

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EDIANE PALUDO**

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS GENES B-L $\beta$  DO MHC DA**  
**GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) EM AVES CAPIRAS**  
**BRASILEIRAS**

**LAGES, SANTA CATARINA**

**2011**

**EDIANE PALUDO**

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS GENES B-L $\beta$  DO MHC DA  
GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) EM AVES CAIPIRAS  
BRASILEIRAS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa.

**LAGES, SANTA CATARINA**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Paludo, Ediane

Estudo da variabilidade dos genes b-l $\beta$  do mhc da galinha (*Gallus gallus domesticus*) em aves caipiras brasileiras / Ediane Paludo ; orientador: Carlos André da Veiga Lima Rosa. – Lages, 2011. 47f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. Genes B-L $\beta$ . 2. Galinhas caipiras 3. Variabilidade genética. 4. MHC  
I. Título.

CDD – 636.5

**EDIANE PALUDO**

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS GENES B-L $\beta$  DO MHC DA  
GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) EM AVES CAIPIRAS  
BRASILEIRAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Aprovado em: 12/08/2011

Homologado em: / /2011

**Banca Examinadora:**

---

**Orientador/presidente:** Dr. Carlos André da  
Veiga Lima Rosa  
UDESC/Lages - SC

---

Dr. André Fischer Sbrissia  
Coordenador do Curso de Mestrado em  
Ciência Animal – UDESC/Lages – SC.

---

**Membro:** Dr Luiz Cláudio Miletti  
UDESC/Lages - SC

---

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias  
Diretor Geral do Centro de Ciências  
Agroveterinárias – UDESC/Lages - SC

---

**Membro:** Dr. Taiana Haag  
(UFRGS)

Lages, Santa Catarina  
12 de agosto de 2011

## AGRADECIMENTOS

O acontecimento deste trabalho contou com ajuda de muitas pessoas, mas antes de tudo primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado força nas horas de fraqueza, entusiasmo nas horas de angústia, calma no meio de muito desespero, sabedoria, paciência, esperança nos momentos que mais precisava.

Agradeço pela força que meus familiares, o apoio da minha mãe Victoria, a força espiritual do meu pai Armando (in memória), a confiança dos meus irmãos Elaine, Edivan e Eliane e meus cunhados Arli e Indianara. Agradeço muito por sempre terem me apoiado e me fortalecerem nas minhas decisões.

Agradeço a equipe da Embrapa Suínos e Aves, sem o apoio dos mesmos não teria continuado meus estudos. Em especial a Nelise, Magda, Iara, Paulo, Tânia e Aline. Sem esquecer da Pâmela, amiga que me apoiou muito no início da mudança de cidade.

Até conseguir subir o degrau do ingresso ao mestrado foi demorado, sofrido. Mas neste período contei com a ajuda de pessoas muito especiais, muito obrigada a todas de uma forma ou outra que acreditaram e confiaram. Especialmente ao meu orientador Carlos André que sempre esteve me apoiando e ajudando.

A todas as pessoas do Laboratório de Análises Genéticas DNA UDESC, as quais tiveram convívio durante todo o período de mestrado, sendo desenvolvendo o meu trabalho de mestrado ou trabalhando no próprio Laboratório DNA UDESC: Altamir, Adelar, Jefferson, Jaqueline, Marley; aos colegas mestrados ou mestres: Mari Helen, Graziela, Carmelice, Gerson, Leyri, Naine, Joana e Giseli; aos colegas da graduação: Fábio, Marcos, Filipe, Daniele, Tomás, Alison, Newton. Todos ajudaram a aumentar meu conhecimento em diversas áreas.

Obrigada as pessoas que morei junto: Linamara, Vanessa, Marina, Nathalia e Greicy. As pessoas que se tornaram minhas amigas, as melhores amigas ou só amizade por simpatia, as quais confortam a distancia da família ou simplesmente dão bom dia.

Agradeço a banca avaliadora por ter aceitado o convite, pela disposição de tempo pra ler o trabalho, se deslocar até a apresentação e fazer as arguições necessárias.

"Sofremos demais pelo pouco que nos  
falta e alegamo-nos pouco pelo muito que  
temos. "  
(SHAKESPEARE)

## RESUMO

PALUDO, Ediane. **ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS GENES B-L $\beta$  DO MHC DA GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) EM AVES CAPIRAS BRASILEIRAS**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, SC, 2011.

As galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis são o resultado de cruzamentos aleatórios entre diversas raças de galinhas encontradas no Brasil com galinhas Araucanas, dando origem a uma galinha caipira brasileira com característica de ovos azuis. Destaca-se pela sua rusticidade, resistência a doenças e as condições adversas de clima e alimentação. A resistência a doenças esta relacionada à variabilidade genética dos genes do sistema imune. A resposta imune das galinhas a patógenos é desencadeada a partir da apresentação de antígenos as células efectoras do sistema imune. Esta ação é feita pelas células apresentadoras de antígenos (células B, macrófagos e uma pequena porcentagem de células T) dos animais que possuem moléculas de superfície (glicoproteínas) na qual são complexados estes antígenos. Estas glicoproteínas apresentadoras de antígenos, chamadas de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC ou Complexo B), podem ser de classe I ou de classe II. As de classe II, que apresentam antígenos exógenos, são formadas por duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ . A cadeia  $\alpha$  é monomórfica e a cadeia  $\beta$  é bem polimórfica, e é considerada a responsável por codificar diferentes moléculas MHC classe II em galinhas. Este estudo teve como objetivo investigar a variabilidade genética em dois *loci* gênicos do MHC de classe II, B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II, em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis através da obtenção das sequências destes dois genes B-L $\beta$  e assim detectar os alelos existentes para estes genes nestas aves. Este trabalho foi desenvolvido inicialmente com amostras de DNA de 100 galinhas caipiras de ovos azuis que foram amplificadas para a região de interesse e analisadas. A partir desta análise, os animais foram agrupados de acordo com a sequência do exon 2. Depois, 16 animais foram selecionados (com pelo menos um representante de cada grupo) para a reação de amplificação do DNA, clonagem e sequenciamento. As amostras foram submetidas aos iniciadores dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II. Destas 16 aves obteve-se 15 diferentes sequências que foram alinhadas a sequência padrão B-LB12major (AJ248576) para o B-L $\beta$ II e B-LB12c (AJ248578) para o B-L $\beta$ I, sendo onze sequências B-L $\beta$ II e quatro

sequências B-L $\beta$ I. Destas onze sequências do gene B-L $\beta$ II sete já estavam descritas na literatura e quatro são sequências “novas” ainda não descritas, das outras quatro sequências do gene B-L $\beta$ I três já haviam sido descritas na literatura e uma “nova”. As 15 sequências nucleotídicas encontradas foram deduzidas em sequências de aminoácidos. Nas sequências de aminoácidos foi observado que o gene B-L $\beta$ I se mantém bem mais conservado do que o gene B-L $\beta$ II. Assim, este trabalho apresenta a variabilidade genética dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II tanto em nível de DNA quanto de cadeia polipeptídica, em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis.

**PALAVRA-CHAVE:** Genes B-L $\beta$  - Galinhas Caipiras - Variabilidade Genética – MHC



## ABSTRACT

PALUDO, Ediane. **STUDY OF THE VARIABILITY OF MHC GENES B-L $\beta$  Chicken (*Gallus gallus domesticus*) BIRDS IN BRAZILIAN CAIPIRA**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, SC, 2011.

The Brazilian caipira chickens egg blue are the result of random mating between different chicken breeds found in Brazil with chickens Araucanía, giving rise to a Brazilian caipira chicken with characteristic blue eggs. It stands out for its hardiness, disease resistance and adverse weather conditions and diet. The disease resistance is related to genetic variability of immune system genes. The immune response of chickens to pathogens is triggered from the presentation of antigens of the effect or cells of the immune system. This action is made by antigen-presenting cells (B cells, macrophages and a small percentage of T cells) animals that have surface molecules (glycoprotein) in which these antigens are complexes. These glycoproteins presenting antigens, molecules called Major Histocompatibility Complex (MHC or B complex) can be class I or class II. The class II, which present exogenous antigens, are composed of two polypeptide chains, an  $\alpha$  chain and a  $\beta$  chain. The chain is monomorphic  $\alpha$  chain and  $\beta$  is very polymorphic and is considered responsible for encoding different MHC class II molecules in chickens. This study aimed to investigate the genetic variability of two gene loci of the MHC class II, B-L $\beta$ I and B-L $\beta$ II in caipiras chickens Brazilian blue eggs by obtaining sequences of these two genes and thus detect B-L $\beta$  existing alleles for these genes in these birds. This work was initially developed with DNA samples from 100 caipiras chickens blue eggs that were amplified for the region of interest and analyzed. From this analysis, the animals were grouped according to the sequence of exon2. Then, 16 animals were selected (with at least one representative from each group) for the reaction of DNA amplification, cloning and sequencing. The samples were submitted to the initiators of the genes B-L $\beta$ I and B-L $\beta$ II. Of these 16 birds were obtained 15 different sequences that were aligned to the standard sequence the B-LB12major (AJ248576) for B-L $\beta$ II and B-LB12c (AJ248578) to B-L $\beta$ I, being eleven sequences B-L $\beta$ II and B-L $\beta$ I four sequences. Of these eleven sequences of the gene B-L $\beta$ II seven were already described in the literature and four sequences are "new" is not described, the other four sequences of the gene

B-L $\beta$ I three had already been described in the literature and a "new". The 15 nucleotide sequences were transformed into sequences of amino acids. In the amino acid sequences of the gene was observed that B-L $\beta$ I remains much more conserved than the gene B-L $\beta$ II. Thus, this paper presents the genetic variability at both the DNA and polypeptide chain, genes B-L $\beta$ I and B-L $\beta$ II caipira chickens in Brazil's blue eggs.

