

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

**MARIANA DA SILVA CASA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS BoLA-DRB3 COM A  
RESISTÊNCIA À ANAPLASMOSE E BABESIOSE EM BOVINOS DA RAÇA  
CRIOULA LAGEANA**

**LAGES**

**2022**

**MARIANA DA SILVA CASA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS BoLA-DRB3 COM A  
RESISTÊNCIA À ANAPLASMOSE E BABESIOSE EM BOVINOS DA RAÇA  
CRIOULA LAGEANA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em  
Ciência Animal, do Centro de Ciências  
Agroveterinárias da Universidade do Estado de  
Santa Catarina, como requisito para a obtenção do  
grau de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque.  
Co-orientadora: Prof. Carla Ivane Ganz Vogel

**LAGES**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Casa, Mariana da Silva  
VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DOS  
ALELOS BoLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA À  
ANAPLASMOSE E BABESIOSE EM BOVINOS DA RAÇA  
CRIOULA LAGEANA. / Mariana da Silva Casa. -- 2022.  
52 p.

Orientador: Joandes Henrique Fontequê  
Coorientadora: Carla Ivane Ganz Vogel  
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal, Lages, 2022.

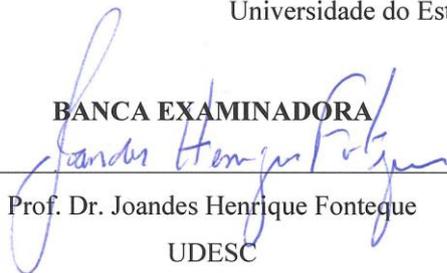
1. Raça Localmente Adaptada. 2. Bos taurus. 3. Genotipagem. I.  
Fontequê, Joandes Henrique. II. Vogel, Carla Ivane Ganz. III.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
IV. Título.

MARIANA DA SILVA CASA

VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS BoLA-DRB3 COM A  
RESISTÊNCIA À ANAPLASMOSE E BABESIOSE EM BOVINOS DA RAÇA  
CRIOULA LAGEANA.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

**BANCA EXAMINADORA**

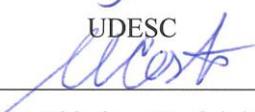
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequ

UDESC

Membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Renata Assis Casagrande

UDESC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

UDESC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guillermo Giovambattista

Universidad de La Plata

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Universidade Federal de Goiás

Lages, 29 de julho de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, pela família maravilhosa, e pelos milagres com os quais me deparei a cada dia desta caminhada.

A meus pais, Volmir Luiz Casa e Sara Renata da Silva Casa, pelo amor incondicional e carinho, apoio, paciência, encorajamento, por me ensinarem a respeitar a mim mesma, aos meus limites e aos demais que convivem comigo, e tudo o mais que me ensinaram, fizeram, fazem e continuarão fazendo por mim e que não encontro palavras para explicar o amor imenso que dedico a eles.

À minha irmã Manuela da Silva Casa, por sua generosidade, seu carinho, seus conselhos e seu amor.

Ao meu marido Ruan Caldart, por todo amor e carinho, pela compreensão, pela companhia em todos os momentos, por toda a ajuda e cumplicidade. Tenho sorte em tê-lo ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Dr. Joandes Henrique Fonteque, pela oportunidade, pelos ensinamentos, por toda ajuda e pela amizade. Deus coloca sempre as pessoas certas em nosso caminho. À professora Dra. Carla Ivane Ganz Vogel pela co-orientação, amizade e toda ajuda e ideias para a concepção deste trabalho.

Aos amigos que fiz nesta jornada, que foram essenciais e tornaram mais leve o caminho para se chegar até aqui. Ketriciane Mota de Souza, Gabriela Bassi das Neves, Felipe Eduardo Fiorin, Giovana Biezus, Ana Carolina P. de Almeida e Graziela Vieira Fonteque, obrigada pela ajuda, por me ensinarem tanto, pelas conversas e principalmente por compartilharem sua amizade. Obrigada!

Aos professores que estiveram sempre doando um pouco de seu tempo para que nosso trabalho fosse melhor, tirando dúvidas e ajudando no que fosse preciso, agradeço especialmente ao professor Dr. Luiz Claudio Miletto e ao professor Dr. Ubirajara Maciel. E em especial ao Dr. Guillermo Giovambattista, da Universidade de La Plata, por tornar essa tese possível.

Agradeço a Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL) e ainda aos criadores dos bovinos da raça Crioula Lageana, na Fazenda Igrejinha o proprietário Sr. Nelson de Araújo Camargo; na Fazenda Bom Jesus do Herval, os proprietários Dr. Edison Martins e Dra. Vera Maria Villamil Martins; na Fazenda da Cadeia o proprietário Márcio Rosa Camargo; na Fazenda Canoas, o proprietário Assis Almeida Camargo; na Fazenda Santa Rita do Passo da Telha, o proprietário Dr. José Antônio Ribas Ribeiro; e na Fazenda Grande, o

proprietário Jairo Roberto Duarte, que gentilmente cederam seus animais e a quem presto meu reconhecimento pelo trabalho que realizam.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília – DF, em especial à Dra. Maria do Socorro Maués Albuquerque e Dr. Alexandre Floriani Ramos, que gentilmente cederam materiais e reagentes para fomentar este trabalho

À toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica do CAV – UDESC.

À todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

À Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA pela realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de apoio financeiro.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por fomentar este trabalho de pesquisa.

Obrigada!



Armandinho – Alexandre Back (2016)

## RESUMO

CASA, M. S. 2022, 55p. **Variabilidade genética e associação dos alelos BoLA-DRB3 com a resistência à anaplasmose e babesiose em bovinos da raça Crioula Lageana.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2022.

A raça Crioula Lageana é reconhecida no Planalto Catarinense por sua rusticidade e resistência à enfermidades. Por esse motivo, conhecer a variabilidade do gene BoLA-DRB3 dentro de uma população é uma importante ferramenta para avaliar a resistência/susceptibilidade da espécie bovina à diversos agentes. A variabilidade genética de raças localmente adaptadas é um fator determinante para a resistência à diversas enfermidades, inclusive para babesiose e anaplasmose bovinas, geradoras de grandes prejuízos. Para avaliação dos alelos do gene BoLA-DRB3 foram colhidas amostras de sangue de 208 animais da raça Crioula Lageana. As amostras foram submetidas à extração de DNA e diagnóstico molecular da infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por meio da PCR. Os alelos do gene BoLA-DRB3 foram determinados por meio de sequenciamento, utilizando a técnica de PCR-SBT. As frequências alélicas e o número de alelos foram obtidos através de contagem direta, resultando em 44 diferentes alelos. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) para o locus BoLA-DRB3 foram estimadas e demonstraram haver alta variabilidade genética na raça Crioula Lageana, a qual encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), estimado pela estatística  $F_{IS}$ . A estrutura genética e a diferenciação genética da raça Crioula Lageana com outras raças foram obtidas utilizando a estatística  $F$  de Wright. Para condensar a variação genética do locus BoLA-DRB3, as frequências alélicas foram usadas para realizar a Análise de Componente Principal (PCA). A associação entre a presença/ausência da infecção e os alelos presentes nas populações se deu por meio do teste de Qui-quadrado e análise da Odds Ratio. Foi possível verificar grande variabilidade genética do gene BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana, sendo que os alelos BoLA-DRB3\*001:01 ( $p < 0,001$ ; OR=0,224), e BoLA-DRB3\*024:06 ( $p = 0,007$ ; OR < 0,00001), estão significativamente associados à resistência à infecção por *A. marginale* e o alelo BoLA-DRB3\*011:01 ( $p = 0,002$ ; OR=0,271) está associado à resistência à infecção por *B. bovis*. Desse modo, pode-se confirmar a alta variabilidade genética do gene BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana, bem como a existência de alelos que podem beneficiar a resistência dos animais à anaplasmose e à babesiose.

**Palavras-chave:** Genotipagem; Resistência; Raça nativa; *Bos taurus*.

## ABSTRACT

CASA, M. S. 2022, 55p. **Genetic variability and association of BoLA-DRB3 alleles with resistance to anaplasmosis and babesiosis in Crioula Lageana cattle.** Tesis (PhD in Animal Science) – University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2022.

The Crioula Lageana breed is recognized in the Planalto Catarinense for its rusticity and resistance to diseases. For this reason, knowing the variability of the BoLA-DRB3 gene within a population is an important tool to assess the resistance/susceptibility of bovine species to different agents. The genetic variability of locally adapted breeds is a determining factor for resistance to various diseases, including bovine babesiosis and anaplasmosis, which generate great losses. To evaluate the BoLA DRB3 gene alleles, blood samples were collected from 208 animals of the Crioula Lageana breed. The samples were submitted to DNA extraction and molecular diagnosis of infection by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by means of PCR. The BoLA-DRB3 gene alleles were determined by sequencing, using the PCR-SBT technique. Allele frequencies and number of alleles were obtained through direct counting, resulting in 44 different alleles. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) for the BoLA-DRB3 locus were estimated and showed high genetic variability in the Crioula Lageana breed, which is in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), estimated by the statistics FIS. The genetic structure and genetic differentiation of the Crioula Lageana breed with other breeds were obtained using Wright's F statistic. To condense the genetic variation of the BoLA-DRB3 locus, allele frequencies were used to perform Principal Component Analysis (PCA). The association between the presence/absence of the infection and the alleles present in the populations was carried out by means of the Chi-square test and analysis of the Odds Ratio. It was possible to verify great genetic variability of the BoLA-DRB3 gene in the Crioula Lageana breed, with the BoLA-DRB3\*001:01 ( $p < 0.001$ ; OR=0.224) and BoLA-DRB3\*024:06 alleles ( $p = 0.007$ ; OR < 0.00001), are significantly associated with resistance to *A. marginale* infection and the BoLA-DRB3\*011:01 allele ( $p = 0.002$ ; OR=0.271) is associated with resistance to *B. bovis* infection. Thus, the high genetic variability of the BoLA-DRB3 gene in the Crioula Lageana breed can be confirmed, as well as the existence of alleles that may benefit the resistance of animals to anaplasmosis and babesiosis.

