando PCR-RFLP. **AICA**, v.1, p.173-176, 2011.

ZHANG, J.Q. et al. Reduction of exposure of human embryos outside of the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. **Reproductive Biomedicine Online**, v.20, p510-515, 2010.

ZHANG, M.; HE, H. Parasite-mediated selection of major histocompatibility complex variability in wild brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) from Inner Mongolia, China. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, p.1-14, 2013.

ZYNKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. **Nature**, v. 251, p. 547-548, 1974.

APÊNDICES

APÊNDICE A — Associação de *BoLA-DRB3* com aspectos produtivos em rebanhos bovinos.

Tabela 11 — Associação de alelos de *BoLA-DRB3* com aspectos produtivos do gado bovino.

Característica¹	Raça	Alelo²	Associação³	Técnica⁴
Reprodução				
Schwab et al. 2009	Holstein	*2703 *1001	Resistência a interrupção de prenhez Susceptibilidade a interrupção de prenhez	PCR-SBT PCR-SBT
Produção de Leite				
Duangjinda et al. 2008	Holstein x Zebu	*10	Maior produção	PCR-RFLP
Machado et al. 2005	Gir	*16, *29	Maior produção	PCR-RFLP
Sharif et al. 1998b	Holstein	*8, *22	Maior produção	PCR-RFLP
Starkenbourg et al. 1997	Holstein	*7	Maior produção	PCR-RFLP
		*26	Menor produção	
Rupp et al. 2007	Holstein	*11, *23 *8	Maior produção Menor produção	PCR-RFLP
Qualidade do leite				
Nascimento et al. 2006	Gir	*54	Redução no rendimento de gordura	PCR-RFLP
		*6, *54 *7	Redução no rendimento de proteínas Aumento no rendimento de proteínas	
Sharif et al. 1998b	Jersey	*10	Redução no rendimento de gordura	PCR-RFLP
		*8	Aumento no rendimento de proteínas e gordura	
Sharif et al. 1998b	Holstein	*22	Redução no rendimento de proteínas e gordura	PCR-RFLP
		*7	Aumento no rendimento de gordura	
Starkenbourg et al. 1997	Holstein	*26	Redução no rendimento de proteínas e gordura	PCR-RFLP
		*11	Aumento no rendimento de gordura	
Rupp et al. 2007	Holstein	*16	Redução no rendimento de proteínas	PCR-RFLP
		*23	Aumento no rendimento de proteínas	

Característica¹	Raça	Alelo²	Associação³	Técnica⁴
Qualidade do leite				
Pashmi et al. 2009	Holstein	*11, *22 *22, *24	Aumento no rendimento de gordura Aumento no rendimento de proteínas	PCR-RFLP
Contagem (SCC)/ Score (SCS) de Células Somáticas				
Baltian et al. 2012	Holstein	*23 *27	Diminuição do SCC Aumento do SCC	PCR-RFLP
Wu et al. 2010	Holstein	*3, *8, *18, *21, *22, *26	Diminuição do SCC	PCR-RFLP
Dietz et al. 1997b	Holstein	*16, *8, *23 *22	Aumento do SCC Diminuição do SCC	PCR-RFLP
Kelm et al. 1997	Holstein	*16	Aumento do SCS	PCR-RFLP
Sharif et al. 1998a	Holstein	*16	Diminuição do SCS	PCR-RFLP
Rupp et al. 2007	Holstein	*3, *11 *23	Diminuição do SCS Aumento do SCS	PCR-RFLP
Starkenbourg et al. 1997	Holstein	*3 *7, *24	Diminuição do SCS Aumento do SCS	PCR-RFLP
Pashmi et al. 2009	Holstein	*8	Aumento do SCC	PCR-RFLP
Sender et al. 2008	Holstein x Black Pied	*23	Aumento do SCC	MPT-PCR
Sender et al. 2008	Holstein	*16	Diminuição do SCC	MPT-PCR

¹Trabalhos que relatam associação de alelos RFLP utilizando apenas 1-2 enzimas foram omitidos;

²A nomenclatura utilizada para o alelo varia dependendo da técnica utilizada para determiná-los;

³A forma de quantificação da produção do animal e modelo estatístico variaram entre cada estudo;

⁴ PCR-SBT, polymerase chain reaction (PCR) using sequence based typing; PCR-RFLP, PCR using restriction fragment length polymorphism; MPT-PCR, multi-primer target PCR.

APÊNDICE B — Descrição dos SNPs utilizados no presente trabalho.

Quadro 1 — Descrição dos SNPs utilizados neste estudo. Os SNPs estão separados em cada Classe de BoLA, de acordo com as cores: Classe IIa (Amarelo); Classe III (Roxo); Classe I (Azul); Classe I estendida (I-ex, Laranja). A posição no ensaio GoldenGate é baseada no sequenciamento BTA 4.0, enquanto a posição no Illumina BovineHD 700K é baseada no sequenciamento UMD3.1.

