

## ASSOCIAÇÃO DO GENE BOLA-DRB3.2 COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM BOVINOS F<sub>2</sub> HOLANDÊS : GIR<sup>1</sup>

### AUTORES

Marco Antonio Machado<sup>2</sup>, Mário Luiz Martinez<sup>2</sup>, Marcos Vinícius G. Barbosa da Silva<sup>2</sup>, Carlos Souza do Nascimento<sup>3</sup>, Ana Lúcia Campos<sup>2</sup>, Marta Fonseca Martins Guimarães<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Financiado parcialmente pelo CNPq e PRODETAB

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite - Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco – Juiz de Fora – MG, 36038-330

Tel.: (32) 3249-4700 Fax: (32) 3249-4721

E-mail: machado@cnpqgl.embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista de Apoio Técnico da FAPEMIG

### RESUMO

O complexo maior de histocompatibilidade bovino (BoLA) consiste de vários locos fortemente ligados entre si, cujos genes codificam moléculas da superfície celular relacionadas à resposta imunológica. Seu efeito sobre a saúde animal pode ser resultante da ação direta dos alelos BoLA sobre as funções imunológicas, enquanto o efeito indireto sobre as características de produção pode ser explicado por melhores condições gerais de saúde dos indivíduos mais produtivos. Os alelos do gene BoLA-DRB3.2 foram identificados utilizando-se a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). As associações entre os alelos do gene BoLA-DRB3.2 e características de crescimento, em uma população F<sub>2</sub>, foram estudadas por meio da análise de dados moleculares e fenotípicos, utilizando-se a metodologia do modelo misto, por meio de um modelo animal. Os dados moleculares consistiram dos genótipos dos animais para os alelos do gene BoLA-DRB3.2 e os fenotípicos foram referentes aos pesos ao nascimento, aos 60 dias, aos 205 dias e aos 365 dias de idade, bem como dos ganhos de peso do nascimento aos 60 dias de idade, de 60 a 205 dias e de 205 a 365 dias. Os resultados permitiram concluir que esse gene é polimórfico no grupamento genético F<sub>2</sub>. Verificou-se que o alelo BoLA-DRB3.2\*11 estava significativamente associado com menores pesos aos 205 dias de idade e ganhos de peso do nascimento aos 60 dias e dos 60 dias aos 205 dias de idade, indicando que o próprio gene BoLA-DRB3.2, ou um QTL (*Quantitative Trait Loci*) ligado a ele, influencia essas características.

### PALAVRAS-CHAVE

antígeno linfocitário bovino, complexo maior de histocompatibilidade, características de crescimento

### TITLE

ASSOCIATION OF BOLA-DRB3.2 GENE WITH GROWTH TRAITS IN A BOVINE F<sub>2</sub> HOLSTEIN X GYR POPULATION

### ABSTRACT

The bovine major histocompatibility complex (BoLA) consists of several tightly linked loci whose genes encode cell surface molecules involved in the immune response. The effect on health can be explained through direct influence of BoLA alleles on immune functions and their indirect effect on the production traits by improving general health. Allele genotypes of BoLA-DRB3.2 gene were identified by PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). The association between BoLA-DRB3.2 alleles and growth traits in F<sub>2</sub> population was studied using molecular and phenotypic data. Genetic data consisted of animal genotypes for BoLA-DRB3.2 alleles and phenotypic data included birth weight, weight at 60 days, weight at 205 days and weight at 365 days of age and average daily gains from birth to 60 days, from 60 to 205 days and from 205 to 365 days. The association between BoLA-DRB3.2 alleles and a putative QTL (*Quantitative Trait Loci*) affecting the trait was investigated using a mixed animal model. BoLA-DRB3.2 gene was found to be highly polymorphic in this population. The BoLA-DRB3\*11 was found to be significantly associated with lower weights at 205 days and daily gains from birth to 60 days, from 60 to 205

days, which indicates that BoLA-DRB3.2 gene itself or a linked QTL influences these traits.

## KEYWORDS

bovine lymphocyte antigen, growth traits, major histocompatibility complex

## INTRODUÇÃO

O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) tem sido estudado em mamíferos, pois está relacionado à regulação da resposta imunológica e à resistência a doenças. Em bovinos, esse complexo é chamado de antígeno leucocitário bovino (BoLA) e foi mapeado no braço curto do cromossomo 23. O BoLA consiste de vários locos ligados entre si, cujos genes codificam moléculas da superfície celular relacionadas à resposta imunológica (Alizadeh *et al.*, 2003) e formam um sistema polimórfico, encontrado em vertebrados superiores e que codificam duas classes de proteínas (I e II) das células do sistema imunológico. Nesta última classe, predomina o loco DR, formado por duas cadeias: uma monomórfica (DRA) e outra polimórfica, denominada DRB3.