Keywords: Genotyping; Resistance; Native breed; *Bos taurus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Análise de Componente Principal de 13 raças baseada nas frequências do gene BoLA-DRB3.....	32
--	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 208 animais da raça Crioula Lageana.....28
- Tabela 2** - Número de alelos ( $n_a$ ), heterozigosidade observada ( $h_o$ ) e esperada ( $h_e$ ), Equilíbrio de Hardy-Weingberg (HWE) medido por meio de  $F_{IS}$  e Teste de neutralidade exato de Slatkin para a raça Crioula Lageana e outras doze raças presentes na literatura..31
- Tabela 3** - Distância genética entre pares de raças estimada pelo teste  $F_{ST}$ ..... 33
- Tabela 4** - Proporção absoluta e relativa de animais da raça Crioula Lageana positivos e negativos para os agentes *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

BoLA	Antígeno Leucocitário Bovino
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR-SBT	Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restricted Fragment Length Polimorphism
PCA	Análise de Componente Principal
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>1</b>	OBJETIVOS GERAIS .....	17
<b>2</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	18
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
4.1	FUNÇÃO E ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL .....	19
4.2	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO MHC BOVINO .....	20
4.3	A REGIÃO DA CLASSE II DO MHC BOVINO .....	20
4.3.1	<b>A subregião IIa do MHC bovino</b> .....	20
4.3.1.1	Os genes DR .....	20
4.4	DIVERSIDADE DO MHC .....	21
4.5	O GENE BoLA-DRB3 E SUA ASSOCIAÇÃO COM ENFERMIDADES .....	21
4.6	RESISTÊNCIA, RESILIÊNCIA E TOLERÂNCIA .....	22
4.7	BoLA-DRB3 NAS RAÇAS CRIOULAS .....	23
<b>5</b>	<b>ALTA VARIABILIDADE DO GENE BoLA-DRB3 EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA</b> .....	25
5.1	INTRODUÇÃO .....	25
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	26
5.2.1	Animais e obtenção das amostras .....	26
5.2.2	Genotipagem do gene BoLA-DRB3 por meio da técnica de PCR-SBT (Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing) .....	27
<b>5.2.3</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	27
5.2.3.1	Medidas de variabilidade genética .....	27
5.2.3.2	Estrutura genética e diferenciação populacional .....	28
5.2.3.3	Análise de Componente Principal (PCA) .....	28
5.3	RESULTADOS .....	28
5.4	DISCUSSÃO .....	33
5.5	CONCLUSÃO .....	35

6	BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA POSSUEM ALELOS DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR <i>Anaplasma marginale</i> E <i>Babesia bovis</i> .....	36
6.1	INTRODUÇÃO.....	36
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
6.2.1	Animais e obtenção das amostras .....	38
<b>6.2.2</b>	<b>Exame Físico</b> .....	38
<b>6.2.3</b>	<b>Análise molecular</b> .....	38
6.2.4	Genotipagem do gene BoLA-DRB-3.2 .....	39
<b>6.2.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	39
6.4	DISCUSSÃO.....	40
6.5	CONCLUSÃO.....	43
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética é fator essencial para o sucesso de programas de melhoramento genético. As raças localmente adaptadas reúnem características próprias que lhes conferem vantagens em seus ambientes de criação, no entanto, 17% das raças de animais de produção estão sob risco de extinção, o que predispõe à perda da variabilidade genética (FAO, 2015).

Raças localmente adaptadas em geral são consideradas naturalmente resistentes à muitas doenças consideradas importantes em seus ambientes de criação. De acordo com a FAO (2015), estas raças estão no país há tempo suficiente para serem geneticamente adaptadas aos sistemas de produção. No entanto, os mecanismos desenvolvidos por esses animais e que lhes conferem estas características ainda não estão totalmente esclarecidos (BILHASSI et al., 2014).

As mudanças climáticas, doenças emergentes, disponibilidade de solo e água e demandas de mercado demonstram a importância da manutenção dos recursos genéticos nativos como fonte de sustentabilidade e segurança alimentar. A perda de variabilidade genética provavelmente terá efeitos sobre a epidemiologia de doenças (FIORAVANTTI et al., 2020).

O gene BoLA-DRB3, do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) dos bovinos, tem alta associação com várias enfermidades que acometem a espécie. Ainda assim, a raça, estado reprodutivo, manejo e ambiente também são fatores a serem considerados na tolerância à enfermidades, e devem estar associados às informações genéticas (DIETZ et al., 1997; KELM et al., 1997; SHARIF et al., 1998).

Nas raças localmente adaptadas brasileiras trabalhos sobre tolerância à enfermidades são incipientes, demonstrando a necessidade de estudos que comprovem o potencial de uso dessas raças em programas de melhoramento com vistas à reduzir custos com tratamentos, sem perda de produtividade e mantendo a qualidade dos produtos oriundos dessa produção no que tange à saúde pública. Na raça Crioula Lageana poucos são os estudos a respeito da sanidade, no entanto, relatos de proprietários apontam para animais de grande rusticidade, adaptabilidade e resistência à doenças que facilmente acometem outros rebanhos, o que pode revelar grande potencial destas raças como fonte de material genético de qualidade, com excelente potencial de introdução em programas de melhoramento genético.

O conhecimento acerca da variabilidade genética e de genes relacionados à imunidade e tolerância à enfermidades dentro de raças específicas permite uma visão mais ampla e moderna dos mecanismos que podem levar indivíduos ou grupos raciais a desenvolverem características de interesse. A resistência à doenças é uma destas características desejáveis e com potencial para ser explorada com o objetivo de aumentar a produtividade e o retorno

econômico e como ferramenta profilática, evitando o uso exagerado de medicamentos tanto como medida preventiva quanto de tratamento para enfermidades comuns nos rebanhos.

Sendo assim, este estudo propõe a esclarecer alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência à anaplasrose e à babesiose, doenças que são endêmicas no Brasil. O conhecimento científico gerado será de grande importância para o estabelecimento de novos programas de melhoramento, para a formação de populações geneticamente resistentes e livres de princípios ativos desnecessários, os quais são hoje um problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a variabilidade do locus BoLA-DRB3 em bovinos da raça Crioula Lageana por meio de sequenciamento, bem como associar os alelos do gene BoLA-DRB3 à resistência ou susceptibilidade à infecção natural por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar os alelos do gene BoLA-DRB3 presentes na raça Crioula Lageana;
- Aplicar testes estatístico para obter os dados de variabilidade do gene BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana;
- Verificar a associação estatística entre os alelos BoLA-DRB3 encontrados e a infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

### **3 HIPÓTESES**

Espera-se encontrar um número expressivo de diferentes alelos na população da raça Crioula Lageana demonstrando que a variabilidade existente está intimamente associada à resistência à anaplasrose e babesiose.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 FUNÇÃO E ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL

Uma família de genes polimórficos, que codificam receptores indispensáveis para a defesa imune, é representada pelo complexo de histocompatibilidade principal (CHP) - *Major Histocompatibility Complex* (MHC) - parte fundamental do sistema imune da maioria dos vertebrados e um importante sistema genético de resistência a doenças (EDWARDS; HENDRICK, 1998; HILL, 1998).

Existem três grupos de antígenos de histocompatibilidade: as moléculas de classe I, as de classe II e as de classe III. As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas, tendo como função principal a apresentação de peptídeos aos linfócitos T CD8+, os quais são capazes de matar células neoplásicas e células infectadas por vírus (ALTMANN; TROWSDALE, 1989).

As moléculas de classe II são codificadas por genes distintos dentro do MHC, os quais dão origem às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . As moléculas da classe II são expressas nas células apresentadoras de antígeno – *antigen presenting cells* – APC, dentre as quais incluem-se as células dendríticas e os macrófagos. As moléculas de Classe II presentes nas APCs apresentam peptídeos derivados de patógenos extracelulares para as células T CD4+, estimulando a ação de macrófagos e células B, gerando assim resposta inflamatória e de anticorpos (ALTMANN; TROWSDALE, 1989).

As moléculas de classe III também estão associadas ao sistema imune, como por exemplo, componentes do sistema de complemento, enzima 21-hidroxilase esteroideal e fator de necrose tumoral (ALTMANN; TROWSDALE, 1989).

A cristalografia por raios-X foi capaz de identificar a estrutura das moléculas de classe I e II do MHC. Por meio desta técnica foram determinados os sítios de ligação de peptídeos e sua interação com os receptores de antígenos das células T (BJORKMAN et al., 1987).

Uma vez determinada a sequência de aminoácidos presentes na estrutura, descobriu-se que a classe I da molécula do MHC está organizada nos domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . Os dois primeiros domínios formam a fenda de ligação do antígeno e são distais, enquanto o domínio  $\alpha 3$  é o domínio proximal da membrana. Tratando-se da molécula de classe II, esta possui dois domínios externos, os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  e  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Os domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  são distais e formam a

fenda de ligação do antígeno, enquanto os domínios  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  estão próximos à membrana celular (AMILLS et al., 1998).

## 4.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO MHC BOVINO

Diferentemente dos humanos e roedores, os genes do MHC bovino localizam-se no autossomo 23 (BTA23), e foi nomeado como antígeno linfocitário bovino – *bovine lymphocyte antigen* – BoLA (FRIES; EGGEN; WOMACK, 1993). Na molécula de classe I do gene BoLA existem dois *loci* que são expressos e fortemente ligados, o *locus* BoLA-A e o BoLA-B. A região da classe III possui um conjunto de genes heterogêneos que estão relacionados às funções imunes entre outras (BENSAID et al., 1991).

No complexo BoLA, os genes da classe II são os mais estudados e encontram-se divididos em duas regiões separadas do cromossomo em vez de um grupamento único de genes, como é visto na maioria dos mamíferos. Essas duas partes são conhecidas como IIa e IIb (IANNUZZI et al., 1993; STAFUZZA et al., 2013). A sub-região IIa possui dois conjuntos de genes, sendo eles DR e DQ (AMILLS et al., 1998).

## 4.3 A REGIÃO DA CLASSE II DO MHC BOVINO

Diferentes técnicas já foram utilizadas para caracterizar a região da classe II do MHC bovino. Entre elas, pode-se citar: técnicas sorológicas (DAVIES et al., 1994), sondas de hibridização (ANDERSON; RASK, 1988), análise de polimorfismos por fragmentos de restrição (RFLP) (GROENEN et al., 1989), reação em cadeia da polimerase seguida por análise de polimorfismos por fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (DAVIES et al., 1992; MAILLARD et al., 1999) e sequenciamento genômico (SIGURDARDOTTIR et al., 1991).

### 4.3.1 A subregião IIa do MHC bovino

#### 4.3.1.1 Os genes DR

A sub-região IIa do MHC dos bovinos compreende os genes DRA e DRB. O gene DRA codifica a cadeia  $\alpha$  da molécula DR. Já se acreditou que o BoLA-DRA fosse um gene monomórfico, tendo apenas um alelo. No entanto, outros estudos detectaram variações alélicas no *locus* DRA, com pelo menos quatro alelos descobertos (ZHOU et al., 2007). Estudos com

búfalos (SENA et al., 2003) e iaques (AN et al., 2011) também revelaram variações no gene DRA, algo considerado surpreendente uma vez que o domínio DRA é um polipeptídeo bastante conservado na maioria dos mamíferos.

Os genes que codificam a cadeia  $\beta$ , entretanto, são bastante polimórficos. O segundo éxon, o qual codifica a parte variável do sítio de ligação, concentra a maior parte destes polimorfismos (BURKE; STONE; MUGGLI-COCKETT, 1991).

Em bovinos, existem pelo menos três *loci* da família DRB descritos, o DRB1, considerado um pseudogene; o DRB2, pouco expresso e o gene DRB3, descrito como altamente expresso e polimórfico (KUMAR et al., 2011).

#### 4.4 DIVERSIDADE DO MHC

Marcadores moleculares são amplamente utilizados na determinação e quantificação da diversidade genética. Suas aplicações incluem marcadores para a produção e qualidade do leite (GRISART et al., 2002; HE et al., 2006), termotolerância em bovinos (HANSEN, 2004), resistência a enfermidades (COUSSENS; NOBBIS, 2002) e características de carne e maciez (CASAS et al., 2006).