Região de BoLA	Nome do SNP	Posição no Ensaio GoldenGate	Posição no chip Illumina BovineHD 770K
Classe IIa	BovineHD2300007030	26101031	25263573
Classe IIa	BovineHD2300007031	26105895	25268437
Classe IIa	BovineHD2300007034	26173497	25323186
Classe IIa	BovineHD2300007037	26180182	25329895
Classe IIa	BovineHD2300007048	26187964	25349535
Classe IIa	BovineHD2300007049	26189192	25350763
Classe IIa	BovineHD2300007050	26190248	25351819
Classe IIa	BovineHD2300007052	26193273	25354853
Classe IIa	BovineHD2300007053	26199461	25361041
Classe IIa	BovineHD2300007057	26255454	25417035
Classe IIa	BovineHD2300007173	26275081	25866835
Classe IIa	BovineHD2300007171	26278305	25863611
Classe IIa	BovineHD4100016081	26285642	25856289
Classe IIa	BovineHD2300007162	26295411	25846520
Classe IIa	BovineHD2300007058	26296875	25425442
Classe IIa	BovineHD2300007059	26299730	25428298
Classe IIa	BovineHD2300007060	26300900	25429469
Classe IIa	BovineHD2300007061	26303000	25431568
Classe IIa	BovineHD2300007062	26304565	25433133
Classe IIa	BovineHD2300007063	26305626	25434194
Classe IIa	BovineHD2300007064	26309259	25438003
Classe IIa	BovineHD2300007066	26312109	25440853
Classe IIa	BovineHD2300007068	26314846	25443589
Classe IIa	BovineHD2300007070	26317942	25446685
Classe IIa	BovineHD2300007071	26319211	25447954
Classe IIa	BovineHD2300007072	26320920	25449663
Classe IIa	BovineHD2300007073	26322003	25450746
Classe IIa	BovineHD2300007074	26323437	25452180
Classe IIa	BovineHD2300007089	26356415	25504409
Classe IIa	BovineHD2300007090	26358363	25506208
Classe IIa	ARS-BFGL-NGS-4203	26359831	25507676
Classe IIa	BovineHD2300007092	26365238	25513202
Classe IIa	BovineHD2300007093	26368632	25516596
Classe IIa	BovineHD2300007095	26373657	25521621

Classe IIa	BovineHD2300007096	26374717	25522681
Classe IIa	BovineHD2300007099	26382886	25530841
Classe IIa	BovineHD2300007100	26387308	25535263
Classe IIa	BovineHD2300007102	26391744	25539699
Classe IIa	BovineHD2300007103	26393742	25541686
Classe IIa	BovineHD2300007104	26397031	25544975
Classe IIa	BovineHD2300007106	26398688	25546632
Classe IIa	BovineHD2300007107	26401757	25549498
Classe IIa	BovineHD2300007108	26403873	25551614
Classe IIa	ARS-BFGL-NGS-109142	26404894	25552635
Classe IIa	BovineHD2300007109	26406973	25554714
Classe IIa	BovineHD2300007110	26408106	25555847
Classe IIa	BovineHD2300007111	26409813	25557554
Classe IIa	BovineHD2300007112	26410607	25558348
Classe IIa	BovineHD2300007115	26417262	25565003
Classe IIa	BovineHD2300007117	26419550	25567290
Classe IIa	BovineHD2300007119	26422161	25569895
Classe IIa	BovineHD2300007120	26423268	25571002
Classe IIa	BovineHD2300007126	26430602	25578363
Classe IIa	BovineHD2300007129	26439789	25587771
Classe IIa	BovineHD2300007130	26440940	25588922
Classe IIa	BovineHD2300007131	26441725	25589707
Classe IIa	BovineHD2300007132	26443554	25591536
Classe IIa	BovineHD2300007136	26469436	25669376
Classe IIa	BovineHD2300007135	26506193	25632620
Classe IIa	BovineHD3100001810	26555053	#N/D
Classe IIa	BovineHD3100001853	26629980	#N/D
Classe IIa	BovineHD3100001851	26630146	#N/D
Classe IIa	BovineHD2300007227	26739757	26711242
Classe IIa	BovineHD2300007225	26757341	26692183
Classe IIa	BovineHD2300007224	26759429	26690095
Classe IIa	BovineHD2300007223	26760410	26689114
Classe IIa	BovineHD2300007222	26761375	26688149
Classe IIa	BovineHD2300007221	26763843	26685681
Classe IIa	BovineHD2300007229	26787168	26725494
Classe IIa	BovineHD2300007231	26790179	26728505
Classe IIa	BTA-27247-no-rs	26797818	26736263
Classe IIa	BovineHD2300007236	26801657	26740102
Classe IIa	BovineHD2300007237	26802662	26741107
Classe IIa	BovineHD2300007238	26803777	26742222
Classe IIa	BovineHD2300007239	26805906	26744351
Classe IIa	BovineHD2300007241	26809765	26748865
Classe IIa	BovineHD2300007242	26810749	26749849

Classe IIa	BovineHD2300007243	26811684	26750784
Classe IIa	BovineHD2300007245	26815146	26754246
Classe IIa	BovineHD2300007247	26820738	26760034
Classe IIa	BovineHD2300007250	26823861	26763157
Classe IIa	BovineHD2300007251	26832280	26771426
Classe IIa	BovineHD2300007254	26841248	26780394
Classe IIa	BovineHD2300007255	26844904	26784050
Classe IIa	BovineHD2300007257	26848727	26787873
Classe IIa	BovineHD2300007258	26850383	26789529
Classe IIa	BovineHD2300007260	26856476	26795622
Classe IIa	BovineHD2300007261	26860845	26799991
Classe IIa	BovineHD2300007263	26866493	26805639
Classe IIa	BovineHD2300007264	26869329	26808474
Classe IIa	BovineHD2300007271	26897060	26836195
Classe IIa	BovineHD2300007272	26898504	26837639
Classe IIa	BovineHD2300007273	26899831	26838966
Classe IIa	BovineHD2300007274	26900829	26839964
Classe IIa	BovineHD2300007277	26906206	26845341
Classe IIa	BovineHD2300007279	26911490	26850625
Classe IIa	BovineHD2300007281	26916153	26855288
Classe IIa	BovineHD2300007282	26917325	26856460
Classe III	BovineHD2300007285	26928798	26868929
Classe III	BovineHD2300007289	26937702	26877833
Classe III	BovineHD2300007291	26951770	26891901
Classe III	BovineHD2300007295	26957011	26897142
Classe III	BovineHD2300007297	26959231	26899362
Classe III	BovineHD2300007298	26961162	26901293
Classe III	BovineHD2300007299	26962773	26902904
Classe III	BovineHD2300007300	26964013	26904144
Classe III	BovineHD2300007304	26973324	26913683
Classe III	BovineHD2300007305	26974780	26915139
Classe III	BovineHD2300007308	26978038	26918397
Classe III	BovineHD2300007309	26978959	26919318
Classe III	BovineHD2300007310	26980114	26920473
Classe III	BovineHD2300007315	26985193	26925552
Classe III	BovineHD2300007316	26986173	26926532
Classe III	BovineHD2300007317	26987287	26927646
Classe III	BovineHD2300007368	27013480	26993631
Classe III	BovineHD2300007372	27023410	27003561
Classe III	BovineHD2300007373	27024427	27004578
Classe III	BovineHD2300007374	27025273	27005424
Classe III	BovineHD2300007375	27025998	27006149
Classe III	BovineHD2300007378	27030664	27010815