**Key words:** B-L $\beta$  Genes - Caipira Chicken - Genetic Variability - MHC

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Pintos caipiras .....	15
<b>Figura 2:</b> Galinhas caipiras.....	15
<b>Figura 3:</b> Ovos azuis.....	15
<b>Figura 4:</b> MHC da galinha e as regiões genômicas contendo genes relacionados.....	19

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
1.1 GALINHAS CAPIRAS.....	13
1.2 RESISTÊNCIA GENÉTICA A DOENÇAS EM GALINHAS.....	15
1.3 COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	16
1.4 MHC DA GALINHA.....	17
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	20
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>21</b>
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>42</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 GALINHAS CAIPIRAS

Acredita-se que a domesticação da galinha Vermelha do Mato ou *Red Jungle Fowl* (*Gallus gallus gallus*) originou a galinha doméstica moderna (*Gallus gallus domesticus*). A galinha Vermelha do Mato, originária do Sudoeste da Ásia, aonde ainda é encontrada livre nas florestas, é classificada por alguns taxonomistas como *Gallus bankiva*, e é considerada a ancestral das aves comerciais de hoje (CRAWFORD, 1990; LANA, 2000; MORENG e AVENS, 1990).

No Brasil, segundo Albino et al. (2001), as galinhas foram introduzidas pelos primeiros navegadores que aqui desembarcaram, por volta de 1500. Eles trouxeram raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, que foram deixadas em liberdade nos quintais das casas, sítios e fazendas. Esta liberdade propiciou a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre elas, surgindo, desta mistura de raças, as chamadas galinhas caipiras (do tupi-guarani: "habitante do campo"; figura 1 e 2). Este "tipo" de galinha caracteriza-se pela sua rusticidade, com maior resistência a doenças e as condições adversas de clima, temperatura e alimentação, mas também pela sua baixa produtividade, principalmente quando comparadas às galinhas industriais modernas, que são oriundas de seleções genéticas restritas, onde tudo é rigorosamente controlado (ALBINO et al., 2001; MORENG e AVENS, 1990). Em termos de consumo humano, estas aves caipiras são consideradas mais saudáveis, por serem criadas de maneira mais natural, e não serem dependentes de antibióticos ou antiestressantes (CERRI, 1992; RAMOS, 1995).

Com o passar do tempo, e com a regionalização, tais cruzamentos aleatórios propiciaram a formação de grupos diferenciados com características distintas. Este é o caso de um grupo de aves comum na região sul do país, as galinhas caipiras de ovos azuis, que possuem a cor da casca do ovo variando do azul-turquesa ao verde (figura 3). Esta característica é proveniente de uma raça sul-americana de galinhas chamadas Araucanas. Esta raça expandiu-se pelo Brasil por volta de 1880, oriundas do Noroeste do Chile, da região de Arauca, e misturou-se com as galinhas caipiras da região sul originando as galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. A origem desta raça sul americana ainda é incerta, entretanto há

fortes evidências de que seja pré-colombiana, ou seja, quando Colombo, Cabral e os demais “descobridores” das Américas chegaram aqui, estas já eram bastante difundidas entre os índios, em particular entre os sul-americanos (CRAWFORD, 1990).

Em relação à origem da maior resistência das aves caipiras, isto ainda é uma incógnita; no entanto, acredita-se que deva ser decorrente da presença de alelos de genes relacionados à resistência provenientes dos seus ancestrais caipiras (ALBINO et al., 2001). Podemos supor que o sistema de criação silvestre ao qual as galinhas caipiras foram submetidas, sendo criadas livres, sem a devida proteção (vacinas) contra doenças e fora de abrigos adequados, deva ter propiciado o aparecimento de novas combinações alélicas, geradas pela mistura de raças e/ou por novos alelos surgidos por mutações e conservados por seleção natural. Se algum destes alelos ou combinações alélicas conferiu aumento na resistência a doenças, esse foi selecionado, se perpetuando e aumentando sua frequência nas gerações seguintes. Sendo assim, estes organismos são especialmente importantes na busca de um esclarecimento para esta questão.

Devido à baixa produtividade das galinhas caipiras, a partir de 1930 elas foram sendo substituídas por aves mais produtivas, as quais foram sendo selecionadas em linhagens especializadas para a produção de carne (corte), ovos (postura) ou mista (dupla aptidão). A partir disso, a avicultura industrial estabeleceu-se definitivamente no país (MORENG e AVENS, 1990; GOMES e ALBINO, 1998). Na presença de aves altamente produtivas, as galinhas caipiras não tiveram mais espaço e foram preservadas apenas porque permaneceram esquecidas nos terreiros do interior (CERRI, 1992).

Nos anos 1980, foi surgindo pouco a pouco, um mercado para os produtos naturais, o que fez com que as galinhas caipiras ressurgissem como alternativa de grande valor comercial. Estabelece-se assim, a avicultura alternativa nacional, em que a meta é obter uma ave mais rústica e saudável independente de antibióticos e antiestressantes e com carne mais consistente, firme e saborosa, assim como ovos também mais saborosos (CERRI, 1992; RAMOS, 1995).



**Figura 1.** Pintos caipiras.



**Figura 2.** Galinhas caipiras.



**Figura 3.** Ovos azuis (figura extraída do site [http://www.sulave.com.br/azuis\\_000.htm](http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm)).

## 1.2 RESISTÊNCIA GENÉTICA A DOENÇAS EM GALINHAS

Os genes do complexo B (MHC da galinha) exercem o controle principal da resistência hospedeira a doenças autoimunes, víricas, bacterianas e parasitárias (LAMONT, 1989; LAMONT, 1998). Tal resistência tanto pode ser individual quanto de grupo, como raças ou linhagens, sendo estas últimas definidas como subdivisões de uma raça (MORENG e AVENS, 1990). A resistência pode variar tanto de indivíduo para indivíduo, ou de linhagem para linhagem quanto de patógeno para patógeno no mesmo indivíduo. Postula-se que estas variações estão fortemente associadas aos diferentes alelos encontrados para estes genes no genoma das aves (BACON, 1987).

Os avanços genéticos encontrados para estes animais são frutos dos programas de melhoramento genético, os quais selecionam animais com parâmetros zootécnicos de

produção sucessivamente melhores (GRUBER, 1999; SCHMIDT e LEDUR, 1999). Entretanto, em termos de seleção de aves visando o aumento da resistência a doenças, pouco ou nada tem sido feito. Segundo Gruber (1999), o fato de não se conhecer perfeitamente os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a doenças pode ter contribuído indiretamente para a seleção de linhagens mais susceptíveis a elas.

Há muito se sabe que quanto maior for o polimorfismo genético de uma população para um determinado gene envolvido na resposta imunológica a um agente infeccioso, maior será a chance de alguns indivíduos da população sobreviverem a ele. Paradoxalmente, os processos seletivos que visam parâmetros produtivos como, por exemplo, desenvolvimento precoce ou produção de ovos, geralmente tornam as linhagens muito uniformes, diminuindo, assim, a variabilidade genética populacional. Recentemente a avicultura nacional voltou-se para o resgate desta diversidade genética e uma série de linhagens mais rústicas, as chamadas linhagens caipiras, que misturam a rusticidade das aves caipiras com a produtividade das comerciais, têm sido desenvolvidas por diversas empresas privadas ou órgãos públicos. O objetivo é produzir aves mais resistentes que possam ser criadas em sistemas extensivos ou de semi-confinamento.

### 1.3 COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE

A região gênica do genoma dos animais responsável pela resistência/suscetibilidade genética à doenças foi inicialmente identificada como o alvo para rejeição de enxertos entre indivíduos, e por isso foi nomeada como Complexo Maior de Histocompatibilidade (ACTOR, 2007). Quando órgãos são transplantados entre um doador e um receptor com diferenças nos *loci* do Complexo Maior de Histocompatibilidade a rejeição do enxerto é imediata. O Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) é uma região gênica composta de uma sequência de genes que codificam as moléculas do MHC, as quais são glicoproteínas dispostas na superfície das células e que desempenham papel fundamental nas interações entre as células do sistema imune (ABBAS et al., 2000; ACTOR, 2007). A função principal da maioria destas moléculas é a apresentação dos fragmentos de proteínas antigênicas (epitopos) às células efetoras do sistema imune, a partir da qual toda cadeia da resposta imune se desenvolve (ABBAS et al., 2000).

Todos os vertebrados possuem genes do MHC, que se apresentam no genoma como um grupo em desequilíbrio de ligação. Estes genes são altamente polimórficos variando muito entre os indivíduos, fazendo com que cada indivíduo tenha uma eficiência particular variável



na apresentação de diferentes peptídeos. Assim, a resposta imunológica do hospedeiro depende particularmente do seu MHC (FRANK, 2002).

Nos mamíferos o MHC contém três classes gênicas: I, II e III. Os genes de classe I codificam moléculas (glicoproteínas) que são responsáveis pela apresentação de antígenos endógenos, os de classe II, glicoproteínas que apresentam antígenos exógenos e os de classe III que codificam algumas moléculas que fazem parte do sistema complemento, tais como C2, C4 e *Bf*, além de outras que não estão envolvidas no sistema imune (TROWSDALE, 1995; ABBAS et al., 2000; ACTOR, 2007).

Os genes de MHC classe I são encontrados ativos em todas as células nucleadas e codificam moléculas que participam na apresentação de antígenos endógenos aos linfócitos citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Os genes de MHC classe II são encontrados ativos apenas nas células apresentadoras de antígenos (células B, macrófagos e uma pequena porcentagem de células T) e codificam moléculas que participam na apresentação de antígenos dos macrófagos aos linfócitos CD4<sup>+</sup> (células auxiliaadoras) (LAMONT, 1989; ACTOR, 2007). As moléculas codificadas pelos genes do MHC classe III podem estar presentes na circulação sanguínea ou em outros fluidos biológicos, sob a forma solúvel, ou ligadas à superfície de certas células (SCROFERNEKER e POHLMANN, 1998).

As glicoproteínas de classe I são formadas por uma cadeia pesada  $\alpha$  e uma cadeia leve  $\beta$ , e as de classe II possuem uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$  de tamanho semelhante (BACON e DIETERT, 1991; ABBAS et al., 2000). O peptídeo é complexado às moléculas de MHC em uma fenda que é formada apenas pela cadeia  $\alpha$  nas moléculas de classe I e por ambas as cadeias nas moléculas de classe II (ABBAS et al., 2000).

#### 1.4 MHC DA GALINHA

As galinhas apresentam oito pares de cromossomos grandes, os macrocromossomos, 30 pares de cromossomos pequenos e dificilmente distinguíveis, os microcromossomos, e os cromossomos sexuais Z e W, totalizando um conteúdo diplóide de 78 (BURT et al., 1995; SMITH e BURT, 1998). O MHC das galinhas é menor e mais simples, comparado com o MHC dos mamíferos, e está localizado no microcromossomo 16. Foi denominado de Complexo B, e é organizado em dois grupos de genes independentes e polimórficos, chamados de *locus B* e *locus Y* (BRILES et al., 1950; BRILES et al., 1993).