#### 4.5 O GENE BoLA-DRB3 E SUA ASSOCIAÇÃO COM ENFERMIDADES

A existência do antígeno linfocitário bovino (BoLA), foi estabelecida há mais de 40 anos (SPOONER et al., 1979). Em bovinos, o gene DRB3 está associado à tolerância a várias doenças, como por exemplo, neosporose (SCHWAB et al., 2009), dermatofilose (MAILLARD et al., 1996) e mastite (IBRAHIM et al., 2012).

Vários trabalhos demonstraram que o antígeno linfocitário bovino DRB3.2, do complexo de histocompatibilidade principal dos bovinos, tem alta associação com várias enfermidades que acometem a espécie (SHARIF et al., 1998; KULBERG et al., 2007; RUPP et al., 2007; DUANGJINDA et al. 2013). Ainda assim, a raça, estado reprodutivo, manejo e ambiente também são fatores a serem considerados na tolerância à enfermidades, e devem estar associados às informações genéticas (DIETZ et al., 1997; KELM et al., 1997; SHARIF et al., 1998).

Estudos recentes vêm demonstrando que os alelos do gene DRB3.2 estão associados com infestações por carrapatos em bovinos (MARTINEZ et al., 2006) e também com a

tolerância à anaplasmosse e babesiose em animais mestiços holandeses (DUANGJINDA et al., 2013). Com relação às raças crioulas, Bolaños et al., (2017) verificaram que os alelos \*1101, \*2006 e 20012 estão associados à resistência a infecção por *Babesia bigemina*.

A associação dos alelos BoLA-DRB3 com a resistência à leucose enzoótica bovina é uma das mais estudadas. Baltian et al. (2016) verificaram que no gado Holandês, na província de La Pampa, o alelo DRB3.2\*22 está associado à susceptibilidade à leucose enzoótica bovina, enquanto o alelo BoLA 3.2\*11 estaria associado a resistência à enfermidade. Daous et al. (2021), verificaram que a resistência atribuída a determinado alelo está atrelada à carga viral do vírus da leucose bovina (BLV), de modo que os alelos BoLA-DRB3.2\*3, \*7, \*8, \*11, \*22, \*24 e \*28 estão associados à baixas cargas provirais, enquanto o alelo BoLA-DRB3.2\*10 está associado à altas cargas provirais. Da mesma forma, a combinação de diferentes alelos em indivíduos heterozigotos também está associada à baixas ou altas cargas provirais. Há ainda a associação dos genótipos BoLA-DRB3 com a resistência especificamente ao linfoma, sendo os alelos \*010:01 e \*011:01 os que apresentaram associação (LO et al., 2020).

Tratando-se da tuberculose bovina, nenhum genótipo encontrado na população composta por animais de corte e leiteiros, estudada por Eirin et al. (2020) foi associado à resistência ou susceptibilidade à doença.

O alelo \*011:01 foi associado à resistência contra o papiloma vírus bovino (PVB) em Podolica, na Itália. Uma vez que o animal não adquire a infecção pelo PVB, previne-se também os tumores de bexiga associados à papilomatose (LONGERI et al., 2021).

Além de sua participação na defesa imunológica contra enfermidades, o gene BoLA-DRB3 também pode ser associado a características relacionadas à reprodução e tolerância ao calor. Conforme Mohamed et al. (2018), diferentes genótipos do gene BoLA-DRB3 podem estar associados à elevação da eficiência reprodutiva em vacas Holandesas, bem como pode influenciar a tolerância ao calor no segundo mês de lactação das fêmeas.

#### 4.6 RESISTÊNCIA, RESILIÊNCIA E TOLERÂNCIA

Resistência, tolerância e resiliência refletem a adaptação do hospedeiro aos estressores ambientais e sua interação com as doenças mediadas por estes fatores (KÖNIG; MAY, 2018). A resistência à doenças está muito atrelada às variações genéticas do hospedeiro, levando à variabilidade das respostas do sistema imune (BISHOP, 2010). A resistência pode ser melhor compreendida a partir de um ponto de vista ecológico, considerando-se a interação entre o hospedeiro e as espécies patogênicas (GRENFELL; DOBSON, 1995), sendo dessa forma

descrita como a habilidade do hospedeiro em ter algum grau de controle sobre o ciclo de vida do parasita (BISHOP, 2012; MULDER; RASHIDI, 2017).

A resistência pode ser interpretada ainda como a o inverso da intensidade da infecção, ou seja, quanto menor a intensidade, mais resistente o indivíduo é (RABERG et al., 2009). Desse modo, a definição de resistência pode englobar diversas outras situações como a menor propensão do hospedeiro a se infectar, menor proliferação dos patógenos uma vez que esteja infectado, ou ainda, menor eliminação e transmissão da infecção (BISHOP; WOOLLIAMS, 2014).

A tolerância é diferente da resistência e pode ser definida como a redução ou não do desempenho em função da carga de patógenos presente (BISHOP, 2012). Animais tolerantes devem manter seu desempenho independente da carga de patógenos presentes em seu organismo (MULDER; RASHIDI, 2017). A tolerância pode ser definida ainda como a taxa de mudança no desempenho conforme a carga parasitária aumenta (RABERG et al., 2009). A resiliência é um conceito relacionado à tolerância e sua definição envolve a produtividade do animal em face da infecção (BISHOP; WOOLLIAMS, 2014).

Segundo Doeschl-Wilson et al. (2012), a interpretação da tolerância diz respeito a trajetória de interação entre o hospedeiro e o parasita, descrevendo o nível de infecção do animal e comparando com o desempenho do mesmo ao longo do tempo. Considerando a complexidade deste processo, desde o acompanhamento dos animais até a necessidade de cálculos específicos, de forma geral, os autores acreditam que os estudos que envolvem genômica devem focar no termo resistência.

#### 4.7 BoLA-DRB3 NAS RAÇAS CRIOULAS

Estudos de caracterização do gene BoLA-DRB3 já existem para várias raças crioulas em vários países. Estes trabalhos têm como objetivo em geral obter dados de diversidade genética para diferentes raças e reforçar a importância da conservação das raças bovinas crioulas. As raças localmente adaptadas possuem características de interesse para a produção animal e podem possuir genes únicos, gerando interesse dos programas de melhoramento genético.

No Panamá, foram estudadas as raças Guaimí e Guabalá e foram obtidos 11 alelos presentes na raça Guabalá e seis para a raça Guaimí através da técnica de PCR-RFLP (VILLALOBOS-CORTÉZ; GONZÁLES, 2018). Na Ucrânia, a raça autóctona Grey foi

estudada, e através da técnica de PCR-RFLP, 28 alelos foram encontrados, caracterizando baixa diversidade genética nesta população (SUPROVYCH et al., 2021).

Nas raças indianas, Malnad Gidda, Hallikar e Ongole 53 alelos foram identificados por PCR-RFLP entre as três raças, sendo que estas apresentaram também alto grau de heterozigotidade e diversidade genética (DAS et al., 2012).

Nas Filipinas, através da técnica de reação em cadeia da polimerase com tipagem baseada em sequência (PCR-SBT), foram encontrados 71 alelos presentes em raças localmente adaptadas, demonstrando que raças asiáticas possuem maior nível de polimorfismos do gene BoLA-DRB3 (TAKESHIMA et al., 2014). Da mesma forma, altos níveis de polimorfismos foram identificados em raças crioulas colombianas, indicando alta diversidade genética neste grupo de animais (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Nas raças africanas Muturu e White Fulani, foram identificados respectivamente 25 e 26 alelos para estas raças, por meio de sequenciamento, considerando-se alto nível de diversidade genética para estas raças (AHMED et al., 2020).

Nas raças Pier Sein e Shwe Ni, de Myanmar, a técnica de PCR-SBT revelou a existência de 57 alelos para a raça Pier Sein e 43 para a raça Shwe Ni. Entre as duas raças, cinco novos alelos foram descritos (GIOVAMBATTISTA et al., 2020). No México, a PCR-RFLP identificou 39 alelos nos bovinos crioulos do noroeste do México, sendo que 14 alelos ainda não haviam sido reportados (FERNÁNDEZ et al., 2015).

Em estudo envolvendo as raças Caracu, Crioulo Argentino e Pantaneiro, encontraram-se respectivamente 21, 17 e 17 alelos para cada raça através de PCR-RFLP (MIRETTI et al., 2001). Nos bovinos crioulos peruanos, 27 alelos foram identificados, sendo que destes, seis eram novos alelos (VALLEJO et al., 2014).

Por meio da técnica de PCR-SBT, na raça boliviana Yacumeño foram encontrados 35 alelos e na colombiana Hartón del Valle 24 alelos. Dentro da totalidade de alelos encontrados para as duas raças, cinco destes alelos não haviam sido descritos. Apesar de se tratarem de populações com número reduzido de animais, estes apresentam grande variabilidade genética (GIOVAMBATTISTA et al., 2013). A raça Saavadreño, também oriunda da Bolívia teve 53 alelos identificados por PCR-RFLP e demonstrou-se uma raça com alto nível de heterozigotidade e alta diversidade genética (RIPOLI et al., 2003).

A raça Crioula Lageana, oriunda da serra catarinense, no Sul do Brasil ainda não possui estudos a respeito da diversidade do gene BoLA-DRB3, mas devido a seu potencial produtivo, merece ser avaliada a respeito da sua diversidade genética.

## 5 ALTA VARIABILIDADE DO GENE BoLA-DRB3 EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

### Resumo

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em bovinos é conhecido como BoLA (antígeno leucocitário bovino) e está localizado no cromossomo 23. A região BoLA-DR contém o locus monomórfico BoLA-DRA e três loci BoLA-DRB, sendo que o gene BoLA-DRB3 é o mais expresso e polimórfico. Para a determinação da variabilidade do gene BoLA-DRB3 em bovinos da raça Crioula Lageana, seus alelos foram amplificados utilizando a técnica de PCR-SBT. Os fragmentos foram sequenciados utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle. Os dados brutos das sequências foram analisados através do software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software. A raça Crioula Lageana obteve 44 alelos identificados. Análises estatísticas demonstraram que esta população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observou-se ainda proximidade genética da raça Crioula Lageana com outras raças localmente adaptadas. Conclui-se que a raça Crioula Lageana, apesar de representar uma população pequena, mantém alta diversidade genética, o que, assim como em outras raças crioulas, contribui para a manutenção de características imunológicas desejáveis dentro do ambiente em que se encontra.

**Palavras-chave:** Antígeno. Polimorfismos. Raça Crioula. Sequenciamento.

### 5.1 INTRODUÇÃO

O complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex* – MHC), possui papel fundamental no funcionamento do sistema imune de várias espécies de vertebrados. As moléculas codificadas pelos genes do MHC são capazes de reconhecer e se ligar a peptídeos antigênicos, apresentando-os às células de defesa especializadas, dando início a toda a cadeia de reações do sistema imunológico (KLEIN, 1986).

O MHC em bovinos é conhecido como BoLA (*bovine leukocyte antigen*) e está localizado no cromossomo 23. A região BoLA-DR contém o locus monomórfico BoLA-DRA e três loci BoLA-DRB, sendo que o gene BoLA-DRB3 é o mais expresso e polimórfico (BURKE et al., 1991).