Classe III	BovineHD2300007381	27034558	27014708
Classe III	BovineHD2300007384	27050451	27030821
Classe III	BovineHD2300007385	27053248	27032818
Classe III	BovineHD2300007386	27055004	27034574
Classe III	BovineHD2300007388	27061304	27041670
Classe III	BovineHD2300007389	27065490	27045558
Classe III	BovineHD2300007392	27076887	27057476
Classe III	ARS-BFGL-BAC-28338	27078160	27058749
Classe III	BovineHD2300007393	27079062	27059651
Classe III	BovineHD2300007395	27083907	27064496
Classe III	BovineHD2300007398	27086905	27067492
Classe III	BovineHD2300007399	27088161	27068748
Classe III	BovineHD2300007426	27097624	27125428
Classe III	BovineHD2300007412	27102647	27100953
Classe III	BovineHD2300007411	27103842	27099758
Classe III	BovineHD2300007409	27107219	27096381
Classe III	BovineHD2300007408	27108105	27095495
Classe III	BovineHD2300007406	27110177	27093423
Classe III	BovineHD2300007405	27111877	27091723
Classe III	BovineHD2300007403	27117890	27085848
Classe III	BovineHD2300007432	27145303	27153283
Classe III	BovineHD2300007442	27179618	27197646
Classe III	BovineHD2300007443	27182317	27200345
Classe III	BovineHD2300007444	27187567	27205595
Classe III	Hapmap47328-BTA-56087	27196973	27215001
Classe III	BovineHD2300007447	27198045	27216072
Classe III	BovineHD2300007448	27199967	27217994
Classe III	BovineHD2300007450	27202186	27220211
Classe III	BovineHD2300007452	27205316	27223341
Classe III	BovineHD2300007454	27208523	27226548
Classe III	BovineHD2300007457	27214659	27232684
Classe III	BovineHD2300007460	27218480	27236505
Classe III	BovineHD2300007461	27219706	27237731
Classe III	BovineHD2300007462	27220505	27238530
Classe III	BovineHD2300007463	27221462	27239487
Classe III	BovineHD2300007465	27223838	27241906
Classe III	BovineHD2300007466	27226977	27245044
Classe III	BovineHD2300007467	27229685	27247752
Classe III	BovineHD2300007470	27239666	27257734
Classe III	BovineHD2300007474	27247561	27266507
Classe III	BovineHD2300007475	27251956	27270902
Classe III	BovineHD2300007476	27253180	27272126
Classe III	BovineHD2300007477	27254494	27273920

Classe III	BovineHD2300007479	27258987	27279196
Classe III	BovineHD2300007480	27260119	27280328
Classe III	BovineHD2300007481	27261863	27282072
Classe III	BovineHD2300007483	27267724	27287932
Classe III	BovineHD2300007484	27272612	27292820
Classe III	BovineHD2300007485	27275821	27296029
Classe III	BovineHD2300007486	27278262	27298470
Classe III	BovineHD2300007488	27283987	27304195
Classe III	BovineHD2300007489	27285943	27306151
Classe III	BovineHD4100016085	27289228	27309436
Classe III	BovineHD2300007493	27292440	27312648
Classe III	BovineHD2300007496	27296112	27316320
Classe III	BovineHD2300007497	27298873	27319081
Classe III	BovineHD2300007506	27311510	27331719
Classe III	BovineHD2300007509	27332693	27340413
Classe III	BovineHD2300007510	27335298	27343018
Classe III	BovineHD2300007513	27339532	27347252
Classe III	BovineHD2300007526	27342614	27372146
Classe III	BovineHD2300007524	27346230	27368531
Classe III	BovineHD2300007522	27350212	27364549
Classe III	BovineHD2300007518	27355115	27359646
Classe III	BovineHD2300007527	27361425	27375669
Classe III	BovineHD2300007529	27365194	27379438
Classe III	ARS-BFGL-NGS-72442	27368932	27383176
Classe III	BovineHD4100016086	27374384	27388628
Classe III	BovineHD2300007533	27378753	27392997
Classe III	BovineHD2300007534	27384628	27398872
Classe III	BovineHD2300007536	27389547	27403791
Classe III	BovineHD2300007538	27393714	27407958
Classe III	BovineHD2300007539	27397108	27411352
Classe III	BovineHD2300007540	27399079	27413323
Classe III	Hapmap57616-rs29026690	27407104	27421348
Classe III	BovineHD2300007546	27411559	27425803
Classe III	BovineHD2300007552	27418216	27432460
Classe III	BovineHD2300007556	27422437	27436681
Classe III	BovineHD2300007558	27426437	27440681
Classe III	ARS-BFGL-NGS-104658	27429820	27444064
Classe III	BovineHD2300007561	27432753	27446997
Classe III	BovineHD2300007563	27435488	27449732
Classe III	BovineHD2300007567	27442967	27457212
Classe III	BovineHD2300007568	27446049	27460294
Classe III	BovineHD2300007570	27451786	27466031
Classe III	BovineHD2300007575	27459606	27473851