A influência do loco BoLA sobre as características produtivas e as relacionadas à saúde pode ser dada por um efeito direto, ou seja, ação dos alelos BoLA sobre as funções imunológicas, e/ou, também, pelo efeito indireto sobre as características de produção, o qual pode ser explicado de duas maneiras. A primeira é que indivíduos que possuam melhores condições gerais de saúde podem apresentar maior crescimento e produção; e a segunda é a possível existência de ligação do loco BoLA com locos de características quantitativas (QTLs).

Neste trabalho, objetivou-se verificar a associação de alelos do loco BoLA-DRB3.2 com características de crescimento em bovinos da geração F<sub>2</sub>, oriundos dos cruzamentos entre animais F<sub>1</sub> Holandês:Gir.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os animais F<sub>2</sub> Holandês : Gir foram criados em gaiolas individuais, recebendo quatro litros de leite por dia, além de feno, ração concentrada e água à vontade até os 56 dias. Após essa idade, foram agrupados em lotes, de acordo com a idade, e recriados em piquetes de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*) até a idade de 12 meses, quando eram transferidos para pastos de braquiária (*Brachiaria sp*). Os animais foram pesados ao nascimento e, depois, a cada 28 dias. Os pesos foram ajustados para idades-padrão usando fatores de ajustamento obtidos do próprio conjunto de dados.

Amostras de sangue de 410 animais (quatro touros da raça Holandesa, 27 vacas da raça Gir, seis machos e 67 fêmeas F<sub>1</sub> Holandês:Gir, 306 progênies F<sub>2</sub>) foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite para extração de DNA e genotipagem para o gene BoLA-DRB3.2.

A amplificação do exon2 do gene BoLA-DRB3 foi realizada utilizando a técnica de Nested PCR. Para a primeira amplificação, foram utilizados os primers HLO30 (5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC -3') e HLO31 (5'-TTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'). Para a segunda amplificação, foram utilizados os primers HLO30 e HLO32 (5'-TCGCCGCTGCCACAGT-3'), para aumentar a especificidade da reação de PCR e diminuir a presença de heteroduplexes. O primer HLO32 consiste inteiramente de nucleotídeos da extremidade 3' do exon 2 e tem 8 nucleotídeos sobrepostos com a extremidade 3' do primer HLO31. A primeira reação consistia de 10 ciclos, utilizando 10 ng de DNA inicial. A segunda reação consistia de 30 ciclos, utilizando 1 uL da primeira reação, num volume final de 25 uL. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600.

Dez uL do produto do segundo *round* de amplificação foram digeridos por 2 horas a 37°C, separadamente com 5 unidades das enzimas *Rsa I*, *Bsty I* e *Hae III* (Promega) num volume final de 15 uL. Em seguida os fragmentos foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida nativo a 12% (700 volts, por 3 h), utilizando placas com 35 cm de altura para garantir uma perfeita separação dos fragmentos. Os géis foram corados com nitrato de prata e os fragmentos foram

detectados com o auxílio dos padrões de 25 e 10 pb.

Visando obter maior consistência dos dados para os estudos de associação dos animais  $F_2$ , foram eliminadas as informações dos animais cuja frequência era inferior a 1% dentro da classe do alelo ou do genótipo BoLA. Satisfeitas essas restrições, restaram 306 registros de peso ao nascimento (PN), 301 registros de peso aos 60 dias de idade (P60), 271 registros de peso aos 205 dias (P205) e 222 registros de peso aos 365 dias de idade (P365). Foram também analisados os ganhos de peso entre as idades, isto é, do nascimento aos 60 dias de idade (GP\_N\_60), de 60 a 205 dias (GP\_60\_205) e de 205 a 365 dias (GP\_205\_365).

Os efeitos de um gene sobre características quantitativas podem estar confundidos com efeitos genéticos não-aleatórios devidos ao parentesco entre indivíduos compartilhando determinado alelo. Desta forma, para estimar o efeito direto de cada alelo, os registros foram analisados por meio de um modelo de substituição gênica, o qual considera o efeito aditivo de um alelo no gene BoLA. Este modelo de substituição gênica expressa o efeito de um alelo particular após a remoção dos efeitos aditivos de outros alelos do animal.