Grandes variações nas sequências alélicas do loci MHC são capazes de identificar e processar maior número de peptídeos antigênicos e assim garantem melhor resposta imune, possibilitando combater maior número de enfermidades (POTTS, SLEV, 1995). O gene BoLA-DRB3 está associado à resistência/susceptibilidade a várias doenças infecciosas, além de estar relacionado à resposta vacinal e à características imunológicas e produtivas (TAKESHIMA; AIDA, 2006; NAYERI; STOTHARD, 2016).

A diversidade do MHC bovino possui grande importância para criadores, médicos veterinários, melhoristas e estudiosos de evolução, uma vez que os processos de adaptação, seleção e as trocas dentro e entre populações (GOSZCZYNSKI et al., 2014; TAKESHIMA et al., 2014).

No estado de Santa Catarina, a introdução de bovinos deu-se com a vinda dos jesuítas para o Rio Grande do Sul e com a invasão das missões pelos bandeirantes (ARAÚJO, 1990). Muitos animais extraviaram-se no caminho e formaram rebanhos nos Campos de Lages. Com a colonização do Planalto Catarinense, a cruz de novos bovinos com os que ali estavam originou a raça Crioula Lageana (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000).

Os animais que se espalharam pela Serra Catarinense por quase cinco séculos sofreram miscigenação e seleção natural em meio às condições pouco favoráveis do Planalto Catarinense, com seus invernos rigorosos e pouco alimento à disposição, resultando em uma raça localmente adaptada com excelente ajuste às condições ambientais da região (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000). Com a vinda de materiais genéticos de bovinos europeus para a região devido seu apelo estético e produtivo, o bovino da raça Crioula Lageana sofreu grande miscigenação e quase foi levado à extinção (MARTINS et al., 2009). Graças ao trabalho de resgate e preservação de alguns animais ainda existentes na região de Lages-SC, tem-se o grupo racial conhecido hoje como Crioula Lageana (CAMARGO; MARTINS, 2005).

Existem hoje diversos trabalhos tratando da diversidade genética do gene BoLA-DRB3 em raças crioulas (GIOVAMBATTISTA et al., 2013; TAKESHIMA et al., 2014; GIOVAMBATTISTA et al., 2020), no entanto, na raça Crioula Lageana este dado ainda é desconhecido. O conhecimento do nível de diversidade genética do gene BoLA-DRB3 é fundamental para a manutenção dos trabalhos de conservação e de melhoria da raça, agregando maior valor econômico aos animais e seus produtos.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Animais e obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de DNA de 208 bovinos da raça Crioula Lageana, todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Adicionalmente, dados prévios de outras raças bovinas foram utilizados para comparações. As

amostras de sangue, das quais foi extraído o DNA, foram colhidas para estudo anterior, aprovados pelo protocolo CETEA nº 2461171115.

O DNA das amostras foi extraído por meio de kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA®), de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do gene BoLA-DRB3 se deu através de PCR em etapa única, com os primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') e HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3') (DUANGJINDA et al., 2013).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 100 Volts e 400mA por 40min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. O fragmento obtido possui tamanho de 284pb do éxon 2 do gene BoLA-DRB3.

### **5.2.2 Genotipagem do gene BoLA-DRB3 por meio da técnica de PCR-SBT (Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing)**

Os alelos BoLA-DRB3 foram genotipados utilizando a técnica de PCR-SBT (TAKESHIMA et al., 2011), usando os primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') e HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3'). Os fragmentos foram sequenciados utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle 137 Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA), pelo método de Sanger. Os dados brutos das sequências foram analisados através do software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software (Conexio Genomics, Fremantle, Australia).

### **5.2.3 Análises estatísticas**

#### *5.2.3.1 Medidas de variabilidade genética*

As frequências alélicas e o número de alelos foram obtidos através de contagem direta. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) para o locus BoLA-

DRB3 foram estimadas de acordo com Nei (1978), utilizando o software ARLEQUIN 3.5 para análise de genética de populações.

Potenciais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram estimados pela estatística  $F_{IS}$  para cada raça utilizando o teste exato incluído no software GENEPOP 4.0.

### 5.2.3.2 Estrutura genética e diferenciação populacional

A estrutura genética e a diferenciação genética entre raças foram obtidas utilizando a estatística  $F$  de Wright, usando o método baseado na variância de Weir e Cockerham (1984). Estes parâmetros foram estimados utilizando os softwares ARLEQUIN 3.5 e GENEPOP 4.0.

### 5.2.3.3 Análise de Componente Principal (PCA)

Para condensar a variação genética do locus BoLA-DRB3, as frequências alélicas foram usadas para realizar a PCA, de acordo com Cavalli-Sforza (1994), utilizando o software PAST.

## 5.3 RESULTADOS

O total de 44 alelos foram identificados na população estudada (Tabela 1). Os alelos *DRB3\*1801*, *DRB3\*2201*, *DRB3\*0101*, *DRB3\*1101*, *DRB3\*1501*, *DRB3\*1601*, *DRB3\*0501*, *DRB3\*0201* e *DRB3\*0701* encontrados na população da raça Crioula Lageana representam 55,47% dos alelos presentes, sendo o alelo mais frequente o *DRB3\*1801*. Os alelos *DRB3\*0802*, *DRB3\*1506*, *DRB3\*1804*, *DRB3\*2214*, *DRB3\*2606*, *DRB3\*5701*, *DRB3\*17601*, *DRB3\*17701*, *DRB3\*17801* e *DRB3\*20101* estão presentes somente na raça Crioula Lageana quando comparada a outras raças crioulas analisadas pelo método de PCR-SBT.

**Tabela 1** - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 208 animais da raça Crioula Lageana.

Alelo BoLA-DRB3	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>DRB3*0101</i>	33	7,93
<i>DRB3*0201</i>	17	4,08

**Tabela 1** - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 208 animais da raça Crioula Lageana.

<b>Alelo BoLA-DRB3</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa</b>
<i>DRB3*0501</i>	21	5,04
<i>DRB3*0503</i>	1	0,24
<i>DRB3*0701</i>	16	3,84
<i>DRB3*0801</i>	3	0,72
<i>DRB3*0802</i>	1	0,24
<i>DRB3*0901</i>	4	0,96
<i>DRB3*0902</i>	5	1,20
<i>DRB3*1101</i>	25	6,00
<i>DRB3*1201</i>	7	1,68
<i>DRB3*1501</i>	23	5,52
<i>DRB3*1506</i>	1	0,24
<i>DRB3*1601</i>	21	5,04
<i>DRB3*1701</i>	11	2,64
<i>DRB3*1703</i>	2	0,48
<i>DRB3*1801</i>	39	9,37
<i>DRB3*1804</i>	2	0,48
<i>DRB3*2002</i>	1	0,24
<i>DRB3*2003</i>	2	0,48
<i>DRB3*2101</i>	2	0,48
<i>DRB3*2201</i>	36	8,65
<i>DRB3*2212</i>	2	0,48
<i>DRB3*2214</i>	1	0,24
<i>DRB3*2406</i>	3	0,72
<i>DRB3*2601</i>	15	3,60
<i>DRB3*2606</i>	1	0,24
<i>DRB3*2801</i>	38	9,13
<i>DRB3*2802</i>	2	0,48
<i>DRB3*3101</i>	2	0,48
<i>DRB3*3701</i>	5	1,20
<i>DRB3*4401</i>	16	3,84
<i>DRB3*5701</i>	2	0,48
<i>DRB3*5702</i>	22	5,28
<i>DRB3*10001</i>	3	0,72
<i>DRB3*16901</i>	3	0,72
<i>DRB3*17001</i>	4	0,96
<i>DRB3*17101</i>	7	1,68

**Tabela 1** - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 208 animais da raça Crioula Lageana.

<b>Alelo BoLA-DRB3</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa</b>
<i>DRB3*17201</i>	2	0,48
<i>DRB3*17401</i>	2	0,48
<i>DRB3*17601</i>	7	1,68
<i>DRB3*17701</i>	2	0,48
<i>DRB3*17801</i>	3	0,72
<i>DRB3*20101</i>	1	0,24

Fonte: elaborada pela autora (2022).

O grande número de alelos presentes na raça Crioula Lageana resultou também em grande diversidade genética, apresentando valores de  $h_o$  e  $h_e$  maiores que 0,90. O teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que a raça Crioula Lageana não apresenta desvio da proporção teórica ( $p=0,3978$ ), portanto não há forças de seleção atuando de modo a mudar a frequência dos alelos presentes (Tabela 2).

Para testar a hipótese de ocorrência de possível seleção por balanceamento na raça Crioula Lageana, o teste de neutralidade exato de Slatkin foi realizado, sendo que valores de  $p$  abaixo de 0,025 para este teste são esperados se a amostra estiver sob seleção por balanceamento, o que não se confirmou para a raça Crioula Lageana ( $p=0,160$ ) (Tabela 2).

Ao se comparar a diversidade genética entre outras populações já estudadas e presentes na literatura, observa-se que a raça Crioula Lageana possui 44 alelos, inferior apenas às raças Brahman Filipina e Bagara que possuem 58 e 47 alelos respectivamente. O valor de  $F_{IS}$  quando positivo, indica que há excesso de homozigotos na população ou déficit de heterozigotos, porém este dado não foi significativo para a raça Crioula Lageana ( $F_{IS}=0,00633$ ;  $p=0,3978$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Número de alelos ( $n_a$ ), heterozigosidade observada ( $h_o$ ) e esperada ( $h_e$ ), Equilíbrio de Hardy-Weingberg (HWE) medido por meio de FIS e Teste de neutralidade exato de Slatkin para o gene BoLA-DRB3