Classe III	BovineHD2300007578	27464082	27478366
Classe III	BovineHD2300007580	27468716	27483000
Classe III	ARS-BFGL-NGS-2116	27471183	27485467
Classe III	BovineHD2300007581	27475089	27489373
Classe III	BovineHD2300007583	27500200	27502853
Classe III	BovineHD2300007584	27502919	27505572
Classe III	BovineHD2300007585	27505191	27507844
Classe III	BovineHD2300007587	27512037	27514690
Classe III	BovineHD2300007590	27516809	27519462
Classe III	BovineHD2300007594	27522307	27524960
Classe III	BovineHD2300007596	27524546	27527199
Classe III	BovineHD2300007599	27529280	27531933
Classe III	BovineHD2300007602	27533025	27535678
Classe III	BovineHD2300007603	27535323	27537976
Classe III	BovineHD2300007604	27538521	27541174
Classe III	BovineHD2300007608	27545945	27548598
Classe III	BovineHD2300007611	27549994	27552647
Classe III	BovineHD2300007613	27556098	27558777
Classe III	BovineHD2300007618	27562634	27565313
Classe III	BovineHD2300007620	27565156	27567835
Classe III	BovineHD2300007622	27567354	27570033
Classe III	BovineHD2300007623	27572470	27575149
Classe III	ARS-BFGL-NGS-43021	27580795	27583474
Classe III	BovineHD2300007628	27588936	27591615
Classe III	BovineHD2300007630	27591024	27593703
Classe I	BovineHD2300007633	27598724	27601403
Classe I	BovineHD2300007638	27730111	27627775
Classe I	BovineHD2300007642	27736995	27634659
Classe I	BovineHD2300007644	27741761	27640249
Classe I	BovineHD2300007647	27743874	27642362
Classe I	BovineHD2300007649	27804554	27650286
Classe I	BovineHD2300007650	27806768	27652500
Classe I	BovineHD2300007654	27819462	27665155
Classe I	BovineHD2300007662	27839884	27685577
Classe I	BovineHD2300007668	27855028	27700720
Classe I	BovineHD2300007683	27897406	27761424
Classe I	BovineHD2300007686	27901761	27765779
Classe I	BovineHD2300007687	27903991	27768031
Classe I	BovineHD2300007689	27907967	27772156
Classe I	BovineHD2300007692	27911059	27775248
Classe I	BovineHD2300007695	27916382	27780571
Classe I	BovineHD2300007707	27932603	27796803
Classe I	BovineHD2300007709	27935641	27799841

Classe I	BovineHD2300007711	27937778	27801978
Classe I	ARS-BFGL-NGS-97747	27939837	27804037
Classe I	BovineHD2300007718	27946027	27810230
Classe I	BovineHD2300007720	27949020	27813222
Classe I	BovineHD2300007722	27953118	27817320
Classe I	BovineHD2300007727	27958552	27822754
Classe I	BovineHD2300007732	27965177	27829379
Classe I	BovineHD2300007735	27970271	27834473
Classe I	BovineHD2300007737	27973970	27838172
Classe I	BovineHD2300007742	27982600	27846802
Classe I	BovineHD2300007744	27986691	27850893
Classe I	BovineHD2300007746	27989007	27853209
Classe I	BovineHD2300007750	28000686	27880661
Classe I	BovineHD2300007753	28005912	27885887
Classe I	BovineHD2300007754	28011618	27891593
Classe I	BovineHD2300007758	28018860	27898835
Classe I	BovineHD2300007759	28021838	27901813
Classe I	BovineHD2300007761	28029647	27909622
Classe I	BovineHD2300007763	28047862	27927837
Classe I	BovineHD2300007765	28050651	27930626
Classe I	BovineHD2300007768	28056821	27936796
Classe I	BovineHD2300007771	28060457	27940432
Classe I	BTA-55821-no-rs	28064091	27944066
Classe I	BovineHD4100016092	28067767	27947741
Classe I	BovineHD2300007776	28069924	27949898
Classe I	BovineHD4100016093	28077464	27957438
Classe I	BovineHD4100016094	28080928	27960902
Classe I	BovineHD2300007781	28083687	27963661
Classe I	BovineHD2300007783	28094594	27974568
Classe I	BovineHD2300007786	28098553	27978526
Classe I	BovineHD2300007789	28105877	27986085
Classe I	BovineHD2300007791	28110222	27990852
Classe I	BTA-55853-no-rs	28112250	27992880
Classe I	BovineHD2300007793	28116076	27996706
Classe I	BovineHD2300007799	28123588	28004218
Classe I	BovineHD2300007802	28128876	28009506
Classe I	BovineHD2300007804	28130925	28011554
Classe I	BovineHD2300007806	28135369	28016282
Classe I	BovineHD2300007810	28142247	28023160
Classe I	BovineHD2300007812	28144660	28025573
Classe I	BovineHD2300007813	28147306	28028219
Classe I	BovineHD2300007816	28154436	28035349
Classe I	BTA-55867-no-rs	28165417	28046330

Classe I	BovineHD2300007821	28169789	28050702
Classe I	BovineHD2300007824	28173531	28054444
Classe I	BovineHD2300007828	28181385	28062298
Classe I	BovineHD2300007831	28188741	28069648
Classe I	BovineHD2300007833	28192173	28073080
Classe I	BovineHD2300007834	28195123	28076030
Classe I	BovineHD2300007835	28197472	28078379
Classe I	BovineHD2300007836	28200612	28081519
Classe I	BovineHD2300007838	28204254	28085159
Classe I	ARS-BFGL-NGS-4240	28206725	28087630
Classe I	BovineHD2300007839	28210255	28091160
Classe I	BovineHD2300007841	28214105	28095010
Classe I	BovineHD2300007843	28219936	28100841
Classe I	BovineHD2300007845	28222457	28103362
Classe I	BovineHD2300007854	28234392	28122679
Classe I	BovineHD2300007852	28236742	28120329
Classe I	BovineHD2300007849	28240954	28116117
Classe I	BovineHD2300007847	28243831	28113240
Classe I	BovineHD2300007858	28249985	28131399
Classe I	BovineHD2300007862	28255533	28136947
Classe I	BovineHD2300007867	28262452	28143866
Classe I	BovineHD2300007868	28264741	28146155
Classe I	BovineHD4100016099	28269213	28150627
Classe I	BovineHD2300007870	28272919	28154333
Classe I	BovineHD2300007872	28276410	28157824
Classe I	BovineHD2300007876	28289771	28171185
Classe I	BovineHD2300007878	28298767	28180181
Classe I	BovineHD2300007881	28304392	28185806
Classe I	BovineHD4100016100	28306887	28188301
Classe I	UA-IFASA-5823	28312087	28193501
Classe I	BovineHD2300007886	28316913	28198327
Classe I	BovineHD2300007887	28319036	28200450
Classe I	BovineHD2300007891	28325939	28207353
Classe I	BovineHD2300007901	28342729	28224143
Classe I	BovineHD2300007904	28348263	28229677
Classe I	BovineHD2300007914	28363718	28250023
Classe I	BovineHD2300007913	28365637	28248104
Classe I	BovineHD2300007908	28375575	28238171
Classe I	BovineHD2300007915	28380039	28251058
Classe I	BovineHD2300007916	28382956	28253974
Classe I	BovineHD2300007918	28386798	28257816
Classe I	BovineHD2300007922	28390744	28261754
Classe I	BovineHD2300007926	28395606	28266616