Quatro classes gênicas são identificadas no *locus B*: os genes B-F $\alpha$ , os quais codificam moléculas homólogas às de classe I- $\alpha$  de mamíferos; os genes B-L $\alpha$  e B-L $\beta$ , codificadores das

moléculas homólogas II- $\alpha$  e II- $\beta$  de mamíferos, respectivamente; o gene componente do sistema complemento C4, único gene de classe III identificado até o momento em galinhas; e os genes B-G, que codificam as moléculas altamente polimórficas de classe IV e que, aparentemente, não estão presentes nos mamíferos (SIMONSEN et al., 1982; KAUFMAN et al., 1999). No *locus* Y são identificadas duas classes gênicas: os genes Y-F $\alpha$  e Y-L $\beta$ , que codificam moléculas de classe I- $\alpha$  e II- $\beta$ , respectivamente (MILLER et al., 1996; KAUFMAN et al., 1999).

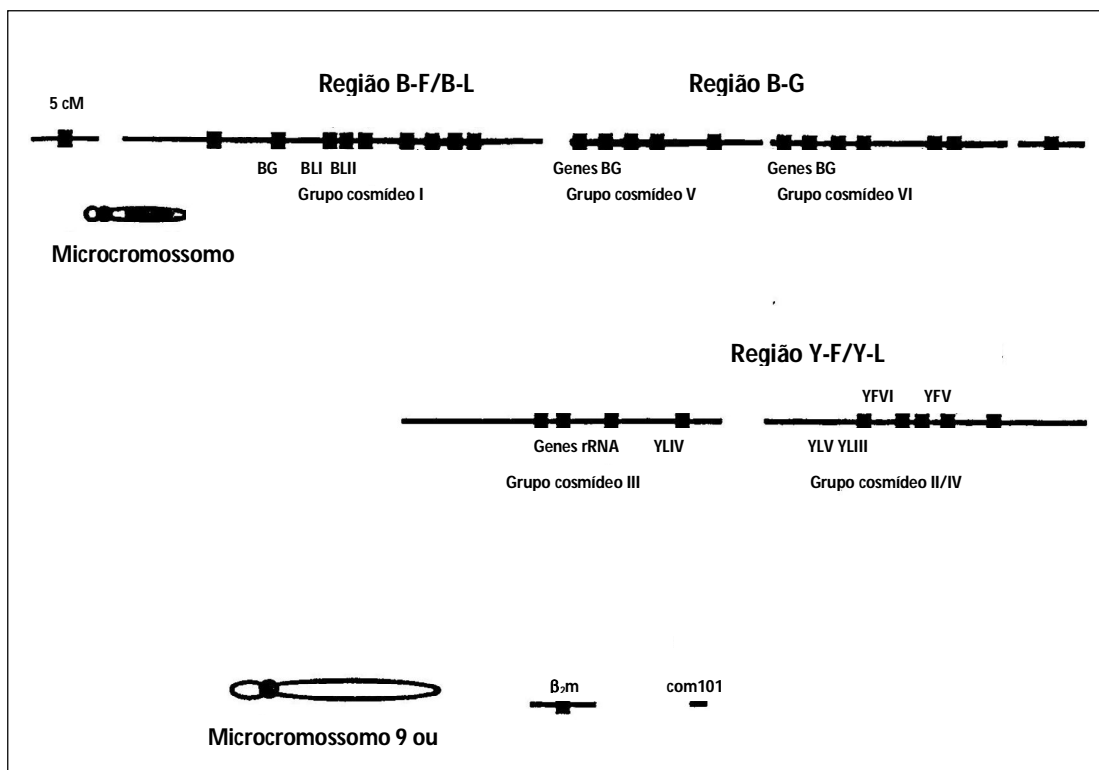
O complexo B em galinhas foi clonado em cinco grupos de cosmídeos (Figura 4; GUILLEMONT et al., 1988, 1989; KAUFMAN et al., 1991). Nestes clones foram identificados quatro genes de classe I para a cadeia  $\alpha$  (dois B-F $\alpha$  e dois Y-F $\alpha$ ), um gene de classe II para a cadeia  $\alpha$  (B-L $\alpha$ ), cinco genes classe II para a cadeia  $\beta$  (dois B-L $\beta$  e três Y-L $\beta$ ) e vários genes B-G (KAUFMAN e WALLNY, 1996). Os genes de classe II- $\beta$ , localizados no *locus* B, são denominados de B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II, e os localizados no *locus* Y, de Y-L $\beta$ III, Y-L $\beta$ IV e Y-F $\beta$ V (MILLER et al., 1996; KAUFMAN e SALOMONSEN, 1997).

Assim como em mamíferos, nas galinhas duas cadeias polipeptídicas compõem as moléculas do MHC de classe II: uma cadeia  $\alpha$  (produto do gene B-L $\alpha$ ) e uma cadeia  $\beta$  (produto de um dos genes B-L $\beta$  ou Y-L $\beta$ ), ambas as cadeias são de tamanhos semelhantes (ZOROBB et al., 1990; BACON e DIETERT, 1991; KAUFMAN e WALLNY, 1996). Os domínios  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1 formam a fenda apresentadora de antígenos, estes domínios são codificados, respectivamente, pelo exon 2 do gene B-L $\alpha$  e pelo exon 2 de um dos genes de classe II.

O gene B-L $\alpha$  não é polimórfico, mas os genes da cadeia  $\beta$ , especialmente nos nucleotídeos que codificam a região de ligação do peptídeo, são bem polimórficos (JACOB, et al., 2000). Os genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II, dentre os cinco genes desta classe presentes no complexo B, são os de principal expressão, os outros três, os Y-L $\beta$ , apresentam baixa ou nenhuma expressão (ZOROBB et al., 1993; KAUFMAN e SALOMONSEN, 1997; PHARR et al., 1998). Logo, os genes B-L $\beta$ , juntamente com o gene B-L $\alpha$ , são os responsáveis, ou pelo menos os principais responsáveis, pela apresentação dos diferentes patógenos exógenos (parasitas e bactérias extracelulares) às células efectoras do sistema imune das galinhas, conseqüentemente, pelo desencadeamento da resposta imune a esses agentes nestes organismos (TROWSDALE, 1995; KAUFMAN e WALLNY, 1996). E, como nestas aves o gene B-L $\alpha$  é monomórfico, as diferenças apresentadas pelas moléculas de classe II, as quais

são responsáveis pela variação na resposta imunológica, são devido aos diferentes alelos dos genes B-L $\beta$  presentes no seu genoma.

Análises quanto ao polimorfismo dos *locus* (B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II) em galinhas têm sido feitas basicamente em aves industriais (ZOO ROB et al., 1990; PHARR et al., 1993; ZOO ROB et al., 1993; LI et al., 1997 e 1999; JUUL-MADSEN et al., 2000; LIVANT et al., 2001). No entanto, em galinhas não comerciais pouco tem sido investigado. Xu et al. (2007) e Guo et al. (*in press*) detectaram diferentes sequências dos genes B-L $\beta$  em galinhas caipiras chinesas. Worley et al. (2008) relataram o polimorfismo destes genes nas galinhas Vermelhas do Mato, as ancestrais selvagens das galinhas domésticas. Todos estes trabalhos resultaram na descrição de 96 alelos até o momento detectados para os dois genes B-L $\beta$ , sendo 14 alelos para o gene B-L $\beta$ I e 82 alelos para o gene B-L $\beta$ II. Investigações nestes genes ainda não foram realizadas em galinhas caipiras brasileiras. Até o momento foi realizado um trabalho analisando a mesma amostra de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis nos genes B-FI e B-FIV (MHC classe I) por Lima-Rosa et al. (2004).



**Figura 4.** MHC da galinha e as regiões genômicas contendo genes relacionados (figura extraída de Kaufman et al., 1995 e modificada de acordo com Miller et al., 1996).

## CAPÍTULO II

### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a variabilidade genética em dois *loci* gênicos do MHC de classe II, B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II, em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis através da obtenção das sequências destes dois genes B-L $\beta$  e assim detectar os alelos existentes para estes genes nestas aves.

#### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Obter os alelos dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II presentes na população de galinhas caipiras analisada;

Comparar os alelos encontrados com os já descritos na literatura para as galinhas;

Deduzir as sequências de aminoácidos dos alelos dos genes B-L $\beta$  encontrados.

## **CAPÍTULO III**

### **3 ARTIGO**

#### **“POLIMORFISMO DOS GENES B-L $\beta$ DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS DE OVOS AZUIS”**

**Ediane Paludo<sup>1</sup>, Fábio Pertille<sup>1</sup>, Filipe Antônio Dalla Costa<sup>1</sup>, Marcos Edgar Herkenhoff<sup>1</sup>, Jaqueline Battilana<sup>1</sup>, Carlos André da Veiga Lima-Rosa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Análises Genéticas da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (IMEGEM), Lages, SC.

Manuscrito a ser submetido à Revista Brasileira de Genética

---

Carlos André da Veiga Lima Rosa, Departamento de Genética, UDESC/CAV, Avenida Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, CEP: 88.520-000, Lages, SC.

E-mail: [a2ca@cav.udesc.br](mailto:a2ca@cav.udesc.br)

## **“POLIMORFISMO DOS GENES B-L $\beta$ DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS DE OVOS AZUIS”**

**Ediane Paludo<sup>1</sup>, Fábio Pertille<sup>1</sup>, Filipe Antônio Dalla Costa<sup>1</sup>, Marcos Edgar Herkenhoff<sup>1</sup>, Jaqueline Battilana<sup>1</sup>, Carlos André da Veiga Lima-Rosa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Análises Genéticas da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (IMEGEM), Lages, SC.