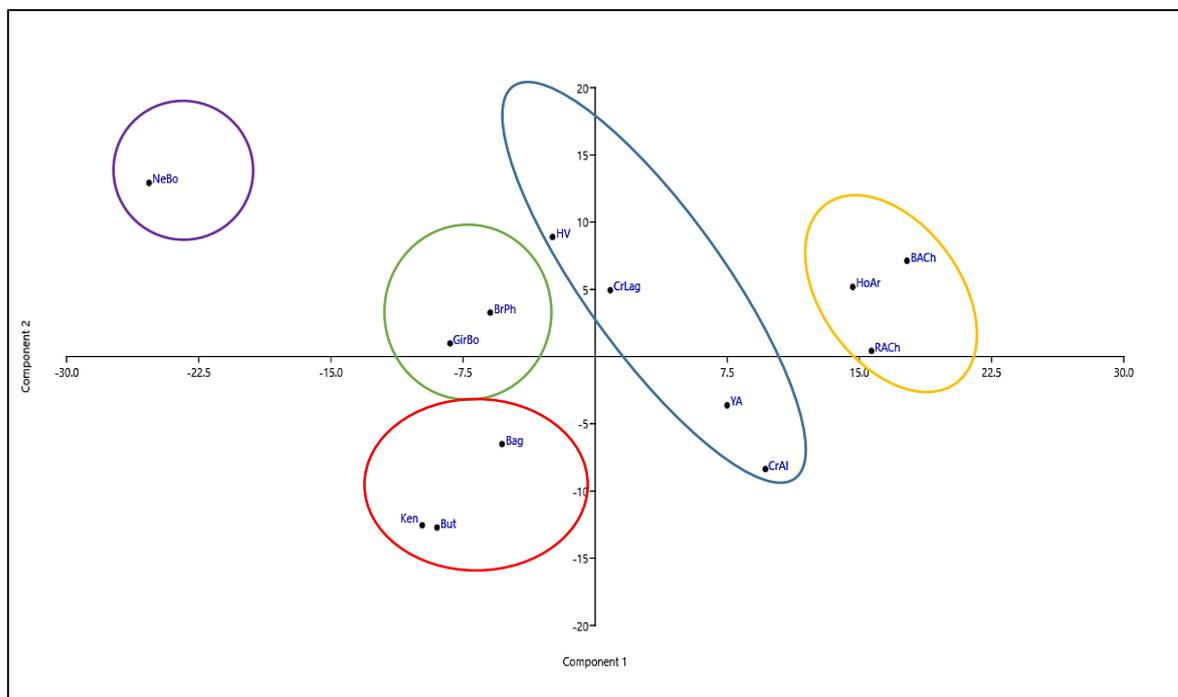
Raça	N	$n_a$	$h_o$	$h_e$	HWE	Teste exato de Slatkin- $p$	Referência
					$F_{IS}$ – valor de $p$		
CrLag	208	44	0,94	0,95	0,00633 – 0,3978	0,160	Presente trabalho
BACH	100	26	0,61	0,90	<b>0,32461</b> – <b>0,0000</b>	0,463	TAKESHIMA et al. (2015a)
BrPh	236	58	0,88	0,95	<b>0,06869</b> – <b>0,0000</b>	0,150	TAKESHIMA et al. (2018)
GirBo	110	19	0,88	0,81	0,04056 – 0,1075	<b>0,010</b>	TAKESHIMA et al. (2018)
HoAr	424	33	0,83	0,90	<b>0,07901</b> – <b>0,0000</b>	0,357	TAKESHIMA et al. (2015b)
HV	66	24	0,97	0,94	-0,03599 – 0,9286	0,144	GIOVAMBATTISTA et al. (2013)
NeBo	116	26	0,78	0,87	<b>0,09901</b> – <b>0,0029</b>	0,290	TAKESHIMA et al. (2018)
RaCh	99	29	0,70	0,93	<b>0,24149</b> – <b>0,0000</b>	0,080	TAKESHIMA et al. (2015a)
YA	112	35	0,91	0,95	0,03437 – 0,1016	<b>0,005</b>	GIOVAMBATTISTA et al. (2013)
CrAl	48	23	0,87	0,93	0,06335 – 0,0198	0,077	GIOVAMBATTISTA et al. (2020b)
Bag	113	47	0,93	0,96	0,03177 – 0,0606	<b>0,023</b>	SALIM et al. (2021)
Ken	52	33	0,96	0,95	-0,01110 – 0,7595	0,250	SALIM et al. (2021)
But	60	34	0,95	0,95	0,0048 – 0,3978	0,227	SALIM et al. (2021)

Fonte: elaborada pela autora (2022). Legenda: CrLag - Crioula Lageana; BaCh - Black Angus Chileno; BrPH - Brhman Filipino; GirBo - Gir Boliviano; HoAr - Holandês Argentino; HV - Hartón Del Valle; NeBo - Nelore Boliviano; RaCh - Red Angus Chileno; YA - Yacumeño; CrAl - Crioulo Argentino; Bag - Bagara; Ken - Kenana; But - Butana.

Para verificar a relação entre as raças comparadas neste estudo, realizou-se a análise de componente principal, sendo que as relações obtidas estão presentes na Figura 1, que ilustra o primeiro e o segundo componente principal (CP) para as frequências dos genes BoLA-DRB3. O primeiro CP descreve 34,17% da variância total. Ao mesmo tempo, este componente ilustra a proximidade existente entre a raça Crioula Lageana e outras raças crioulas como a raça

Yacumeño, Hartón del Valle e Crioula Argentina. A raça Crioula Lageana está localizada próximo ao eixo zero deste componente para o lado positivo, assim como a raça Yacumeño e Crioulo Highland, enquanto temos a raça Hartón del Valle para o lado negativo. O segundo CP descreve 14,64% da variação total e demonstra a proximidade entre a raça Crioula Lageana e a raça Hartón del Valle, Brahman Filipina e Gir Boliviana, além da raça Holandesa Argentina e da Black Angus Chilena para a extremidade positiva e com a raça Yacumeño para a extremidade negativa (Figura 1).

**Figura 1** - Análise de componente principal de 13 raças Crioulas e comerciais baseada nas frequências do gene BoLA-DRB3.



Fonte: elaborada pela autora (2022). Legenda: CrLag - Crioula Lageana; BaCh - Black Angus Chileno; BrPH - Brhaman Filipino; GirBo - Gir Boliviano; HoAr - Holandês Argentino; HV- Hartón Del Valle; NeBo - Nelore Boliviano; RaCh - Red Angus Chileno; YA - Yacumeño; CrAI - Crioulo Argentino; Bag - Baggara; Ken - Kenana; But - Butana.

Os valores de  $F_{ST}$  por pares foi utilizado para a diferenciação entre raças. O valor obtido para o índice  $F_{ST}$  foi baixo mas significativamente diferente de zero ( $F_{ST}=0,042$ ;  $p<0,00001$ ). As comparações entre pares ( $F_{ST}$ ) variaram de 0.00711 entre as raças Butana e Baggara a 0.10855 entre as raças Nelore e Black Angus Chilena. Em se tratando da raça Crioula Lageana, os menores valores de  $F_{ST}$  se deram ao compará-la com a raça Baggara (0.0170), que possui origem sudanesa, com o Red Angus Chileno (0,0171) e com a raça Yacumeño (0,0186), enquanto o maior valor foi encontrado na comparação com a raça Nelore boliviana (0.0435). Os valores de  $F_{ST}$  obtidos para a raça Crioula Lageana demonstraram alto grau de diferenciação

entre ela e as demais raças (Tabela 3). Todas as combinações entre as raças foram estatisticamente significativas ( $p > 0,000001$ ).

**Tabela 3.** Distância genética entre pares de raças bovinas estimada pelo teste  $F_{ST}$  para o gene BoLA-DRB3.

	BACH	BrPh	GirBo	HoAr	H V	NeBo	RaCh	Y A	CrAl	Bag	Ken	But	CrLag
BACH	0												
BrPh	0.0541	0											
GirBo	0.0705	0.0346	0										
HoAr	0.0410	0.0548	0.0589	0									
HV	0.0575	0.0301	0.0418	0.0379	0								
NeBo	0.1085	0.0485	0.0627	0.1048	0.0602	0							
RaCh	0.0190	0.0432	0.0561	0.0275	0.0440	0.0961	0						
Y A	0.0354	0.0282	0.0438	0.0348	0.0347	0.0765	0.0136	0					
CrAl	0.0489	0.0381	0.0548	0.0405	0.0445	0.0929	0.0216	0.01499	0				
Bag	0.0512	0.0240	0.0312	0.0412	0.0237	0.0499	0.0322	0.0191	0.0286	0			
Ken	0.0656	0.0333	0.0426	0.0613	0.0409	0.0550	0.0477	0.0355	0.0410	0.0085	0		
But	0.0634	0.0321	0.0328	0.0585	0.0406	0.0556	0.0451	0.0284	0.0374	0.0071	0.0071	0	
CrLag	0.0351	0.0302	0.0408	0.0332	0.0269	0.0435	0.0171	0.0185	0.0266	0.0170	0.0295	0.0285	0

Fonte: elaborada pela autora (2022). Legenda: CrLag - Crioula Lageana; BaCh - Black Angus Chileno; BrPH - Brhman Filipino; GirBo - Gir Boliviano; HoAr - Holandês Argentino; HV - Hartón Del Valle; NeBo - Nelore Boliviano; RaCh - Red Angus Chileno; YA - Yacumeño; CrAl - Crioulo Argentino; Bag - Bagara; Ken - Kenana; But - Butana.

#### 5.4 DISCUSSÃO

A variabilidade genética é fator essencial para o sucesso de programas de melhoramento genético. As raças localmente adaptadas reúnem características próprias que lhes conferem vantagens em seus ambientes de criação, no entanto, e acordo com a FAO (2015), 17% das raças de animais de produção estão sob risco de extinção. Os cruzamentos indiscriminados entre raças e o aumento do uso de raças exóticas predisõem à perda da variabilidade genética (FAO, 2015). A raça Crioula Lageana, demonstra possuir grande variabilidade genético para o gene BoLA-DRB3, o que pode ser considerado uma vantagem para os programas de conservação da raça e reduz a necessidade de introdução de raças exóticas em cruzamentos.

A raça Crioula Lageana é criada extensivamente na região do Planalto Catarinense, e originou-se a partir dos primeiros bovinos que chegaram ao Brasil, trazidos por colonizadores espanhóis e portugueses. A partir daí a raça passou a sofrer seleção natural, tornando-se muito

adaptada ao ambiente e mostrando grande rusticidade (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000), o que hoje são características muito desejáveis e que geram valor agregado à raça. Através deste estudo, foi possível realizar a primeira caracterização genética do gene BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana, a qual possui extrema importância para o planalto catarinense, utilizando a técnica de PCR-SBT. Através desta análise foi possível identificar 44 alelos no éxon 2 do gene BoLA-DRB3 os quais já haviam sido reportados e que constam no GenBank.

Além da presença na raça Crioula Lageana, os alelos *DRB3\*0802*, *DRB3\*1506*, *DRB3\*1804* estão presentes também em rebanhos da raça Brahman na França (MAILLARD et al., 2003), enquanto os alelos *DRB3\*2214*, *DRB3\*2606*, *DRB3\*5701* foram primeiramente identificados no bovino Amarelo Chinês (WANG et al., 2008). Quando comparada a outras raças crioulas analisadas pelo método de PCR-SBT, os alelos *DRB3\*17601*, *DRB3\*17701*, *DRB3\*17801* e *DRB3\*20101* estão presentes somente na raça Crioula Lageana. O alelo *BoLA-DRB3\*021:01*, identificado neste estudo, só foi encontrado em grupos de raças crioulas e zebuínas até o momento (AHMED et al., 2020; GIOVAMBATTISTA et al., 2020; SALIM et al., 2021).

A diversidade genética ( $h_o$  e  $h_e$ ) e o HWE ( $F_{IS}$ ) foram calculados de modo a estimar o nível de diversidade genética na população e a atuação de forças evolutivas. O grande número de alelos presentes na raça Crioula Lageana resultou também em grande diversidade genética, apresentando valores de  $h_o$  e  $h_e$  maiores que 0,90. Resultados semelhantes já foram encontrados para outras raças bovinas estudadas, também pelo método de PCR-SBT (GIOVAMBATTISTA et al., 2013; GIOVAMBATTISTA et al., 2020; SALIM et al., 2021). O teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) mostrou que a raça Crioula Lageana não apresenta desvio da proporção teórica, ou seja, encontra-se em equilíbrio.