Classe I	BovineHD2300007929	28402068	28273077
Classe I	BovineHD2300007931	28405473	28276482
Classe I	BovineHD2300007933	28409597	28280606
Classe I	BovineHD2300007934	28412069	28283075
Classe I	BovineHD2300007935	28417204	28288210
Classe I	BovineHD2300007936	28419981	28290987
Classe I	BovineHD2300007939	28425487	28296493
Classe I	BovineHD2300007940	28428622	28299628
Classe I	BovineHD2300007942	28431993	28302999
Classe I	BovineHD2300007946	28438155	28309160
Classe I	BovineHD2300007949	28451697	28322702
Classe I	BovineHD2300007952	28459311	28330316
Classe I	BovineHD2300007965	28495335	28366219
Classe I	BovineHD2300007977	28522799	28393677
Classe I	BovineHD2300007980	28527457	28398335
Classe I	BovineHD2300007982	28530890	28401762
Classe I	BovineHD2300007985	28535967	28406839
Classe I	BovineHD2300007986	28538018	28408890
Classe I	BovineHD2300007993	28549364	28420236
Classe I	BovineHD2300008001	28568186	28439058
Classe I	BovineHD2300008003	28571409	28442281
Classe I	BovineHD2300008005	28578001	28448873
Classe I	BovineHD2300008019	28639534	28486281
Classe I	BovineHD2300015634	28647646	28494393
Classe I	BovineHD2300008061	28750331	28596093
Classe I	BovineHD2300008062	28753324	28599086
Classe I	BovineHD2300008064	28756570	28602332
Classe I	BovineHD2300008066	28759319	28605081
Classe I	BovineHD2300008071	28764877	28610641
Classe I	BovineHD2300008078	28773885	28619649
Classe I	BovineHD2300008083	28781132	28626894
Classe I	BovineHD2300008084	28783109	28628871
Classe I	BovineHD2300008086	28785152	28630914
Classe I	BovineHD2300008095	28796792	28642554
Classe I	BovineHD2300008099	28804692	28650456
Classe I	BovineHD2300008101	28807592	28653356
Classe I	BovineHD2300008104	28812807	28658571
Classe I	BovineHD2300008106	28815549	28661313
Classe I	BovineHD2300008108	28818411	28664175
Classe I	BovineHD2300008109	28820469	28666233
Classe I	BovineHD2300008113	28826131	28671895
Classe I	BovineHD2300008117	28833332	28679096
Classe I	BovineHD2300008120	28886962	#N/D

Classe I	BovineHD2300008122	28889837	#N/D
Classe I	BovineHD2300008126	28893918	#N/D
Classe I	BovineHD2300008133	28901045	#N/D
Classe I	BovineHD2300008135	28903736	#N/D
Classe I	BovineHD2300008139	28908720	#N/D
Classe I	BovineHD2300008141	28911818	#N/D
Classe I	BovineHD2300008144	28916171	#N/D
Classe I	BovineHD2300008147	28921032	#N/D
Classe I	BovineHD2300008148	28922945	#N/D
Classe I	BovineHD4100016109	28929062	#N/D
Classe I	BovineHD2300008153	28932434	#N/D
Classe I	BovineHD2300008154	28936327	#N/D
Classe I	BovineHD2300008159	28942578	#N/D
Classe I	BovineHD2300008167	28951420	#N/D
Classe I	BovineHD2300008175	28960647	#N/D
Classe I	BovineHD2300008176	28963792	#N/D
Classe I	BovineHD2300008188	29000670	#N/D
Classe I	BovineHD2300008191	29006685	#N/D
Classe I	BovineHD2300008193	29012383	#N/D
Classe I	BovineHD2300008195	29016621	#N/D
Classe I	BovineHD2300008196	29018603	#N/D
Classe I	BovineHD2300008197	29021625	#N/D
Classe I	BovineHD2300008202	29031633	#N/D
Classe I	BovineHD2300008203	29041311	#N/D
Classe I	BovineHD2300008206	29044973	#N/D
Classe I-ex	BovineHD4100016111	29059360	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008210	29065561	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008213	29072661	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008215	29075523	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008219	29084505	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008222	29106335	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008234	29137359	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008236	29146059	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008239	29150928	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008240	29153104	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008270	29276820	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008272	29281236	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008273	29284388	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008274	29296118	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008277	29303965	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008278	29307202	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008285	29314432	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008289	29327361	#N/D

Classe I-ex	BovineHD2300008291	29331704	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008294	29336152	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008296	29342165	#N/D
Classe I-ex	ARS-BFGL-NGS-96241	29347180	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008300	29351908	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008301	29356885	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008304	29362897	#N/D
Classe I-ex	ARS-BFGL-NGS-95687	29368535	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008308	29374184	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008310	29378984	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008314	29385266	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008317	29389984	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008318	29392394	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008321	29405647	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008323	29408653	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008325	29413271	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008329	29421384	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008331	29427324	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008345	29461650	#N/D
Classe I-ex	ARS-BFGL-BAC-35219	29471875	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008350	29473923	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008353	29478770	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008354	29481282	#N/D
Classe I-ex	BovineHD2300008356	29483983	#N/D