### **RESUMO**

Este trabalho teve por finalidade investigar a variabilidade dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Nenhuma investigação quanto ao polimorfismo destes genes foi realizada até o momento em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. O trabalho analisou o DNA de 100 galinhas caipira de ovos azuis provenientes da cidade de Dois Lajeados-RS. As amostras de DNA dos 100 animais foram amplificadas e analisadas. A partir desta análise, os animais foram agrupados de acordo com a sequência do exon 2. Depois, 16 animais foram selecionados (com pelo menos um representante de cada grupo) para a reação de amplificação do DNA, clonagem e sequenciamento. As amostras foram submetidas aos iniciadores dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II. Destas 16 aves obteve-se 15 diferentes sequências, sendo onze sequências B-L $\beta$ II e quatro sequências B-L $\beta$ I. Destas onze sequências do B-L $\beta$ II sete já são descritas na literatura e quatro são sequências “novas”. Das outras quatro sequências, as do gene B-L $\beta$ I, três já são descritas na literatura e uma ainda não, (“nova”). Assim, esta análise foi essencial para possibilitar um melhor conhecimento sobre a variação genética existente em galinhas para estes locos relacionados à imunidade aos microorganismos exógenos, possibilitando, no futuro, o incremento da imunidade dessas aves nos programas de melhoramentos genéticos.

**PALAVRA-CHAVE:** Genes B-L $\beta$  - Galinhas Caipiras - Variabilidade Genética – MHC

## **POLIMORFISM OF THE B-L $\beta$ GENES OF THE BRAZILIAN (BLUE-EGG CAIPIRA) CHICKEN**

### **ABSTRACT**

This study aimed to investigate the variability of genes B-L $\beta$ I and B-L $\beta$ II in caipiras chickens Brazilian egg blue. No investigation into the polymorphism of these genes was carried out to date in Brazilian caipiras chickens egg blue. The study analyzed DNA from 100 blue eggs caipiras chickens from the city of Dois Lajeados-RS. DNA samples of 100 animals were amplified and analyzed. From this analysis, the animals were grouped according to the sequence of exon 2. Then, 16 animals were selected (with at least one representative from each group) for the reaction of DNA amplification, cloning and sequencing. The samples were submitted to the primers of the genes B-L $\beta$ I and B-L $\beta$ II. Of these 16 birds were obtained 15 different sequences, with eleven-sequences B-L $\beta$ II and four sequences B-L $\beta$ I. Of these eleven sequences of seven B-L $\beta$ II are already described in the literature and four sequences are "new", the other four sequences, the gene B-L $\beta$ I, three are already described in the literature and have not ("new"). Thus, this analysis was essential to enable a better understanding of existing variation for these loci in chickens related to immunity to exogenous microorganisms, allowing in the future, and increasing immunity of the birds inbreeding programs.

**Key words:** B-L $\beta$  Genes - Caipira Chicken - Genetic Variability - MHC

## INTRODUÇÃO

A resposta imune das galinhas a patógenos exógenos é desencadeada a partir da apresentação de antígenos destes às células efetoras do sistema imune. Esta ação é feita pelas células apresentadoras de antígenos (células B, macrófagos e uma pequena porcentagem de células T) destes animais que possuem moléculas de superfície chamadas glicoproteínas na qual são complexados estes antígenos (ABBAS et al., 2000). Estas glicoproteínas, chamadas de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC ou Complexo B) de classe II, são formadas por duas cadeias polipeptídicas, uma  $\alpha$  e uma  $\beta$  (BRILES et al., 1950; ABBAS et al., 2000). O Complexo B é organizado em dois grupos de genes independentes e polimórficos, chamados de *locus* B e *locus* Y (BRILES et al., 1950; BRILES et al., 1993). A cadeia  $\alpha$  é codificada pelo gene B-La, que está presente em uma única cópia no genoma das galinhas, localizado no *locus* B e é monomórfico (SIMONSEN et al., 1982; KAUFMAN et al., 1999). Para a cadeia  $\beta$  existem cinco genes existentes no genoma destas aves capaz de codificar este polipeptídeo. No *locus* B, estão localizados dois genes para a cadeia  $\beta$ , o B-L $\beta$ I e o B-L $\beta$ II, e no *locus* Y, o Y-L $\beta$ III, o Y-L $\beta$ IV e o Y-F $\beta$ V (BRILES et al., 1993; MILLER et al., 1996; KAUFMAN e SALOMONSEN, 1997). Os genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II são os de principal expressão, os outros três (Y-L $\beta$ III, Y-L $\beta$ IV e Y-L $\beta$ V), apresentam baixa ou nenhuma expressão (ZOOROB et al., 1993; KAUFMAN e SALOMONSEN, 1997; PHARR et al., 1998). Assim, as moléculas de classe II das galinhas são codificadas pelo gene B-La, e por um dos genes B-L $\beta$ . Dado que nestas aves o gene B-La é monomórfico, as diferenças apresentadas pelas moléculas de classe II, as quais são responsáveis pela variação na resposta imunológica, são devido aos diferentes alelos dos genes B-L $\beta$  presentes no seu genoma. Noventa e seis alelos para os genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II já foram descritos até o momento (ZOOROB et al., 1990; PHARR et al., 1993; ZOOROB et al., 1993; LI et al., 1997 e 1999; JUUL-MADSEN et al., 2000; LIVANT et al., 2001; XU et al., 2007; WORLEY et al., 2008; GUO et al., *in press*).

Galinhas caipiras são o resultado de cruzamentos aleatórios entre diversas raças de galinhas introduzidas no Brasil no início da sua colonização com galinhas araucanas. Caracterizam-se pela sua alta variabilidade genética, baixa produtividade e grande rusticidade, com maior resistência a doenças e a condições adversas de clima, temperatura e alimentação (ALBINO et al., 2001; MORENG e AVENS, 1990). Por não terem sofrido processos de



seleção artificial, apresentam um polimorfismo gênico maior que as modernas galinhas comerciais, as quais são frutos de severos programas de melhoramento genético (GRUBER, 1999; SCHMIDT e LEDUR, 1999). Esta alta variabilidade genética das caipiras já foi comprovada para locos de genes do sistema imune das galinhas por Lima-Rosa et al. (2004), ao analisarem os dois genes B-F de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Vinte e três alelos foram obtidos em uma amostra de 100 aves, dez dos quais ainda não descritos em aves comerciais. Se há esta grande variação alélica para os genes B-F na amostra analisada por Lima-Rosa et al. (2004), podemos esperar que uma variação semelhante deva estar presente para outros genes relacionados ao sistema imune das galinhas, como os genes B-L $\beta$ , nas aves caipiras brasileiras.

Este trabalho teve por finalidade investigar a variabilidade dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Nenhuma investigação quanto ao polimorfismo destes genes foi realizada até o momento neste tipo de galinhas. Logo, esta análise é essencial para possibilitar um melhor conhecimento sobre a variação existente em galinhas para estes locos relacionados a imunidade aos microorganismos exógenos, possibilitando, no futuro, o incremento desta imunidade nessas aves.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Galinhas

No presente trabalho foi utilizado o sangue periférico de 100 amostras de aves caipiras brasileiras de ovos azuis, conservadas em -20°C com anticoagulante EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid). Esta amostra é proveniente da região rural do município de Dois Lageados (RS). O sangue destas aves foi coletado no ano de 2000, e a extração do DNA ocorreu no mesmo ano, pois esta amostra foi utilizada em projetos anteriores a este. A coleta ocorreu a partir da eclosão de ovos azuis embrionários e quando eclodidos os pintainhos foram mantidos em cativeiros até a coleta do material.

### Extração e amplificação do DNA

O DNA genômico foi isolado do sangue periférico através do protocolo estabelecido por Sambrook et al. (1989). A amplificação dos fragmentos desejados foi realizada pela

técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) conforme descrita por Li et al. (1997) a partir do DNA isolado. Os iniciadores utilizados foram: 5'-CGTTCTTCTTCTRCGGTRBGAT-3' (senso; iniciador 1) e 5'-GTCCTYTGACCGTGAAGG-3' (anti-senso; iniciador 3), conforme descritos por Li et al. (1997), e 5'-GTGCCCCGACGCGTTCTTC-3' (senso; iniciador 2) conforme descrito por Goto et al. (2002), e correspondem a uma região do início do exon 2 (iniciador 1), final do intron 2 e início do exon 2 (iniciador 2) e a uma sequência do final do exon 2 (iniciador 3). O resultado da amplificação é um fragmento de 267 pares de bases (bp) para o fragmento amplificado pelos iniciadores 1 e 3, e um fragmento de 277 pares de bases para o fragmento amplificado pelos iniciadores 2 e 3.

A mistura dos reagentes para o PCR contém: 100 ng de DNA, 2,5 µl de tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8,3, 500 mM KCL, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µl de PCR X Enhancer System, 2 µl de mistura de dNTPs (1,25 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados), 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq*DNA polimerase Platinum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); e completado com água para obter um volume final de 25 µl. A amplificação consiste em 2 minutos de desnaturação inicial à 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 5 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação total foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. Foi realizado um corte no gel para a retirada do pedaço do gel contendo a amplificação esperada (~200-300 mg), com a utilização de um bisturi, e foi extraído o DNA amplificado do gel utilizando o *kit HiYield<sup>TM</sup> Gel/PCR DNA Extraction* (Real Biotech Genomics).

#### Clonagem e sequenciamento do DNA amplificado

O fragmento de DNA amplificado retirado do gel foi clonado utilizando-se o *kit Topo TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen Life Technologies). Depois da inserção do fragmento no plasmídeo e deste na célula bacteriana, as células com o inserto foram semeadas em meio de cultura sólido Agar BL (Lennox L Agar) contendo antibiótico ampicilina para selecionar o crescimento somente de células com plasmídeo, e deixadas para crescer por aproximadamente 12 horas. Em seguida, foram selecionadas as colônias desejadas e colocadas em meio líquido BL Broth Base (Lennox L Broth Base) contendo antibiótico ampicilina (50 µg/ml). As bactérias crescidas em meio líquido foram centrifugadas e purificadas com o *kit PureLink<sup>TM</sup> Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen Life Technologies).