Ainda que com número pequeno de animais (1500) em sua população, a raça Crioula Lageana consegue manter alto nível de variabilidade genética e a manutenção desta diversidade se dá através de mecanismos de seleção. A raça Crioula Lageana encontra-se em HWE, sendo que o excesso ou déficit de heterozigotos não obteve diferença. Sendo assim, não é possível atrelar nenhum tipo específico de força de seleção à manutenção da variabilidade genética da raça, de modo que é possível que apenas uma fraca seleção dentro da população seja suficiente para manter sua diversidade para o gene BoLA-DRB3.

No Planalto Catarinense, a raça Crioula Lageana é criada sob forte pressão ambiental, como doenças parasitárias, estresse pelo frio e pastagem escassa. Por este motivo esperava-se que a raça Crioula Lageana estivesse sob forte pressão de seleção, o que não se confirmou, não sendo possível associar a pressão de seleção com a manutenção da diversidade genética nesta

população. Ainda assim, a grande quantidade de alelos presentes na raça Crioula Lageana pode contribuir para que os animais identifiquem e respondam a uma grande quantidade de diferentes antígenos, da mesma forma que ocorre com animais de raças africanas (SALIM et al., 2021).

O teste de neutralidade de Slatkin mostra evidências de que o perfil de frequências do gene BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana, apresenta distribuição consistente com a proporção teórica esperada para animais que estejam em equilíbrio. Resultados semelhantes foram obtidos para as raças sudanesesas Butana e Kenana (SALIM et al., 2021).

Na análise de componente principal, observou-se a proximidade existente entre raças Crioulas Yacumeño, Hartón del Valle e Crioulo Highland, para as quais é possível diferenciar um cluster específico, o que determina que há grande compartilhamento de alelos entre estas raças. A raça Crioula Lageana ainda mostrou proximidade com outras raças de linhagens *Bos taurus*, como a Holandesa e a raça Angus, demonstrando que também existem alelos em comum com este grupo. As menores proximidades se deram entre a raça Crioula Lageana e as raças *Bos indicus*, indicando que estes grupos possuem diferentes origens. O baixo número de alelos em comum entre as linhagens *Bos taurus* e *Bos indicus* pode ser explicada por inúmeros fatores, como a origem das raças, o tipo de seleção sofrida pela raça, a endogamia e o efeito-fundador, no qual alguns indivíduos isolam-se e estabelecem nova população em outro local (GIOVAMBATTISTA et al., 2013).

É conhecido também o fato de que alguns alelos presentes no gado crioulo foram identificados previamente na raça Brahman, fato esse corroborado por estudos com dados de microsatélites, sugerindo influência dos genes zebuínos no germoplasma do gado crioulo, principalmente por meio de introgressão genética (LIRÓN et al., 2006).

O nível de diferenciação genética entre as raças foi determinado pelo índice  $F_{ST}$ . A média  $F_{ST}$  foi baixa, porém significativa, sendo que este baixo valor pode ser explicado pela alta diversidade dentro da população da raça Crioula Lageana. A raça Nelore e Gir bolivianas foram as que apresentaram a maior distância genética da raça Crioula Lageana através do teste de  $F_{ST}$ , suportando a ideia de que a diversidade genética entre as raças estudadas pode ser parcialmente explicada por sua origem histórica (GIOVAMBATTISTA et al., 2013).

## 5.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a raça Crioula Lageana, apesar de representar uma população pequena, mantém alta diversidade genética para o gene *bola DRB3*, o que contribui para a manutenção de características imunológicas desejáveis dentro do ambiente em que se encontra.

## 6 BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA POSSUEM ALELOS DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR *Anaplasma marginale* E *Babesia bovis*

### Resumo

Em bovinos, o gene BoLA-DRB3 está associado à tolerância a várias doenças, como, neosporose, dermatofilose e mastite. Neste estudo, foi realizado o diagnóstico molecular da infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em 208 bovinos da raça Crioula Lageana e em seguida realizou-se a PCR-SBT e o sequenciamento do gene BoLA-DRB3. Obteve-se a associação entre a presença ou ausência das infecções com os alelos presentes na população através do teste de Qui-quadrado e análise da Odds Ratio. Verificou-se que entre os alelos do gene BoLA-DRB3 encontrados na população, os alelos *BoLA-DRB3\*001:01* ( $p < 0,001$ ;  $OR = 0,224$ ), com frequência de 7,93% na população e *BoLA-DRB3\*024:06* ( $p = 0,007$ ;  $OR < 0,00001$ ), com frequência de 0,72% estão significativamente associados à resistência à infecção por *A. marginale* na raça Crioula Lageana. Em se tratando da infecção por *B. bovis* o alelo *BoLA-DRB3\*011:01* ( $p = 0,002$ ;  $OR = 0,271$ ), com frequência de 6% na população, está associado à resistência à infecção. Quanto à *B. bigemina*, nenhum dos alelos obteve associação com a resistência à infecção pelo agente. Concluímos que a raça Crioula Lageana possui alelos que podem lhe conferir resistência contra a infecção por *A. marginale* e *B. bovis*.

**Palavras-chave:** Alelo. Raça Crioula. PCR. *Anaplasma*. *Babesia*.

### 6.1 INTRODUÇÃO

As raças bovinas localmente adaptadas possuem inegável importância sob o ponto de vista da sustentabilidade e segurança alimentar. A variabilidade genética que estes recursos animais apresentam são importantes diante dos desafios ambientais futuros, como as mudanças climáticas, para a melhoria de características produtivas importantes e para o atendimento de demandas dos consumidores (FIORAVANTI et al., 2020). Há também o entendimento de que a variabilidade genética proporcionada por estas raças leva a maiores chances de resistência à diversas enfermidades dos rebanhos (SPRINGBETT et al., 2003).

Entre as enfermidades mais prevalentes nos rebanhos bovinos, a anaplasmosose, causada pelo agente *Anaplasma marginale*, é uma doença causadora de enormes prejuízos econômicos decorrentes da alta morbidade e mortalidade e dos custos com controle da enfermidade (BROWN, 1997). Assim como a babesiose, que quando se manifesta clinicamente, leva à alta morbidade e mortalidade, além de perda da eficiência produtiva, gerando grandes prejuízos econômicos (MAHMMOD, 2012).

Os altos custos com tratamentos e prejuízos com perdas de animais acometidos pela anaplasmosose e pela babesiose exigem novas alternativas para o controle destas enfermidades,

sendo uma das mais promissoras, a seleção de animais com genótipos de resistência às enfermidades clínicas (STELLA et al., 2002; SCHROOTEN et al., 2005). Estes animais são importantes fontes de material genético para o melhoramento de rebanhos susceptíveis às hemoparasitoses. Sob este aspecto, vários estudos comprovaram a importância do locus BoLA-DRB-3.2 com a resistência à diversas enfermidades (SHARIF et al., 1998; KULBERG et al., 2007; RUPP et al., 2007).

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) caracteriza-se por uma íntima relação entre genes que desempenham papel na resistência/susceptibilidade à doenças infecciosas, além de atuar sobre a resposta imune inata e adaptativa (PENN, 2002). Em bovinos, o MHC (BoLA – *Bovine Leukocyte Antigen*) está situado no cromossomo 23 (STAFUZZA et al., 2013) e seus genes estão agrupados em três classes, I, II e III, de acordo com sua função (MOSAFER et al., 2012). Os genes da classe II são os mais estudados e encontram-se divididos em duas regiões separadas do cromossomo. Essas duas partes são conhecidas como IIa e IIb (IANNUZZI et al., 1993; STAFUZZA et al., 2013).

A classe IIa possui duas sub-regiões, uma composta pelos genes da família DQ (DQA e DQB) e outra pelos genes da família DR (DRA e DRB). (DONGXIAO; YUAN, 2003). Na espécie bovina, existem pelo menos três genes da família DRB descritos, o DRB1, considerado um pseudogene; o DRB2, pouco expresso e o gene DRB3, descrito como altamente expresso e polimórfico (KUMAR et al., 2011) e que está associado à tolerância a várias doenças, como por exemplo, neosporose (SCHWAB et al., 2009), dermatofilose (MAILLARD et al., 1996) e mastite (IBRAHIM et al., 2012).

A raça Crioula Lageana já acumulou quase cinco séculos de seleção natural, e possui características referentes à resistência às doenças e aos parasitas (MARIANTE et al. 2005). Acredita-se que o desafio das condições climáticas extremas durante os rigorosos invernos da região Sul, a ausência de alimento, os predadores e o próprio abandono nas grandes extensões rurais, contribuíram para a formação de uma raça adaptada às condições ambientais das regiões de altitude e ao clima subtropical (CAMARGO; MARTINS, 2005).

Sendo assim, a presença de alelos de resistência à babesiose e anaplasiose nas raças localmente adaptadas, como a raça Crioula Lageana, associados ao potencial produtivo evidencia sua importância como fonte de material genético para outros rebanhos. Desse modo é possível incrementar a resistência dos animais às hemoparasitoses, reduzindo assim custos com tratamentos, prejuízos com perdas de animais e presença de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal, assegurando a produção sustentável a partir de raças localmente adaptadas.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Animais e obtenção das amostras

Foram utilizadas 208 amostras de DNA de bovinos da raça Crioula Lageana, incluindo-se animais jovens e adultos, machos e fêmeas, de todas as categorias disponíveis (touro, vaca, bezerro e novilha).

As amostras de sangue, das quais foi extraído o DNA, foram colhidas para estudo anterior, aprovado pelo protocolo CETEA nº 2461171115.

### 6.2.2 Exame físico

O exame físico foi realizado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com as doenças clínicas, onde se aferirá a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

### 6.2.3 Análise molecular

As técnicas de PCR e nested-PCR (n-PCR) foram usadas para a amplificação do DNA de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. Para *A. marginale*, foi realizada apenas uma reação de PCR, com primers baseados no gene MSP5 do agente da anaplasmosse. Os conjuntos de primers usados nas reações de PCR e Nested-PCR para *B. bovis* e *B. bigemina* foram os descritos por Figueroa et al. (1993). A reação de PCR deu-se em microtubos de 0,2mL, onde foi adicionado um volume final de 25µL de solução, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer, 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/µL) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. O mesmo mix de reação foi usado para a n-PCR, substituindo-se apenas o DNA dos animais por 2µL do produto da primeira PCR, e os primers utilizados pelos específicos para a n-PCR.

As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler®) para as duas reações envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 458pb para *A. marginale*, 350pb para *B. bovis* e 278pb para *B. bigemina* foram consideradas positivas na primeira reação e bandas com tamanho aproximado de 290pb para *B. bovis* e 170pb para *B. bigemina* foram consideradas positivas na segunda reação.

#### **6.2.4 Genotipagem do gene BoLA-DRB-3.2**

A amplificação do gene BoLA-DRB3 se deu através de PCR em etapa única, com os primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') e HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3') (DUANGJINDA et al., 2013).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 100 Volts e 400mA por 40min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. O fragmento obtido possui tamanho de 284pb do éxon 2 do gene BoLA-DRB3.

Os produtos desta reação de PCR foram então encaminhados para sequenciamento.

#### **6.2.5 Análise estatística**

A frequência alélica e o número de alelos para ambos os genes foram obtidos por meio de contagem direta.