27418216	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27422437	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27426437	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27429820	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27432753	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27435488	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27442967	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27446049	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27451786	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Light Purple	Green
27459606	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27464082	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27468716	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27471183	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27475089	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27500200	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27502919	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27505191	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green
27512037	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27516809	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27522307	Red	Light Purple	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27524546	Green	Red	Light Purple	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green
27529280	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27533025	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27535323	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green
27538521	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27545945	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27549994	Red	Red	Light Purple	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27556098	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27562634	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27565156	Green	Light Purple	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Green
27567354	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27572470	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27580795	Red	Red	Light Purple	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27588936	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27591024	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27598724	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27730111	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green
27736995	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27741761	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green
27743874	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27804554	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Red	Red	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
27806768	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Light Purple	Green	Light Purple	Green	Green	Green	Green
27819462	Green	Light Purple	Green	Light Purple	Light Purple	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Light Purple	Green	Green	Light Purple	Green

APÊNDICE D — Estudos com diversidade de *DRB3* em gados bovinos utilizados como referências neste trabalho.

Tabela 12 — Resumo dos estudos com o gene *DRB3* em rebanhos bovinos.

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq. ¹	Técnica ³
Baltian et al., 2012	Argentina	Holstein	<i>B. taurus</i>	123	Único	30	11,78%	9	69,51%	PCR-RFLP
Giovambatista et al., 1996	Argentina	Crioulo Argentino	<i>B. taurus</i> Crioulo	194	Múltiplo	21	22,60%	6	72,80%	PCR-RFLP
Juliarena et al., 2008	Argentina	Holstein	<i>B. taurus</i>	230	Múltiplo	29	15%	8	73,92%	PCR-RFLP, PCR-SSO
Juliarena et al., 2009	Argentina	Holstein	<i>B. taurus</i>	241	Múltiplo	31	16,09%	8	78,05%	PCR-RFLP, PCR-SSO
Panei et al., 2009	Argentina	Holstein	<i>B. taurus</i>	81	Único	17	21,00%	8	84,00%	PCR-RFLP
Giovambatista et al., 2013	Bolívia	Yacumeño	<i>B. taurus</i> Crioulo	113	Único	35	10,62%	5	41,16%	PCR-SBT
Ripoli et al., 2004	Bolívia	Saavedreño	<i>B. taurus</i> Crioulo	125	Único	22	16,80%	7	70,00%	PCR-RFLP
da Mota et al., 2002	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	28	Único	17	17,86%	8	75,00%	PCR-SBT, Clonagem
Machado et al., 2005	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	470	Múltiplo	27	16,90%	6	64,60%	PCR-RFLP
Machado et al., 2005	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	150	Único	15	27,00%	6	94,00%	PCR-RFLP
Machado et al., 2005	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	320	Único	26	24,70%	9	83,80%	PCR-RFLP
Martinez et al., 2006	Brasil	Holstein-Gir	Híbrido	231	Único	20	30,74%	7	81,60%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	1076	Múltiplo	37	19,04%	5	60,01%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	414	Único	29	27,42%	7	72,72%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	160	Único	23	18,73%	9	79,69%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	236	Único	18	26,11%	6	92,99%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	85	Único	24	20,24%	7	74,41%	PCR-RFLP

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq..	Técnica ³
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	53	Único	16	38,83%	5	72,82%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	67	Único	19	20,45%	5	74,25%	PCR-RFLP
Nascimento et al., 2006	Brasil	Gir	<i>B. indicus</i>	61	Único	19	22,31%	4	61,15%	PCR-RFLP
Rupp et al., 2007	Canadá	Holstein	<i>B. taurus</i>	328	Múltiplo	25	16,00%	8	NI	PCR-RFLP
Schwab et al., 2009	Canadá	Holstein	<i>B. taurus</i>	56	NI	13	25%	7	NI	PCR-SBT
Sharif et al., 1998a	Canadá	Holstein	<i>B. taurus</i>	835	Múltiplo	27	20,10%	7	88,70%	PCR-RFLP
Sharif et al., 1998a	Canadá	Jersey	<i>B. taurus</i>	66	Múltiplo	13	17,20%	7	87,00%	PCR-RFLP
Wang et al., 2008	China	Chinese Yellow	<i>B. taurus turano-mongolicus</i>	80	NI	23	14,40%	8	58,90%	PCR-SBT
Wu et al., 2010	China	Holstein	<i>B. taurus</i>	629	NI	22	23,53%	6	63,74%	PCR-RFLP
Giovambatista et al., 2013	Colômbia	Hartón del Valle	<i>B. taurus</i> Crioulo	66	Único	24	12,12%	10	78,80%	PCR-SBT
Martinez et al., 2005	Colômbia	Brahman Blanco	<i>B. indicus</i>	NI	NI	11	17,60%	11	100%	PCR-RFLP
Martinez et al., 2005	Colômbia	Orejinegro (BON)	<i>B. taurus</i> Crioulo	NI	NI	31	14,60%	4	43,40%	PCR-RFLP
Zambrano et al., 2011	Colômbia	Holstein	<i>B. taurus</i>	66	NI	23	16,00%	7	68,00%	PCR-RFLP
Zambrano et al., 2011	Colômbia	BOM-Holstein	Híbrido	25	NI	18	20,00%	7	74,00%	PCR-RFLP
Jeong et al., 2007	Coreia	Hanwoo	Híbrido	70	Único	17	18,57%	8	79,99%	PCR-RFLP
Lee et al., 2011	Coreia	Holstein	<i>B. taurus</i>	35	NI	9	33,20%	5	89,30%	Pirosequenciamento
Lee et al., 2011	Coreia	Hanwoo	Híbrido	359	NI	38	22,66%	6	68,31%	Pirosequenciamento
Dietz et al., 1997a	EUA	Holstein	<i>B. taurus</i>	127	Único	22	21,30%	7	76,20%	PCR-RFLP
Dietz et al., 1997b	EUA	Holstein	<i>B. taurus</i>	1100	Múltiplo	29	14,29%	7	75,62%	PCR-RFLP
Gilliespie et al., 1999	EUA	Jersey	<i>B. taurus</i>	172	Único	24	22,90%	7	79,40%	PCR-RFLP