Em seguida foi feita a reação de PCR com as amostras dos plasmídios purificados. A mistura dos reagentes para o PCR continha: aproximadamente 100 ng de DNA amplificado, 2,5 µl de tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8,3, 500 mM KCL, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl de mistura de dNTP's (1,25 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,2 µM de cada iniciador (os mesmos utilizados na amplificação inicial), 1 U de Platinum *Taq*DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e completado com água para obter um volume final de 25 µl. A amplificação consiste em 2 minutos de desnaturação inicial à 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas de modificação SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – Fermentas Life Sciences) e EXO I (Exonuclease I – Fermentas Life Sciences), usando 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos para retirada dos iniciadores não utilizados e dos oligonucleotídeos marcados com fluoróforos indesejáveis para o sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no analisador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems Life Technologies) com a utilização do *kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.1* (Perkin Elmer Applied Biosystems), que consiste na marcação com terminadores fluorescentes. Já na análise dos dados, as seqüências obtidas foram corrigidas manualmente através do programa Chromas 1.45 (HUEY e MORRIS, 2008) e alinhadas pelo programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas já descritas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

#### Comparação de aminoácidos

As seqüências de aminoácidos foram obtidas a partir do programa Mega 5 (KUMAR et al. 2001). O alinhamento usou como padrão BLB1\*12 (B-LB12major; acesso no GenBank nº AJ248576) e BLB2\*12 (B-LB12c; acesso no GenBank nº AJ248578) descritos por Jacob et al. (2000).

#### Denominação Alélica

O sistema usado para aplicar a nomenclatura alélica nas seqüências foi uma sigla para o nome do *locus* (BLB) e uma sigla para Galinha Caipira (CC), em seguida há um número

correspondente a cada um dos *loci* B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II (por exemplo BLB\*CC1a ou BLB\*CC1b, respectivamente).

## RESULTADOS

### Sequências Nucleotídicas

Inicialmente, amostras de DNA de 100 galinhas caipiras de ovos azuis foram amplificadas para a região de interesse e analisadas. A partir desta análise, os animais foram agrupados de acordo com a sequência do exon 2. Depois, 16 animais foram selecionados (com pelo menos um representante de cada grupo) para a reação de amplificação do DNA, clonagem e sequenciamento. As amostras foram submetidas aos iniciadores dos genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II. Para cada sequência nucleotídica (alelo) dos genes B-L $\beta$  encontrada, três clones de no mínimo dois animais diferentes foram sequenciados, totalizando, para cada alelo, seis sequências de clones diferentes. Destas 16 aves obteve-se 15 diferentes sequências, sendo onze sequências B-L $\beta$ II e quatro sequências B-L $\beta$ I (respectivamente figuras 1 e 2).

Comparando as 15 amostras obtidas do B-L $\beta$  com a literatura, pode-se observar que dez já estão descritas no NCBI (National Center for Biotechnology Information). As outras cinco sequências são inéditas ou “novas”, ou seja, ainda não descritas na literatura nem incluídas no banco de dados do NCBI. As dez sequências já descritas no banco de dados possuem os seguintes acessos: AF099115, AB426150, AY228553, M87655, GGU76305, EU579528, AY744361, AJ248586, AJ248575 e AF539401 (Tabela 1).

Das onze sequências amplificadas do B-L $\beta$ II, sete corresponderam a sequências descritas na literatura e quatro a sequências “novas”. Entre as quatro sequências encontradas do B-L $\beta$ I, três já haviam sido descritas, mas uma delas ainda não, sendo então considerada “nova”.

Ao comparar as “novas” sequências com aquelas já descritas (dados não mostrados), foi observado que a sequência BLB\*CC9b alinhou com a sequência do acesso DQ008585 e apresentou nove diferenças pontuais desta; a sequência B-LB\*CC3a alinhou com a sequência HQ218318, com sete diferenças pontuais; a sequência B-LB\*CC10b alinhou com a sequência AB426150, com cinco diferenças pontuais; a sequência B-BL\*CC6b alinhou com a sequência AF099115, com quatro diferenças pontuais; a sequência B-LB\*CC11b alinhou com a sequência HQ203725, com duas diferenças pontuais.

As figuras 1 e 2 apresentam a comparação das sequências nucleotídicas encontradas neste trabalho com as sequências de dois alelos padrão, estando as diferenças identificadas por um símbolo (+) nas devidas posições. Para as sequências encontradas no presente trabalho referentes ao gene B-L $\beta$ II foi utilizada a sequência padrão B-LB12major (AJ248576), e as diferenças encontradas foram nas posições 11, 16, 17, 22-24, 33, 35, 39, 56, 60, 62, 63, 67, 69, 73, 75, 93-98, 113, 125, 126, 129, 132, 136, 139, 146, 151-156, 158, 159, 163, 164, 166, 175, 184, 185, 187, 192-197, 200, 204-207, 209, 214, 215, 217, 218, 238, 239, 241, 243 e 246. Para as do gene B-L $\beta$ I, a sequência padrão foi a B-LB12c (AJ248578), e as posições de diferenciações encontradas foram 24, 62, 68, 73, 75, 76, 83, 91, 95, 132 e 139.

### Sequências de aminoácidos

As 15 sequências nucleotídicas encontradas foram transformadas em sequências de aminoácidos. Na figura 3 pode-se observar as regiões com sítios de diferenciação nas posições 4, 6, 8, 11, 12, 19, 21, 23, 25, 32, 33, 38, 42, 46, 47, 49, 51-53, 55, 56, 59, 62, 63, 65-67, 69, 70, 72, 73, 80 e 81 dos aminoácidos gerados para o gene B-L $\beta$ II (utilizando como padrão de comparação a sequência BLB12c - AJ248576).

Na figura 4 pode ser observado as sequências de aminoácidos referentes ao gene B-L $\beta$ I. Por não ter apresentado muita variabilidade nucleotídica, a sequência se mantém bem mais conservada que as sequências de aminoácido do gene B-L $\beta$ II. Quando foram alinhadas à B-LB12c (AJ248578), observou-se similaridade entre as sequências, e somente a sequência BLB\*CC4a teve uma variação mais destacada (AJ248586) e se diferenciou da sequência padrão em seis pontos específicos: nas posições 21, 23, 25, 26, 28, 31 e 32. Na posição 28 todas as sequências encontradas se diferenciam da sequência padrão.

Em todas as sequências de aminoácidos obtidas observou-se a conservação de alguns sítios de ligação específicos: nas posições 14-18 (-NGTER-), sítio de ligação de carboidrato (CHO); e nas posições 10 e 74, a ponte dissulfeto (S-S).

## DISCUSSÃO

Os genes do MHC classe II de galinhas, assim como de outros animais, possuem uma grande variabilidade genética (MILLER et al., 2004). As galinhas caipiras brasileiras, por não terem sofrido processos de seleção artificial, apresentam uma variação gênica maior que aves comerciais (LIMA-ROSA et al., 2005). O presente trabalho corroborou com Miller et al.

(2004) e Lima-Rosa et al. (2005) encontrando 15 diferentes alelos para os genes B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II em uma amostra de 100 animais de uma mesma população de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Dos 15 alelos encontrados, onze são do gene B-L $\beta$  II (sete sequências já descritas na literatura e quatro “novas”) e quatro do gene B-L $\beta$ I (três sequências já descritas na literatura e uma sequência “nova”).

Resultado semelhante foi encontrado por Lima-Rosa et al. (2004) ao analisarem a mesma amostra de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis nos genes B-FI e B-FIV (MHC classe I). Foram analisados 100 animais resultando em 23 sequências do gene B-F, das quais 13 sequências foram descritas pelos autores.

Trabalhos recentes em aves não comerciais têm demonstrado polimorfismo semelhante. Xu et al. (2007) detectaram alta variabilidade genética para o gene B-L $\beta$ II em galinhas indígenas chinesas. Eles analisaram 467 amostras resultando na descrição de 31 sequências alélicas diferentes. Worley et al. (2008) identificaram novas sequências para os genes do MHC de ambas as classes (I: B-FI e B-FII; II: B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II) em galinhas vermelha do mato. A partir de 84 amostras foi encontrado nove sequências do gene B-F (três do B-FI e seis do B-FII) e dez sequências do gene B-L $\beta$  (quatro do B-L $\beta$ II, cinco do B-L $\beta$ I e uma indefinida). Gou et al. (*in press*) demonstraram alta variabilidade genética para o gene B-L $\beta$ II em galinhas domésticas de Hebei (China). Em 76 amostras obtiveram 82 alelos.

Os resultados dos trabalhos que tem analisado aves comerciais têm demonstrado um polimorfismo menor quando comparados aos resultados encontrados para aves não comerciais. Livant et al. (2001), por exemplo, identificaram apenas três novos haplótipos do gene B-L $\beta$ II em uma amostra de 200 frangos de corte.

Muitos trabalhos têm analisado os genes B-L $\beta$  e, até o momento, 96 alelos diferentes foram descritos (14 para o gene B-L $\beta$ I e 82 para o B-L $\beta$ II). Neste trabalho foi descrito sete sequências já conhecidas na literatura, correspondente a 8% dos alelos conhecidos do gene B-L $\beta$ II, além das quatro sequências “novas”. Para o B-L $\beta$ I, as três sequências já descritas encontradas no presente trabalho corresponderam a 21% das sequências da literatura, além de uma sequência “nova”. Assim, apesar de reduzido, o número das sequências do gene B-L $\beta$ I encontradas neste trabalho, em relação ao que está descrito na literatura, foi proporcionalmente maior comparado com as sequências do gene B-L $\beta$ II. O menor número de alelos presentes na literatura para o gene B-L $\beta$ I demonstra uma menor variabilidade genética deste em comparação com o B-L $\beta$ II.

Nas sequências do B-L $\beta$ II podemos observar que quando alinhadas a sequência padrão B-LB12major (AJ248576, figura 1) tem-se dez posições com duas variantes nas posições 132,

154, 194, 196, 204, 205, 209, 214, 215 e 243, nove com três variantes nas posições 11, 39, 62, 98, 146, 187, 200, 217 e 238, e três com quatro variantes nas posições 22, 94, e 158. Comparando com o trabalho de Xu et al., (2007) encontrou 32 posições com duas variantes, 17 com três variantes e duas com quatro variantes. Na amplificação do B-L $\beta$ I depois do alinhamento com a sequência padrão B-LB12c (AJ248578), tem-se duas posições com quatro variações nas posições 24 e 83, uma com duas variações na posição 132 e oito com uma variação nas posições 62, 68, 73, 75, 76, 83, 91, 95 e 139.