A associação entre cada alelo encontrado com a infecção por cada patógeno foi dada por meio de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ), seguido pela análise da Odds Ratio. Alelos com  $OR < 1$  são considerados de resistência e alelos com  $OR > 1$  são considerados alelos de susceptibilidade.

### 6.3 RESULTADOS

A partir do exame clínico realizado amostrados, observou-se que nenhum animal da raça Crioula Lageana apresentava sinais clínicos compatíveis com anaplasmose ou babesiose.

A partir do diagnóstico molecular realizado para os agentes *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, obteve-se as seguintes proporções de ocorrência das infecções para os 208 animais da raça Crioula Lageana (Tabela 4).

**Tabela 4** – Proporção absoluta e relativa de animais da raça Crioula Lageana positivos e negativos para os agentes *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

Proporções	<i>Anaplasma marginale</i>		<i>Babesia bovis</i>		<i>Babesia bigemina</i>	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Absoluta	165	43	144	64	127	81
Relativa	79,3%	20,7%	69,2%	30,8%	61,0%	39,0%

Fonte: elaborado pela autora.

Na análise de associação baseada no teste de Qui-quadrado e análise da Odds Ratio, verificou-se que entre os alelos do gene BoLA-DRB3 encontrados na população, os alelos *BoLA-DRB3\*001:01* ( $p < 0,001$ ;  $OR = 0,224$ ), com frequência de 7,93% na população e *BoLA-DRB3\*024:06* ( $p = 0,007$ ;  $OR < 0,00001$ ), com frequência de 0,72% estão significativamente associados à resistência à infecção por *A. marginale* na raça Crioula Lageana.

Em se tratando da infecção por *B. bovis* o alelo *BoLA-DRB3\*011:01* ( $p = 0,002$ ;  $OR = 0,271$ ), com frequência de 6% na população, está associado à resistência à infecção. Quanto à *B. bigemina*, nenhum dos alelos obteve associação com a resistência à infecção pelo agente.

### 6.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho de associação dos alelos BoLA-DRB3 com a infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos no Brasil, bem como na raça Crioula Lageana.

Entre as raças Crioulas, somente na raça Hartón del Valle já se realizaram estudos de associação dos alelos BoLA-DRB3 utilizando o método de PCR-SBT para a genotipagem dos alelos e determinação de possível resistência à leucose (HERNÁNDEZ et al, 2011; HERNÁNDEZ et al., 2014).

No estado de Santa Catarina, a região do Planalto Catarinense já foi classificada como sendo de instabilidade enzoótica para a anaplasmose, com prevalência de 27,24% de amostras positivas no rebanho geral (VIEIRA, 2019), inclusive com a ocorrência de um surto da doença nesta região (CANEVER et al., 2014). Nas propriedades criadoras da raça Crioula Lageana, a prevalência obtida foi de 79,74%, e a instabilidade enzoótica não se confirmou (CASA et al., 2020).

Variações na prevalência da enfermidade podem estar associadas à época de colheita das amostras, sendo que no período em que foram realizadas as colheitas de sangue deste estudo, entre o verão e o outono, há maior eclosão de larvas de carrapatos e conseqüentemente mais bovinos parasitados (SOUZA et al., 1988), favorecendo a infecção por *A. marginale*. Para o presente estudo, a proporção de animais infectados por *A. marginale* foi de 79,3%, sem que nenhum animal apresentasse sinais clínicos da doença (Tabela 4).

A ausência de um controle regular dos vetores e a criação extensiva dos animais, favorece o contato constante com o hemoparasito, reforçando sua imunidade contra o agente causador da doença clínica, o que não necessariamente estaria atrelado à presença de certos alelos do gene BoLA-DRB3 na população, uma vez que nenhum animal da população amostrada apresentava sinais clínicos.

Para *Anaplasma marginale*, verificou-se que animais *Bos taurus* puros são mais suscetíveis à doença clínica quando comparados à animais oriundos de cruzas de *B. taurus* com *B. indicus* e animais puros *B. indicus* (BOCK et al., 1997). Fato este que não foi confirmado na raça Crioula Lageana, pertencente à linhagem *Bos taurus*.

Em relação às babesioses, os dados obtidos para o estado de Santa Catarina apontaram que a prevalência de *B. bovis* no rebanho geral é de 29,57% e de *B. bigemina* é de 16,73% (VIEIRA et al., 2019). A ocorrência obtida para estes agentes neste estudo foi bem superior para a raça Crioula Lageana (69,2% para *B. bovis* e 61% para *B. bigemina*), ainda assim, nenhum animal apresentou sinais clínicos das enfermidades.

Cabe salientar que ainda não se conhecem todos os genes envolvidos na expressão da resistência às babesioses, mas sabe-se que é uma característica hereditária (BILHASSI et al., 2014) e que animais *Bos taurus indicus* tendem a ser mais resistentes às babesias e ao seu vetor do que animais *Bos taurus taurus* (JONSSON et al, 2008; PIPER et al, 2010). Entretanto, os

animais da raça Crioula Lageana, mesmo pertencendo à linhagem *Bos taurus taurus* não desenvolvem a doença clínica, mesmo com grande número de animais portando o agente.

Em se tratando de possível resistência genética para estas enfermidades, o alelo *BoLA-DRB3\*011:01* é frequentemente encontrado em raças Crioulas e já foi associado à resistência à infecção por *B. bigemina* (BOLAÑOS et al., 2017), o que não se confirmou na raça Crioula Lageana, ainda que seja um alelo com alta frequência na população. A diferença de metodologia utilizada na identificação dos alelos, bem como a proporção de animais infectados neste estudo podem justificar a associação ou não do alelo com a enfermidade.

Após genotipagem pelo método de PCR-RFLP, Duangjinda et al. (2013) identificaram os seguintes alelos de resistência: para *A. marginale*, os alelos \*14 e \*41; para *B. bovis* o alelo \*14 e para *B. bigemina* os alelos \*10 e \*51. Reitera-se aqui o fato de que a PCR-RFLP possui precisão inferior ao método de PCR-SBT, de modo que alguns padrões encontrados podem não corresponder exatamente ao alelo que se espera.

Neste estudo, foi possível estabelecer associação entre os alelos *BoLA-DRB3\*001:01* e *BoLA-DRB3\*024:06* e a infecção por *A. marginale* na raça Crioula Lageana. Da mesma forma, o alelo *BoLA-DRB3\*011:01* associado à resistência à infecção por *B. bovis*. Quanto à *B. bigemina*, nenhum dos alelos obteve associação com a resistência à infecção pelo agente. O alelo *BoLA-DRB3\*001:01* já foi associado à resistência à mastite no gado Holandês (YOSHIDA et al., 2012), enquanto o alelo *BoLA-DRB3\*011:01* já foi associado à resistência à infecção por *B. bigemina* e também à resistência à leucose bovina na raça Hartón del Valle (HERNÁNDEZ et al., 2011; BOLAÑOS et al., 2017), além de também estar associado à resistência à mastite (YOSHIDA et al., 2012). O alelo *BoLA-DRB3\*024:06* já foi descrito anteriormente em raças africanas, incluindo-se raças sudanesas (SALIM et al., 2021), mas não foi associado ainda a nenhum tipo de enfermidade.

Em estudo comparativo entre as raças Aberdeen Angus e Crioula Lageana, comprovou-se que esta última apresenta maior resistência à infestação por bernes e carrapatos (CARDOSO et al., 2014). Estes dados demonstraram que há muitos outros fatores envolvidos com a resistência ou susceptibilidade à anaplasnose ou babesiose. A linhagem, o contato com vetores e a adaptação dos animais ao ambiente também precisam estar em consonância com a genética dos animais.

Além da resistência dos animais à infecção propriamente dita pelos agentes da anaplasnose e da babesiose, pode estar ocorrendo a resistência ao vetor das enfermidades. Os alelos *BoLA-DRB3* já foram associados à resistência ao carrapato *Rhipicephalus boophilus*

*microplus* (MARTINEZ et al., 2006), o que influenciaria diretamente a aquisição da infecção pelos animais.

Os dados referentes a alelos de resistência podem auxiliar programas de melhoramento animal, no entanto, em se tratando das hemoparasitoses exploradas neste estudo, ressalta-se a importância da manutenção de indivíduos susceptíveis nos rebanhos, de modo a manter a estabilidade dos agentes na população e também a heterozigosidade dos indivíduos, a qual é fundamental para elevar a resposta imune à diversos tipos de infecção.

## 6.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a raça Crioula Lageana possui alelos associados à resistência à infecção por *A. marginale* e *B. bovis*, reforçando a necessidade de se manter a variabilidade e heterozigosidade do rebanho. Novos estudos, que relacionem os achados genéticos à variações ambientais e de manejo também devem ser realizados para o complemento dos fatores que podem levar os animais da raça Crioula Lageana a adquirirem resistência à enfermidades.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos que a raça Crioula Lageana, apesar de representar uma população pequena, mantém alta diversidade genética, o que, assim como em outras raças Crioulas com as quais compartilha certos alelos, é uma condição altamente desejável, contribuindo para a manutenção de suas características imunológicas dentro do ambiente em que se encontra, além da importância que a variabilidade representa para a manutenção e conservação da raça.

Porém, apesar da alta diversidade genética presente na população, poucos alelos puderam ser associado à resistência à infecções por *A. marginale* e *B. bovis*, e nenhum alelo foi associado à infecção por *B. bigemina*. Estes dados reforçam o fato de que há outros fatores relacionados à resistência à enfermidades e que devem ser levados em consideração.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, R. O. et al. Identification of BoLA DRB3. 2 alleles present in White Fulani and Muturu cattle breeds. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 4, p. 725-734, 2020.
- ALTMANN, D. M.; TROWSDALE, J. Major histocompatibility complex structure and function. **Current opinion in immunology**, v. 2, n. 1, p. 93-98, 1989.
- AMILLS, M. et al. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.
- AN, T. W. et al. Polymorphic but highly conserved Bogr-DRA gene in yak (*Bos grunniens*). **Animal genetics**, v. 43, n. 2, p. 237-238, 2011.
- ARAÚJO, R.V. **Os jesuítas dos 7 povos**. Porto Alegre: La Salle, 1990. 467p.
- BALTIAN, L. R. et al. Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia/susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. **Ciencia Veterinaria**, v. 18, p. 9-27, 2016.
- BENSAID, A. et al. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. **Immunogenetics**, v. 33, n. 4, p. 247-254, 1991.
- BILHASSI, T.B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234-238, 2014.
- BISHOP, S. C. A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 168, 2012.
- BISHOP, S. C. Disease resistance: genetics. In: WG. Pond, & AW. Bell (Eds.), **Encyclopedia of Animal Science**, p. 288-290, 2010.
- BISHOP, S. C.; WOOLLIAMS, J. A. Genomics and disease resistance studies in livestock. **Livestock science**, v. 166, p. 190-198, 2014.
- BJORKMAN, P. J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 506-512, 1987.
- BOCK, R.E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.
- BOLAÑOS, I.; HERNÁNDEZ, D.; ÁLVAREZ, L. Asociación de los alelos del gen BoLA-DRB3 con la infección natural de *Babesia* spp en el ganado criollo Hartón del Valle. **Archivos de zootecnia**, v. 66, n. 253, p. 113-120, 2017.
- BROWN, C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, n. 4 Suppl, p. 1S-3S, 1997.