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq..	Técnica ³
Kelm et al., 1997	EUA	Holstein	<i>B. taurus</i>	137	Único	NI	21,31%	7	76,24%	PCR-RFLP
Untalan et al., 2007	EUA	Simmental X Red Poll	Híbrido	50	Único	19	23%	6	71%	PCR-RFLP, Clonagem
Behl et al., 2007	Índia	Kankrej	<i>B. indicus</i>	50	Múltiplo	24	22,00%	6	71,00%	PCR-RFLP
Behl et al., 2009	Índia	Hariana	<i>B. indicus</i>	35	Único	16	17,14%	8	78,56%	PCR-RFLP
Behl et al., 2009	Índia	Rathi	<i>B. indicus</i>	51	Múltiplo	13	19,61%	6	55,87%	PCR-RFLP
Behl et al., 2009	Índia	Sahiwal	<i>B. indicus</i>	45	Único	20	15,56%	7	72,23%	PCR-RFLP
Das et al., 2012	Índia	Hallikar	<i>B. indicus</i>	73	Múltiplo	29	13,00%	5	45,86%	PCR-RFLP
Das et al., 2012	Índia	Malnad Gidda	<i>B. indicus</i>	107	Múltiplo	37	10,30%	5	40,68%	PCR-RFLP
Das et al., 2012	Índia	Ongole	<i>B. indicus</i>	60	Único	21	22,00%	5	72,47%	PCR-RFLP
Gowane et al., 2013	Índia	Crossbreed	Híbrido	80	Único	NI	16,79%	9	93,12%	PCR-SBT
Ballingal et al., 2011	Inglaterra	Holstein	<i>B. taurus</i>	111	Múltiplo	20	18,80%	7	83,00%	PCR-SBT
Baxter et al., 2010	Inglaterra	Holstein x Charolais	<i>B. taurus</i>	178	NI	18	20,00%	9	82,00%	PCR-SBT
Lotfollahzadeh et al., 2014	Irã	Holstein	<i>B. taurus</i>	66	Único	21	8,60%	6	43,00%	PCR-RFLP
Lotfollahzadeh et al., 2014	Irã	Holstein	<i>B. taurus</i>	54	Único	17	25,00%	5	64,66%	PCR-RFLP
Mohammadi et al., 2009	Irã	Sistani	<i>B. indicus</i>	65	Único	32	21,54%	7	64,58%	PCR-RFLP
Mosafer; Nassiry 2005	Irã	Golpayegani	<i>B. indicus</i>	50	Único	19	14,00%	9	74,00%	PCR-RFLP
Nassiry et al., 2005	Irã	Holstein	<i>B. taurus</i>	250	Único	26	26,60%	5	71%	PCR-RFLP
Nassiry et al., 2008	Irã	Golpayegani	<i>B. indicus</i>	50	NI	19	14,00%	9	74,00%	PCR-RFLP
Nassiry et al., 2008	Irã	Najdi	<i>B. indicus</i>	52	NI	16	13,00%	11	93,00%	PCR-RFLP
Nassiry et al., 2008	Irã	Sistani	<i>B. indicus</i>	49	NI	19	22,00%	6	70,00%	PCR-RFLP
Nassiry et al., 2008	Irã	Sarabi	<i>B. taurus</i>	52	NI	15	23,00%	7	87,00%	PCR-RFLP

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq..	Técnica ³
Pashmi et al., 2006	Irã	Sarabi	<i>B. taurus</i>	136	NI	26	15,10%	7	70,90%	PCR-RFLP
Pashmi et al., 2007	Irã	Holstein	<i>B. taurus</i>	262	Múltiplo	28	17,94%	7	75%	PCR-RFLP
Sadeghi et al., 2008	Irã	Sistani	<i>B. indicus</i>	150	NI	23	19,33%	5	70,99%	PCR-RFLP
Torbati et al., 2004	Irã	Sarabi	<i>B. taurus</i>	50	NI	15	23,00%	7	87,00%	PCR-RFLP
Miyasaka et al., 2011	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	35	Único	11	27,10%	9	95,60%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2011	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	67	Único	14	24,60%	8	90,30%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2011	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	41	Único	9	35,40%	4	85,50%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2011	Japão	Japanese Black	<i>B. taurus</i>	338	Único	20	33,40%	7	86,50%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2011	Japão	Japanese Black	<i>B. taurus</i>	69	Único	12	27,50%	8	88,30%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2011	Japão	Japanese Black	<i>B. taurus</i>	100	Único	18	31,50%	6	86,00%	PCR-SBT
Miyasaka et al., 2013	Japão	Japanese Black	<i>B. taurus</i>	186	Único	16	35,20%	6	83,40%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	352	Múltiplo	21	19,60%	8	83,6%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	68	Único	16	25,00%	6	79,4%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	58	Único	9	24,10%	6	93,1%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	100	Único	15	18,00%	6	73,0%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	50	Único	14	20,00%	8	84,0%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	38	Único	11	18,40%	9	97,4%	PCR-SBT
Takehima et al., 2002	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	38	Único	12	21,10%	8	89,6%	PCR-SBT