No alinhamento dos polipeptídeos gerados para o gene B-L $\beta$ II pode-se observar 33 posições de diferenciação das sequências encontradas no trabalho com a sequência padrão B-BLmajor: posições 4, 6, 8, 11, 12, 19, 21, 23, 25, 32, 33, 38, 42, 46, 47, 49, 51-53, 55, 56, 62, 63, 65-67, 69, 70, 72, 73, 80 e 81. Para o B-L $\beta$ I foi encontrado somente oito pontos de diferenciação: posições 21, 23, 25, 26, 28, 31 e 32, quando comparadas à fita padrão B-LB12c (AJ248578). Na posição 132 encontra-se uma diferenciação na sequência nucleotídica nas amostras B-LB\*CC2a e B-LB\*CC1a, mas não no polipeptídeo gerado (posição 44), pois o nucleotídeo C (citosina) que está na sequência padrão e o T (timina) que está nas sequências encontradas no trabalho codificam o aminoácido alanina, não tendo diferenciação entre as sequências de aminoácido.

Como em outros trabalhos, Xu et al. (2007), Worley et al. (2008), Lambourne et al. (2005) e Guo et al. (*in press*), neste trabalho também observou-se um conjunto de aminoácidos que se mantêm invariáveis nas posições 14-18 (-NGTER-), este corresponde ao sítio de ligação de carboidratos, o que torna este ponto fundamental para o funcionamento da molécula e, portanto, não apresenta variação. O mesmo ocorre com outro ponto crucial da molécula, as pontes dissulfeto (posições 10 e 74), igualmente conservadas.

Estes 15 alelos encontrados em uma amostra de 100 animais demonstram uma significativa variabilidade genética e confirmam, também para estes *locus*, a variação gênica já descrita por Lima-Rosa et al. (2004) para estas galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis, as quais podem ser utilizadas como fonte de alelos para programas de melhoramento genético de galinhas comerciais que visem aumentar a resistência a doenças.

**BIBLIOGRAFIA**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 4<sup>o</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2000.

ALBINO, L.F.T.; VARGAS, Jr. J.G.; SILVA, J.H.V. Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa. Viçosa, MG: Aprenda Fácil. 2001.

BRILES, W.E.; MCGIBBON, W.H; IRWIN, M.R. On multiple alleles affecting cellular antigens in chicken. Genetics. v. 35, p.633-652, 1950.

BRILES, W.E.; GOTO, R.M.; AUFRAY, C.; MILLER, M.M. A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. Immunogenet. v. 37, p. 408-414. 1993.

GOTO R.M.; AFANASSIEFF M.; HÁ J.; IGLESIAS G.M.; EWALD S.J.; BRILES W.E.; MILLER M.M. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. Poultry Science. v.81, p.1832-1841, 2002.

GRUBER, A. Mecanismos moleculares de resistência a doenças em aves. Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola, p. 119-132, 1999.

GUO, X.L.; ZHENG, H.Q.; LI, X.L.; LI, Y.; GU, Z.L.; ZHENG, C.S.; WEI, Z.H.; WANG, J.S.; ZHOU, R.Y.; LI, L.H. Genetic variation of major histocompatibility complex BLB2 gene exon 2 in Hebei domestic chicken. Research in Veterinary Science. *in press*.

HUEY, R.; MORRIS, G. M. Using AutoDock 4 with Auto Dock Tools: A Tutorial. California-Estados Unidos. 2008.

JUUL-MADSEN, H.R.; DALGAARD, T.S.; AFANASSIEFF, M. Molecular characterization of major and minor MHC class I and II genes in B<sup>21</sup>-like haplotypes in chickens. Animal Genetics, v. 31, p. 252-261, 2000.

KAUFMAN, J.; SALOMONSEN, J. The “Minimal Essential MHC” revisited: Both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. Hereditas, v. 127, p. 67-73, 1997.

KAUFMAN, J.; JACOB, J.; SHAW, I.; WALKER, B.; MILNE, S.; BECK, S.; SALOMONSEN, J. Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. Immunol Reviews, v. 167, p. 101-117, 1999.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega 2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatic, v.17, 2001.



LI, L.; JOHNSON, W.L.; EWALD, S.J. Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Animal Genetics*, v. 28, p. 258-267, 1997.

LI, L.; JOHNSON, W.L.; LIVANT, E.J.; EWALD, S.J. The MHC of broiler chicken line: serology, B-G genotypes, and B-F/B-L $\beta$  sequences. *Immunogenetics*, v. 49, p. 215-224, 1999.

LIMA-ROSA, C. A. V.; CANAL, C. W.; FALLAVENA, P. R. V.; FREITAS, L. B.; SALZANO, F. M. LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genetics and Molecular Biology*. v. 28, p. 386-398, 2005.

LIMA-ROSA, C.A.V.; CANAL, C.W.; STRECK, A.F.; FREITAS, L.B.; CAÑEDO, A.D.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. *Animal Genetics*. v. 35, p. 278-384, 2004.

LIVANT, E.J.; ZHENG D.; JOHNSON, W.L.; SHI W.; EWALD, S.J. Three new MHC haplotypes in broiler breeder chickens. *Animal Genetics*, v. 32, p. 123-131, 2001.

MILLER, M.M.; GOTO, R.; TAYLOR, Jr. R.L.; ZOOROB, R.; AUFRAY, C.; BRILES, R.W.; BRILES, W.E.; BLOOM, S.E. Assignment of *Rfp-Y* to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 93, p. 3958-3962, 1996.

MILLER, M.M.; BACON, L. D.; HALA, K.; HUNT, H. D.; EWALD, S. J.; KAUFMAN, J.; ZOOROB, R.; BRILES, W. E. 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (*B* and *Y*) complex. *Immunogenetics*, v. 56, p. 261-279, 2004.

MORENG, R.E.; AVENS, J.S. *Ciência e Produção de Aves*. São Paulo: Livraria Roca. 1990.

PHARR G.T.; DODGSON J.B.; HUNT H.D.; BACON L.D. Class II MHC cDNA 15I $_5$  B-congenic chickens. *Immunogenetics*, v. 47, p. 350-354, 1998.

PHARR, G.T.; HUNT, H.D.; BACON, L.D.; DODGSON, J.B. Identification of class II major histocompatibility complex polymorphism predicted to be important in peptide antigen presentation. *Poultry Science*, v. 72, p. 1312-1317, 1993.

PRUITT, K.D.; TATUSOVA, T.; KLIMKE, W.; MAGLOTT, D.R. NCBI Reference Sequences: current status, policy, and new initiatives. *Nucleic Acids Res*. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 15 de março de 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2<sup>o</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY :Cold Spring Harbor. 1989.

SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C. Interação da genética quantitativa e molecular no processo de seleção de aves. *Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola*, p. 133-144, 1999.

SIMONSEN, M.; CRONE, M.; KOCH, C.; HÁLA, K. The MHC haplotypes of chicken. *Immunogenetics*, v. 16, p. 513-532, 1982.

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

WORLEY, K.; GILLINGHAM, M.; JENSEN, P.; KENNEDY, L. J.; PIZZARI, T.; KAUFMAN, J.; RICHARDSON, D.S. Single locus typing of MHC class I and class II B loci in a population of red jungle fowl. *Immunogenetics*, v. 60, p. 233-247, 2008.

XU, R.; LI, C.; CHEN, C.; XU, H.; QIANG, B.; LI, C.; LIU, B. Characterization of genetic polymorphism of novel MHC B-LBII alleles in chinese indigenous chickens. *Journal of Genetics and Genomics*, v.34, p. 109-118, 2007.

ZOOROB, R.; BÉHAR, G.; KROEMER, G.; AUFFRAY, C. Organization of functional chicken class II B gene. *Immunogenetics*, v. 31, p. 179-187, 1990.

ZOOROB, R.; BERNOT, A.; RENOIR, D.M.; CHOUKRI, F.; AUFFRAY, C. Chicken major histocompatibility complex class II B genes: analysis of interallelic and interlocus sequence variance. *European Journal of Immunology*, v. 23, p. 1139-1145, 1993.

## ANEXOS

**Tabela 1:** Nome das sequências encontradas em aves caipiras brasileiras de ovos azuis e correspondentes da literatura. A sigla BLB corresponde ao *locus* (B-L $\beta$ ), o CC corresponde a Galinha Caipira (Chicken Caipira) e um número correspondente a cada um dos *loci* B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II (por exemplo BLB\*CC1a ou BLB\*CC1b, respectivamente).

Nome da Sequência	Acesso da Literatura
B-LB*CC 1b	M87655
B-LB*CC 2b	AY744361
B-LB*CC 3b	AF099115
B-LB*CC 4b	GGU76305
B-LB*CC 5b	EU579528
B-LB*CC 6b	“Nova”
B-LB*CC 7b	AY228553
B-LB*CC 8b	AB426150
B-LB*CC 9b	“Nova”
B-LB*CC 10b	“Nova”
B-LB*CC 11b	“Nova”
B-LB*CC 1a	AF539401
B-LB*CC 2a	AJ248575
B-LB*CC 3a	“Nova”
B-LB*CC 4a	AJ248586

**Figura 1.** Comparação das onze sequências nucleotídicas do gene B-L $\beta$ II de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis com a sequência padrão B-BL12major (AJ248576). Acima da sequência padrão é encontrado uma marcação (+), referente ao ponto de diferenciação entre as sequências encontradas e a padrão.

**Figura 2.** Comparação das quatro sequências nucleotídicas do gene B-L $\beta$ I de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis com a sequência padrão B-BL12c (AJ248578). Acima da sequência padrão é encontrado uma marcação (+), referente ao ponto de diferenciação entre as sequências encontradas e a padrão.

**Figura 3.** Comparação das onze sequências polipeptídicas obtidas a partir da transformação por simulação das sequências nucleotídicas descritas nesse trabalho com a sequência padrão B-BL12major (AJ248576) também transformada. Acima da sequência padrão é encontrado uma marcação (+), referente ao ponto de diferenciação entre as sequências encontradas e a padrão. Nas sequências de aminoácidos é observado a conservação de alguns sítios de ligação específicos: nas posições 14-18 (-NGTER-) com um retângulo ao redor da sequência, sítio de ligação do carboidrato (CHO); nas posições 10 e 74, a banda disulfeto (S-S) representado pelo símbolo =.

**Figura 4.** Comparação das quatro sequências polipeptídicas obtidas a partir da transformação por simulação das sequências nucleotídicas descritas nesse trabalho com a sequência padrão B-BL12c (AJ248578). Acima da sequência padrão é encontrado uma marcação (+), referente ao ponto de diferenciação entre as sequências encontradas e a padrão. Nas sequências de aminoácidos é observado a conservação de alguns sítios de ligação específicos: nas posições 14-18 (-NGTER-) com um retângulo ao redor da sequência, sítio de ligação do carboidrato (CHO); nas posições 10 e 74, a banda disulfeto (S-S) representado pelo símbolo =.