BURKE, M. G.; STONE, R. T.; MUGGLI-COCKETT, N. E. Nucleotide sequence and Northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR $\beta$ -like cDNA. **Animal genetics**, v. 22, n. 4, p. 343-352, 1991.

CAMARGO, M. A. R.; MARTINS, V. M. V. Raça bovina Crioula Lageana, um patrimônio genético. **Hora Veterinária**, v. 24, n. 143, p. 61-64, 2005.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

CARDOSO, C.P. et al. Resistance against ectoparasites in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil under natural conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 2014.

CASA, M. S. et al. High prevalence of *Anaplasma marginale* in the Crioula Lageana cattle. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 06, p. 623-630, 2020.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**. v.84, p. 520-525, 2006.

CAVALLI-SFORZA, L. L. et al. **The history and geography of human genes**. Princeton university press, 1994.

COUSSENS, P. M.; NOBIS, W. Bioinformatics and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 3-4, p. 229-244, 2002.

DAOUS, H. E. et al. Relationship between Allelic Heterozygosity in BoLA-DRB3 and Proviral Loads in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 647, 2021.

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. 39, n. 6, p. 508-519, 2012.

DAVIES, C. J. et al. Characterization of bovine MHC class II polymorphism using three typing methods: serology, RFLP and IEF. **International Journal of Immunogenetics**, v. 19, n. 5, p. 253-262, 1992.

DAVIES, C. J. et al. Polymorphism of Bovine MHC Class II Genes. Joint Report of the Fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop, Interlaken, Switzerland, 1 August 1992. **European journal of immunogenetics: official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 21, n. 4, p. 259-289, 1994.

DIETZ, A.B. et al. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 haplotypes with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 400-405, 1997.

DOESCHL-WILSON, A. B. et al. Novel methods for quantifying individual host response to infectious pathogens for genetic analyses. **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 266, 2012.

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

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, n. 3-4, p. 314-320, 2013.

EDWARDS, S. V.; HEDRICK, P. W. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. **Trends in ecology & evolution**, v. 13, n. 8, p. 305-311, 1998.

EIRIN, M. et al. BoLA-DRB3 exon2 polymorphisms among tuberculous cattle: Nucleotide and functional variability and their association with bovine tuberculosis pathology. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 118-125, 2020.

FAO. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. In: **FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments**. Rome, 2015.

FERNÁNDEZ, I. G. et al. Creole cattle from northwestern Mexico has high genetic diversity in the locus DRB3. 2. **Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales**, v. 57, p. 31-38, 2015.

FIORAVANTI, M.C.S. et al. Resistance and resilience to diseases in local ruminant breeds: a focus on South America. **Archivos de zootecnia**, v. 69, n. 267, p. 338-352, 2020.

FRIES, R.; EGGEN, A.; WOMACK, J. E. The bovine genome map. **Mammalian Genome**, v. 4, n. 8, p. 405-428, 1993.

GIOVAMBATTISTA, G. et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. **Gene**, v. 519, n. 1, p. 150-158, 2013.

GIOVAMBATTISTA, G. et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in global cattle breeds, with a- focus on cattle in Myanmar. **BMC genetics**, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2020a.

GIOVAMBATTISTA, Guillermo et al. BoLA-DRB3 genetic diversity in Highland Creole cattle from Bolivia. **HLA**, v. 96, n. 6, p. 688-696, 2020b.

GOSZCZYNSKI, Daniel Estanislao et al. Haplotype determination of the upstream regulatory region and the second exon of the BoLA-DRB3 gene in Holstein cattle. **Tissue Antigens**, v. 83, n. 3, p. 180-183, 2014.

GRENFELL, B. T.; DOBSON, A. P.; MOFFATT, H. K. (Ed.). **Ecology of infectious diseases in natural populations**. Cambridge University Press, 1995.

GRISART, Bernard et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome research**, v. 12, n. 2, p. 222-231, 2002.

- GROENEN, M. A. M. et al. Cloning of the bovine major histocompatibility complex class II genes. **Animal genetics**, v. 20, n. 4, p. 267-278, 1989.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 349-360, 2004.
- HE, Feng et al. Association between SNPs within prolactin gene and milk performance traits in Holstein dairy cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1384-1389, 2006.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. In: **AICA**. 2011. p. 169-172.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3. 2\* en ganado criollo colombiano. **Revista MVZ Córdoba**, v. 18, p. 3665-3671, 2013.
- HERNÁNDEZ, D.Y.H. et al. Asociación del locus BOLA-DRB3. 2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. **Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA**, v. 6, n. 2, p. 319-326, 2014.
- HILL, A. V. S. The immunogenetics of human infectious diseases. **Annual review of immunology**, v. 16, n. 1, p. 593-617, 1998.
- IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex in cattle and river buffalo by fluorescent in situ hybridization. **Hereditas**, v. 118, p. 187-190, 1993.
- IBRAHIM, E. A. et al. Sequence-based typing-study on the relationship between subclinical mastitis and BoLA-DRB3.2 allelic polymorphism in Egyptian cows. **Global Veterinaria**, v. 9, p. 8-22, 2012.
- 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**, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2006.
- KELM, S.C. et al. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstien cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1767-1775, 1997.
- KLEIN, J. **Natural history of the major histocompatibility complex**. 1 ed. John Wiley and Sons: Nova York, 1986. 775 p.
- KULBERG, S. et al. Study on the association of BoLA-DRB3. 2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 4, p. 201-207, 2007.
- KUMAR, S. et al. Polymorphism in DRB3 exon by PCR-RFLP and its association with mastitis in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 232-234, 2011.

LIRÓN, J. P.; PERAL-GARCÍA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Genetic characterization of Argentine and Bolivian Creole cattle breeds assessed through microsatellites. *Journal of Heredity*, v. 97, n. 4, p. 331-339, 2006.

MAHMMOD, Y. Molecular detection of natural *Babesia bovis* infection from clinically infected and apparently healthy water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and crossbred cattle. *Journal of Buffalo Science*, v. 1, n. 1, p. 55-60, 2012.

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

MAILLARD, J. C. et al. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics*, v. 30, n. 3, p. 200-203, 1999.

MAILLARD, J.-C. et al. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genetics Selection Evolution*, v. 35, n. 1, p. 1-8, 2003.

MARIANTE, A. da S. et al. Conservação de raças brasileiras ameaçadas de extinção e a importância de sua inserção em sistemas de produção. *Agrociencia*, v. 9, n. 1-2, p. 459-464, 2005.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232p.

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

MARTINS, V.M.V. et al. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Lages: ABCCL. 2009. 80p.

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, n. 9, p. 311-324, 2001.

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 science*, v. 95, n. 1, p. 420-431, 2012.

MIYASAKA, Taku 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, n. 1-2, p. 42-49, 2011.

MOHAMED, T. R.; AL-ANBARI, N. N.; AL-WAITH, H. K. Association between DRB3 gene Polymorphism and reproductive, immunity performance and heat tolerance in Holstein cow. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 6, n. 2, p. 2336 – 2339, 2018.

- MOSAFER, J. et al. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of two new alleles in Iranian buffalo breed. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- MULDER, H. A.; RASHIDI, H. Selection on resilience improves disease resistance and tolerance to infections. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 8, p. 3346-3358, 2017.
- NAYERI, S.; STOTHARD, P. Tissues, metabolic pathways and genes of key importance in lactating dairy cattle. **Springer Science Reviews**, v. 4, n. 2, p. 49-77, 2016.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- PENN, D.J. Major Histocompatibility Complex (MHC). **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-7, 2002.
- PIPER, E.K. et al. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431-441, 2010.
- POTTS, W. K.; SLEV, P. R. Pathogen-based models favoring MHC genetic diversity. **Immunological reviews**, v. 143, p. 181-197, 1995.
- RABERG, Lars; GRAHAM, Andrea L.; READ, Andrew F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 37-49, 2009.
- RIPOLI, M. V. et al. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. **Biochemical Genetics**, v. 42, n. 7, p. 231-240, 2004.
- RUPP, R.; HERNANDEZ, A.; MALLARD, B. A. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3. 2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 1029-1038, 2007.
- SALIM, B. et al. BoLA-DRB3 gene haplotypes show divergence in native Sudanese cattle from taurine and indicine breeds. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.
- SCHROOTEN, C. et al. Genetic progress in multistage dairy cattle breeding schemes using genetic markers. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 4, p. 1569-1581, 2005.
- 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. et al. Polymorphisms in MHC-DRA and-DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Animal Genetics**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2003.

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, n. 3, p. 185-193, 1998.

SIGURDARDOTTIR, S. et al. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v. 22, n. 3, p. 199-209, 1991.

SOUZA, A. P. et al. Variação Sazonal de *Boophilus microplus* no Planalto Catarinense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 627-630, 1988.

SPOONER, R. L. et al. Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes. Joint report of the 1st International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) workshop. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics**, v. 10, n. 2, p. 63-86, 1979.

SPRINGBETT, A. J. et al. The contribution of genetic diversity to the spread of infectious diseases in livestock populations. **Genetics**, v. 165, n. 3, p. 1465-1474, 2003.

STAFUZZA, N. B. et al. A high resolution radiation hybrid map of the river buffalo major histocompatibility complex and comparison with BoLA. **Animal Genetics**, v. 44, p. 369-376, 2013.

STELLA, A. et al. Strategies for continual application of marker-assisted selection in an open nucleus population. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 9, p. 2358-2367, 2002.

SUPROVYCH, T. M. et al. Genetic variability and biodiversity of Ukrainian Gray cattle by the BoLA-DRB3 gene. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 12, n. 1, p. 33-41, 2021.

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. N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 2, p. 138-150, 2006.

TAKESHIMA, S.-N. et al. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 3, p. 208-213, 2011.

TAKESHIMA, S. -N. et al. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. **Meta gene**, v. 2, p. 176-190, 2014.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Assessment of biodiversity in Chilean cattle using the distribution of major histocompatibility complex class II BoLA-DRB3 allele. **Tissue Antigens**, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015a.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 6, p. 419-430, 2015b.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Genetic diversity of BoLA-DRB3 in South American Zebu cattle populations. **BMC genetics**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.

VALLEJO, A. R. et al. Polimorfismos del gen BoLA DRB3–exón 2 en bovinos criollos peruanos mediante el método SSCP. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA**, v. 4, p. 129-131, 2014.

VIEIRA, L. L. et al. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite epidemiology and control**, v. 6, p. e00114, 2019.

VILLALOBOS-CORTÉZ, A.; GONZÁLEZ, R. Secuencias del Gen BOLA-DRB3.2 de Bovinos Guaymí y Guabalá de Panamá. **Ciencia Agropecuaria**, n. 28, p. 22-36, 2018.

WANG, K.; SUN, D.; ZHANG, Y. Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 alleles. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, n. 4-5, p. 331-332, 2008.

WEIR, Bruce S.; COCKERHAM, C. Clark. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **evolution**, p. 1358-1370, 1984.

YOSHIDA, T. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. **Animal science journal**, v. 83, n. 5, p. 359-366, 2012.

ZHOU, H. et al. Identification of allelic variation at the bovine DRA locus by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 4, p. 1943-1946, 2007.