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq..	Técnica ³
Takehima et al., 2003	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	101	NI	18	16,80%	9	87%	PCR-SBT
Takehima et al., 2003	Japão	Japanese Black	<i>B. taurus</i>	201	NI	23	17,40%	7	69,70%	PCR-SBT
Takehima et al., 2003	Japão	Japanese Shorthorn	<i>B. taurus</i>	100	NI	20	16,00%	8	77%	PCR-SBT
Takehima et al., 2003	Japão	Jersey	<i>B. taurus</i>	69	NI	14	18,10%	8	89,80%	PCR-SBT
Yoshida et al., 2008	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	702	Múltiplo	20	20,30%	7	83,60%	PCR-RFLP
Yoshida et al., 2009	Japão	Holstein	<i>B. taurus</i>	194	Múltiplo	16	16,50%	7	84,70%	PCR-SBT
Fernandéz et al., 2008	México	NI	<i>B. taurus</i> Crioulo	51	Único	34	20,60%	3	45,10%	PCR-RFLP
Fernandéz et al., 2008	México	NI	<i>B. taurus</i> Crioulo	47	Múltiplo	18	38,30%	6	75,50%	PCR-RFLP
Ruzina et al., 2010	Mongólia	Mongolian	<i>B. taurus turano-mongolicus</i>	71	Múltiplo	35	15,49%	10	73,93%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Brahman	<i>B. indicus</i>	30	Múltiplo	16	32,70%	8	78,80%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Holstein	<i>B. taurus</i>	30	NI	14	19,60%	7	64,00%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Lucerna	<i>B. taurus</i>	30	NI	13	33,00%	5	79,60%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Blanco Orejinegro	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	Único	15	25,00%	6	78,50%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Caqueteño	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	NI	25	10,30%	11	70,90%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Casanareño	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	Único	18	13,70%	8	70,50%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Chino Santandereano	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	NI	10	17,80%	8	92,50%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Costeño con cuernos	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	Único	12	40,30%	6	85,60%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Hartón del Valle	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	NI	14	10,00%	9	63,30%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	Romosinuano	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	Único	16	15,00%	9	74,90%	PCR-RFLP
Hernandéz et al., 2013	NI	San martinero	<i>B. taurus</i> Crioulo	30	Múltiplo	12	35,00%	6	81,60%	PCR-RFLP

Estudo	País ¹	Raça	Espécie	N	Rebanho ¹	nº de Alelos ¹	Freq. alelo + freq. ¹	nº > 0.05 ²	∑ alelos + freq..	Técnica ³
Hernández et al., 2013	NI	Velásquez	<i>Híbrido</i>	30	Único	11	30,00%	6	80,00%	PCR-RFLP
Kulberg et al., 2007	Noruega	Nowergian Red	<i>B. taurus</i>	523	Múltiplo	27	17,10%	7	78,10%	PCR-RFLP
Oprzadek et al., 2012	Polônia	Holstein	<i>B. taurus</i>	223	Único	14+	28,80%	5	55,53%	PCR-RFLP
Oprzadek et al., 2012	Polônia	Holstein	<i>B. taurus</i>	529	Único	12+	25,50%	4	49,05%	PCR-RFLP
Ruzina et al., 2010	Rússia	Kalmyk	<i>B. taurus turano-mongolicus</i>	62	Único	34	24,19%	7	78,23%	PCR-RFLP
Ruzina et al., 2010	Rússia	Yakut	<i>B. taurus turano-mongolicus</i>	42	NI	5	77,30%	2	90,40%	PCR-RFLP
Duangjinda et al., 2008	Tailândia	Crossbreed	<i>Híbrido</i>	409	Múltiplo	40	13,90%	6	61,10%	PCR-RFLP
Duangjinda et al., 2013	Tailândia	Sahiwal	<i>B. indicus</i>	95	NI	NI	NI	NI	NI	PCR-RFLP
Duangjinda et al., 2013	Tailândia	Thai Friesian	<i>Híbrido</i>	101	NI	NI	NI	NI	NI	PCR-RFLP
Duangjinda et al., 2013	Tailândia	Thai Milking Zebu	<i>Híbrido</i>	187	NI	NI	NI	NI	NI	PCR-RFLP
Kelly et al., 2003	Uruguai	Crioulo	<i>B. taurus Crioulo</i>	51	Único	22	16,70%	6	66,80%	PCR-RFLP

¹NI, não informado;

²Somatório dos alelos com frequência acima de 5%;

³PCR-RFL, polymerase chain reaction (PCR) using restriction fragment length polymorphism; PCR-SSO, PCR using sequence-specific oligonucleotide; PCR-SBT; PCR using sequence-based typing.

APÊNDICE E — Artigo científico publicado na revista *Animal Genetics* (DOI: 10.1111/age.12285), contendo parte dos resultados obtidos neste trabalho.

ANIMAL GENETICS Immunogenetics, Molecular Genetics and Functional Genomics 
SHORT COMMUNICATION doi: 10.1111/age.12285

Description of bovine major histocompatibility complex class IIa haplotypes using parthenogenetic embryo-derived cells

A. L. A. Sá*, V. S. G. Leal[†], M. P. C. Schneider[‡], O. M. Ohashi*, E. J. M. Santos[†], P. K. Riggs[§], K. J. Kochan[§], C. A. Gill[§], E. D. Downey[¶], J. E. Womack^{**}, L. C. Skow[¶], M. S. Miranda* and L. Sena[†]

*Laboratório de Fecundação In Vitro, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil.

[†]Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil.

[‡]Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil.

[§]Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. [¶]Department of Cellular and Molecular Medicine, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ^{**}Department of Veterinary Integrative Biosciences, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.

Summary

In this study, we report an approach to characterize individual BoLA haplotypes using cells from parthenogenetic bovine embryos derived from slaughterhouse ovaries. Eight of the 15 parthenogenetic embryos so obtained had not undergone meiotic recombination on the BoLA region and were suitable to describe BoLA haplotypes. Detailed analysis of the BoLA class IIa region identified seven different class IIa haplotypes, including six not previously described and two new alleles of BoLA-DQA and one BoLA-DQB. Our method provided reliable sources of homozygous DNA to describe BoLA haplotypes.

Keywords BoLA haplotypes, DRB3-DQA-DQB, MHC, oocyte activation