**Figura 1**Sequência Nucleotídica (B-L $\beta$ II)

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
	+      ++      +++          +  +  +
B-LB12major	TTCTTCTTCT GCGGTGCGAT ATCCGAGTGC CACTACCTGA ACGGCACCGA
BLB*CC8b	.....G.....GGT.....
BLB*CC5b	.....GGT.....
BLB*CC9b	.....G.....GGT.....
BLB*CC7b	.....A.....T.....TT.....A.T.C.....
BLB*CC10b	.....G.....GGT.....A.T.C.....
BLB*CC3b	.....A.....T.....TT.....A.T.....
BLB*CC6b	.....TT.....A.T.....
BLB*CC11b	.....G.....TT.....A.T.....
BLB*CC4b	.....A.....T.....TT.....A.T.C.....
BLB*CC1b	.....AT.....AT.....
BLB*CC2b	.....
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
	+  +  ++  +  +          +  +                  ++++++
B-LB12major	GCGGGTGAGG TATCTGCAAA GGTACATCTA CAACCGGCAG CAGTTCACGC
BLB*CC8b	.....G.C.....G.A.....A.G.....
BLB*CC5b	.....G.C.....G.A.....A.G.....
BLB*CC9b	.....G.C.....C.A.....A.G.....
BLB*CC7b	.....G.G.....C.A.....GCG..
BLB*CC10b	.....G.G.....C.A.....GCG..
BLB*CC3b	.....G.G.....C.A.....ACAT..
BLB*CC6b	.....C.....G.G.....C.A.....ACAT..
BLB*CC11b	.....T.....G.G.....C.A.....ACAT..
BLB*CC4b	.....GCC.....G.A.....A.T..
BLB*CC1b	.....TA.....G.C.....C.A.....AACAT..
BLB*CC2b	.....A.T.....A.G.....
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
	+                  ++  +          +  +  +          +
B-LB12major	ACTTCGACAG CGACGTGGGG AAATTTGTGG CCGATTACCC GCTGGGTGAG
BLB*CC8b	.....A.....
BLB*CC5b	.....A.....
BLB*CC9b	.....A.....
BLB*CC7b	.....AC.....
BLB*CC10b	.....T.....AC.....
BLB*CC3b	.....AC.....A.....A.....
BLB*CC6b	.....AC.....A.....A.....
BLB*CC11b	.....AC.....A.....A.....
BLB*CC4b	.....AC.A.T.A.....
BLB*CC1b	.....AC.....T.A.....
BLB*CC2b	.....A.G.....

**Figura 1 (continuação)**Sequência Nucleotídica (B-L $\beta$ II)

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	160	170	180	190	200	
	++++++ ++	++ +	+	++ +	++++++ +	
B-LB12major	CCGCAAGCTG	AATACTGGAA	CAGCAACGCC	GAGCTTCTGG	AGAACCGAAT	
BLB*CC8b	.GT.....	.....	.....	.....	.....T...	
BLB*CC5b	.....	.....	.....	.....	.....T...	
BLB*CC9b	.....	..AT..T...	.....	.....	.....T...	
BLB*CC7b	TATTCG..A.	..AT.....	....G.....	..A..A...	..G.....	
BLB*CC10b	TATTCG..A.	..AT.....	....G.....	..A..A...	..G.....	
BLB*CC3b	TAT..G.TA.	..AT.....	....G.....	..A.....	..G...A..G	
BLB*CC6b	TAT..G.TA.	..AT.....	....G.....	..A.....	..G...A..G	
BLB*CC11b	TAT..G.TA.	..AT.....	....G.....	..TA.....	.....	
BLB*CC4b	..AT..G.TA.	..AT.....	....G.....	..T.....	.....T.....	
BLB*CC1b	.....	.....	.....	..T..A...	..A.TAAA..G	
BLB*CC2b	.GT..G....	.....	.....	..A.....	..G..GA...	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
	210	220	230	240	250	
	++++ +	++ ++		++ + + +		
B-LB12major	GAATGAAGTG	GACAGGTTCT	GCCGGCACAA	CTACGGGGGT	GTGGAGTCCT	
BLB*CC8b	....AT..C.	...G...C..	.....	.....T.	.....	
BLB*CC5b	....AT..C.	...G..CC..	.....	.....AT.	.....	
BLB*CC9b	.....	.....G.....	.....	.....AT.	C...A.....	
BLB*CC7b	.....C....	.....A.....	.....	.....T.	T.C.....	
BLB*CC10b	.....C....	.....A.....	.....	.....T.	T.C.....	
BLB*CC3b	..C.C....	...C..A...	.....	.....	.....	
BLB*CC6b	..C.C....	...C..A...	.....	.....C.	.....	
BLB*CC11b	.....	.....A.....	.....	.....T.	.....	
BLB*CC4b	.....	.....	.....	.....C.	.....	
BLB*CC1b	.....G...	.....G...	.....	.....T.	.....	
BLB*CC2b	.....	.....	.....	.....AT.	C.....	
	..... .....	..... ..				
	260					
B-LB12major	TCACGGTGCA	GAGGAGC				
BLB*CC8b	.....	.....				
BLB*CC5b	.....	.....				
BLB*CC9b	.....	.....				
BLB*CC7b	.....	.....				
BLB*CC10b	.....	.....				
BLB*CC3b	.....	.....				
BLB*CC6b	.....	.....				
BLB*CC11b	.....	.....				
BLB*CC4b	.....	.....				
BLB*CC1b	.....	.....				
BLB*CC2b	.....	.....				

Figura 2

Sequência Nucleotídica (B-L $\beta$ I)

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             10          20          30          40          50
                                     +
B-LB12c      TTCTTCCAGT GGACTTTTAA AGCGGAGTGC CACTACCTGA ACGGCACCGA
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             60          70          80          90          100
                +      +      + ++      +      +      +
B-LB12c      GCGGGTGAGG TATCTGGTCA GGTATGTCTA CAGCCGGCAG GAGTACGCGC
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                .T.....A.. ..C.AA.... ..A..... C...T.....

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             110         120         130         140         150
                                     +      +
B-LB12c      ACTTCGACAG CGACGTGGGG AAACACGTGG CCGATACACC GCTGGGTGAG
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             160         170         180         190         200
B-LB12c      CCGCAAGCTG AATACTGGAA CAGCAACGCC GAGATTCTGG AGAACCGAAT
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             210         220         230         240         250
B-LB12c      GAATGAAGTG GACACGTACT GCCGGCACAA CTACGGGGTT GTGGAGTCCT
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
             260
B-LB12c      TCACGGTGCA GAGGAGC
BLB*CC2a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC1a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC3a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BLB*CC4a    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

**Figura 3**Aminoácidos (B-L $\beta$ II)

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	10	20	30	40	50
	+ + + = ++	+ + + +	++	+ ++ +	
B-LB12major	FFFCGAISEC	HYLNGTERVR	YLQRYIYNRQ	QFTHFDSVDG	KFVADSPLGE
BLB*CC8b	.....G.G..		.D.E.....	.YA.....	.....T....
BLB*CC5b	.....G..		.D.E.....	.YA.....	.....T....
BLB*CC9b	.....G.G..		.D.Q.....	.YA.....	.....T....
BLB*CC7b	..Y.V.F..	QF.....	.E.Q.....	.LR.....	.Y.....
BLB*CC10b	.....G.G..	QF.....	.E.Q.....	.LR...V..	.Y.....
BLB*CC3b	..Y.V.F..	QF.....	.E.Q.....	.TS.....	.Y...T..D.
BLB*CC6b	.....F..	QF.....A	.E.Q.....	.TS.....	.Y...T..D.
BLB*CC11b	.....G.F..	QF.....	F.E.Q.....	.TS.....	.Y...T..D.
BLB*CC4b	..Y.V.F..	QF.....	.A.E.....	.YM.....	.Y...T....
BLB*CC1b	..R.M.Y..		L.D.Q.....	.TS.....	.Y...T....
BLB*CC2b	.....		F.....	.YA.....	.....TA...

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	60	70	80	
	+++ ++ +	++ +++ ++	++= + +	
B-LB12major	PQAEYWNSNA	ELLENRMNEV	DRFCRHNYGG	VESFTVQRS
BLB*CC8b	R.....	.....L..IA	.GS.....V	.....
BLB*CC5b	.....	.....L..IA	.GP.....I	L.....
BLB*CC9b	....IL....	.....L....	.V.....I	L.....
BLB*CC7b	YS..I...D.	.IM.D...A.	.Y.....V	F.....
BLB*CC10b	YS..I...D.	.IM.D...A.	.Y.....V	F.....
BLB*CC3b	Y.V.I...D.	....DQR.A.	.TY.....	.....
BLB*CC6b	Y.V.I...D.	.I..DQR.A.	.TY.....A	.....
BLB*CC11b	Y.V.I...D.	.Y.....	.Y.....V	.....
BLB*CC4b	H.V.I...D.	.F..I.....	.....A	.....
BLB*CC1b	.....	.FM.IKR...	.V.....V	.....
BLB*CC2b	R.....	.I..DE....	.....I	L.....



**Figura 4**

Aminoácidos (B-LβI)

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
	=                  + + ++ + ++                  +
B-LB12c	FFQWTFKAEC  HYI <b>NGTER</b> VR  YLVRYVYSRQ  EYAHFDSVDG  KHVADTPLGE
BLB*CC2a	.....N.....A.....
BLB*CC1a	.....N.....
BLB*CC3a	.....N.....
BLB*CC4a	.....F.D.QI.N..  QF.....
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80
	=
B-LB12c	PQAEYWNSNA  EILENRMNEV  DTYCRHNYGV  VESFTVQRS
BLB*CC2a	.....
BLB*CC1a	.....
BLB*CC3a	.....
BLB*CC4a	.....

## CAPÍTULO IV

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na metade final do século XX o melhoramento animal sofreu um avanço considerável, e esse se deu, principalmente, devido ao grande crescimento na área da genética, em particular, na genética quantitativa que, aliada a técnicas computacionais e estatísticas, é utilizada em programas de melhoramento genético que selecionam animais com parâmetros de produção sucessivamente melhores (SHIMIDT e LEDUR, 1999). O enfoque deste melhoramento genético é a maior quantidade e rapidez na produção de alimentos, e se faz concentrando nas populações animais os alelos ou genótipos que conferem maior produção as características de interesse, o que leva, inevitavelmente, a diminuição da variabilidade genética.

As galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis são o resultado de cruzamentos aleatórios entre diferentes raças de galinhas e, principalmente por isso, apresentam como característica uma grande variabilidade genética. Esta variação é de extrema importância quando se considera a resistência a doenças, pois quanto maior for o polimorfismo genético de uma população para um determinado gene envolvido na resposta imunológica a um agente infeccioso, maior será a chance de alguns indivíduos da população sobreviverem a ele. Entretanto, como referido anteriormente, os processos seletivos que visam parâmetros produtivos como, por exemplo, desenvolvimento precoce ou produção de ovos, geralmente tornam as linhagens muito uniformes, diminuindo, assim, a variabilidade genética populacional. As aves caipiras brasileiras não sofreram estes processos de seleção artificial, o que faz com que apresentem um polimorfismo gênico maior do que o encontrado nas aves industriais, justificando, provavelmente, esta maior resistência apresentada pelas aves caipiras.

As galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis apresentam um significativo polimorfismo para as moléculas do MHC de classe II (B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II). Através da técnica de sequenciamento do gene B-L $\beta$ I e B-L $\beta$ II foi possível detectar 15 diferentes sequências nucleotídicas de uma amostra de 100 galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Das 15 sequências, dez já haviam sido descritas na literatura, mas cinco ainda não. Estes dados corroboram com os achados de Lima-Rosa et al., (2004) que demonstraram a grande

variabilidades genética presente na mesma amostra de galinhas caipiras brasileira de ovos azuis para os genes B-FI e B-FIV (MHC classe I). Vinte e três sequências dos genes B-F foram detectadas por eles, das quais 13 eram sequências “inéditas”. Outros trabalhos com aves não comerciais têm demonstrado polimorfismo semelhante ao encontrado nas caipiras brasileiras (XU et al., 2007; WORLEY et al., 2008; GOU et al., *in press*).

A principal importância da obtenção destes “novos” alelos é o uso que se pode fazer deles no futuro, ou seja, a possibilidade de utilizá-los em programas de melhoramento genético para resistência a doenças. Estes programas devem manter o polimorfismo em *loci* onde a variação é crucial (como os envolvidos com a resistência a doenças), o que aumentará, indiretamente, a produção, tornando esta atividade ainda mais lucrativa.

## CAPÍTULO V

### REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 4° ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2000.
- ACTOR, J.K. Imunologia e Microbiologia. 1° Ed. Elsevier, 2007
- ALBINO, L.F.T.; VARGAS, Jr. J.G.; SILVA, J.H.V. Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa. Editora Aprenda Fácil, Viçosa, MG, 2001.
- BACON, L.D. Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. Poultry Science, v. 66, p. 802-811, 1987.
- BACON, L.D.; DIETERT, R.R. Genetic control of cell-mediated immunity in chickens. Poultry Science, v. 70, p. 1187-1199, 1991.
- BRILES, W.E.; GOTO, R.M.; AUFRAY, C.; MILLER, M.M. A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. Immunogenetics, v. 37, p. 408-414, 1993.
- BRILES, W.E.; MCGIBBON, W.H; IRWIN, M.R. On multiple alleles affecting cellular antigens in chicken. Genetics, v. 35, p. 633-652, 1950.
- BURT, D.W.; BUMSTEAD, N.; BITGOOD, J.J; PONCE DE LEON, F.A.; CRITTENDEN, L.B. Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. Trends in Genetics, v. 11, p. 190-194, 1995.
- CERRI, C. Cocoricó de valor. Globo Rural, v. 85, p. 47-55, 1992.
- CRAWFORD, R. D. Poultry Breeding and Genetics. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1122, 1990.
- FRANK, S A. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton University Press, 2002
- GOMES, P.C.; ALBINO, L. F. Criação de Frango e Galinha Caipira. Filmes CPT – Centro de Produções Técnicas. Cód.: 050. Minas Gerais: Série Avicultura, 1998.
- GRUBER, A. Mecanismos moleculares de resistência a doenças em aves. Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola, p. 119-132, 1999.

GUILLEMOT, F.; BILLAULT, A.; POURQUIÉ, O.; BÉHAR, G.; CHAUSSÉ, A-M.; ZOOROB, R.; KREIBICH, G.; AUFRAY, C. A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II  $\beta$  genes are closely linked to the class I genes and nucleolar organizer. *EMBO Journal*, v. 7, p. 2775-2785, 1988.

GUILLEMOT, F.; KAUFMAN, J.F.; SKJOEDT, K.; AUFRAY, C. The major histocompatibility complex in the chicken. *Trends Genetcis*, v. 5, p. 300-304, 1989.

GUO, X.L.; ZHENG, H.Q.; LI, X.L.; LI, Y.; GU, Z.L.; ZHENG, C.S.; WEI, Z.H.; WANG, J.S.; ZHOU, R.Y.; LI, L.H. Genetic variation of major histocompatibility complex BLB2 gene exon 2 in Hebei domestic chicken. *Research in Veterinary Science*, *in press*.

JACOB, J.P.; MILNE, S. BECK, S.; KAUFMAN, J. The major and a minor class II beta-chain (B-LB) gene flank the tapasin gene in the B-F/B-L region of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, v. 51, p. 138-147, 2000.

JUUL-MADSEN, H.R.; DALGAARD, T.S.; AFANASSIEFF, M. Molecular characterization of major and minor MHC class I and II genes in B<sup>21</sup>-like haplotypes in chickens. *Animal Genetics*, v. 31, p. 252-261, 2000.

KAUFMAN, J.; JACOB, J.; SHAW, I.; WALKER, B.; MILNE, S.; BECK, S.; SALOMONSEN, J. Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunol Reviews*, v. 167, p. 101-17, 1999.

KAUFMAN, J.; SALOMONSEN, J. The “Minimal Essential MHC” revisited: Both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas*, v. 127, p.67-73, 1997.

KAUFMAN, J.; SKDODT, K.; SALOMONSEN, J.; The B-G multigene family of the chicken MHC. *Critical Reviews in Immunology*, v. 11, p. 113-143, 1991.

KAUFMAN, J.; VÖLK, H.; WALLNY, H.J.; A “minimal essential MHC” and an “unrecognized MHC”: two extremes in selection for polymorphism. *Immunology Reviews*, v. 143, p. 63-88, 1995.

KAUFMAN, J.; WALLNY, H.J. Chicken MHC molecules, disease resistance and evolutionary origin of birds. In: Vainio O and Imhof BA (eds.). *Immunology and developmental biology of chicken*. Springer-Verlag, Berlin, p. 129-141, 1996.

LAMONT, S.J. The chicken major histocompatibility complex in disease resistance and poultry breeding. *Journal of Dairy Science*, v.72, p. 1328-1333, 1989.

LAMONT, S.J. The chicken major histocompatibility complex and disease. *Rev Sci Techn*, v. 17, p. 128-142, 1998.

LANA, G. R. Q. *Avicultura*. Recife UFRPE: Rural, p. 268, 2000.

LI, L.; JOHNSON, W.L.; EWALD, S.J. Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Animal Genetics*, v. 28, p. 258-267, 1997.

- LI, L.; JOHNSON, W.L.; LIVANT, E.J.; EWALD, S.J. The MHC of broiler chicken line: serology, B-G genotypes, and B-F/B-L $\beta$  sequences. *Immunogenetics*, v. 49, p. 215-224, 1999.
- LIMA-ROSA, C. A. da V. Estudo da variabilidade dos genes B-F (MHC Classe I) e de um microssatélite associado em galinhas caipiras brasileiras. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- LIVANT, E.J.; ZHENG D.; JOHNSON, W.L.; SHI W.; EWALD, S.J. Three new MHC haplotypes in broiler breeder chickens. *Animal Genetics*, v. 32, p. 123-131, 2001.
- MILLER, M.M.; GOTO, R.; TAYLOR, Jr. R.L.; ZOOROB, R.; AUFRAY, C.; BRILES, R.W.; BRILES, W.E.; BLOOM, S.E. Assignment of *Rfp-Y* to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 93, p. 3958-3962, 1996.
- MORENG, R. E.; AVENS, J. S. *Ciência e Produção de Aves*. São Paulo: Roca, p. 380, 1990.
- PHARR G.T.; DODGSON J.B.; HUNT H.D.; BACON L.D. Class II MHC cDNA 15I<sub>5</sub> B-congenic chickens. *Immunogenet*, v. 47, p. 350-354, 1998.
- RAMOS, M. A. O Caipira de Sangue Azul. *Globo rural*, v. 113, p. 39-43, 1995.
- SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C. Interação da genética quantitativa e molecular no processo de seleção de aves. *Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola*, p. 133-144. 1999.
- SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN, P.R.; *Imunologia Básica e Aplicada*. Sagra Luzzato, Porto Alegre, RS, 1998.
- SIMONSEN, M.; CRONE, M.; KOCH, C.; HÁLA, K. The MHC haplotypes of chicken. *Immunogenet*, v. 16, p. 513-532, 1982.
- SMITH, J.; BURT, D.W. Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*). *Animal Genetics*, v. 29, p.290-294, 1998.
- TROWSDALE, J. "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics*, v. 41, p. 1-17, 1995.
- WORLEY, K.; GILLINGHAM, M.; JENSEN, P.; KENNEDY, L. J.; PIZZARI, T.; KAUFMAN, J.; RICHARDSON, D.S. Single locus typing of MHC class I and class II B loci in a population of red jungle fowl. *Immunogenetics*, v. 60, p. 233-247, 2008.
- XU, R.; LI, C.; Chen, C.; XU, H.; Qiang, B.; LI, C.; LIU, B. Characterization of genetic polymorphism of novel MHC B-LBII alleles in chinese indigenous chickens. *Journal of Genetics and Genomics*, v.34, p. 109-118, 2007.
- ZOOROB, R.; BÉHAR, G.; KROEMER, G.; AUFRAY, C. Organization of functional chicken class II B gene. *Immunogenetics*, v. 31, p. 179-187, 1990.

ZOOROB, R.; BERNOT, A.; RENOIR, D.M.; CHOUKRI, F.; AUFFRAY, C. Chicken major histocompatibility complex class II B genes: analysis of interallelic and interlocus sequence variance. *European Journal of Immunology*, v. 23, p. 1139-1145, 1993.