O modelo utilizado incluiu os efeitos de gene candidato, como a seguir:

$$y = Xh + Mm + Za + e$$

em que  $y$  = vetor de registro de pesos e ganhos de peso;  $X$  e  $Z$  = matrizes incidência relativas aos efeitos fixos e aleatórios;  $h$ ,  $a$ ,  $m$ , e  $e$  = vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo, permanente de ambiente e residual, respectivamente. Ainda,  $m$  = vetor incluindo os efeitos fixos de substituição gênica para diferentes alelos BoLA representados por coeficientes de regressão e  $M$  = matriz contendo 0, 1 ou 2, representando o número de cópias de determinado alelo BoLA presente em cada indivíduo.

Os efeitos de ano-estação do nascimento e sexo do animal foram assumidos como fixos e os efeitos genético aditivo e residual foram assumidos como aleatórios, tendo distribuição normal, médias iguais a zero e variâncias  $\sigma_a^2$  e  $\sigma_e^2$ , respectivamente.

Todas as análises foram realizadas por meio do PROC MIXED do sistema SAS (SAS, 2000), resultando em maior flexibilidade na modelagem não somente das médias, mas também das (co)variâncias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a combinação dos diferentes padrões de corte das três enzimas, 54 alelos diferentes puderam ser detectados. Deste total, 22 alelos foram identificados na população. Alguns alelos apresentaram uma deleção de 3 pares de base (pb) no fragmento de 284 pb, gerando um fragmento de 281 pb, alterando o padrão de corte para as três enzimas.

O grande número de alelos identificados na população parental Gir (18) e, conseqüentemente, nos animais  $F_1$  e  $F_2$  demonstra alto polimorfismo para o loco BoLA-DRB3.2. Na Tabela 1, verifica-se que as frequências alélicas entre essas populações variaram de 0,33% a 28,50%. Altos graus de polimorfismo também foram encontrados por Machado et al. (2004), em rebanhos da raça Gir. Apesar do reduzido número de animais da raça Holandesa genotipados neste trabalho, as frequências alélicas para o loco BoLA-DRB3.2 são semelhantes às encontradas por Dietz et al. (1997), que revelaram que os alelos \*11,\*16, \*22 e \*23 foram responsáveis pela maior parte da frequência total, na população da raça Holandesa avaliada. Pode-se verificar que durante a formação das populações  $F_1$  e  $F_2$ , houve a perda de alguns alelos por segregação (\*7, \*28, \*29 e \*33). Ainda, como as populações  $F_1$  e  $F_2$  foram formadas a partir do uso massivo de inseminação artificial e transferência de embriões, a intensidade de utilização de determinados machos e fêmeas fez com que as frequências dos alelos fossem reduzidas ou aumentadas, quando comparadas às frequências iniciais. O alelo mais freqüente na população parental Gir foi o BoLA-DRB3\*20. Resultados semelhantes foram encontrados, também em rebanhos da raça Gir, por Machado et al. (2004).

Nenhuma associação conclusiva entre os alelos BoLA-DRB3.2 e as características de crescimento analisadas foi observada. Provavelmente, os poucos efeitos significativos observados

sobre o peso aos 205 dias (P205) e ganhos de peso do nascimento aos 60 dias (GP\_N\_60) e dos 60 dias aos 205 dias de idade (GP\_60\_205) (Tabela 2) podem ter sido devidos ao acaso, em função do tamanho da amostra. Todavia, os resultados sugerem que os alelos \*11, \*20 e \*35 no loco BoLA, podem estar associados à falta de eficácia na formação de antígenos, tornando-os mais susceptíveis a doenças e, conseqüentemente, reduzindo sua velocidade de crescimento.

Para as demais características estudadas, não houve efeito significativo dos alelos BoLA-DRB3.2. Provavelmente, o reduzido número de observações pode ter sido a causa para a não detecção de pequenos efeitos do sistema BoLA, o que não exclui a possibilidade de se verificar uma associação em outras populações em razão do efeito indireto da susceptibilidade a doenças em outro ambiente ou pelo desequilíbrio de ligação entre os genes do complexo BoLA e aqueles responsáveis pela expressão das características de crescimento.

Pode-se ainda formular a hipótese que as raças parentais (Holandês e Gir Leiteiro) foram selecionadas para produção de leite e que grande parte dos alelos estudados neste trabalho podem estar associados, e com grande efeito positivo, com essa característica e também com as incidências de doenças típicas de sistemas de produção de leite. Tome-se, como exemplo, o alelo \*16, que possuía a maior freqüência nos reprodutores da raça Holandesa neste estudo. De acordo com os resultados obtidos por Sharif et al. (1998), este alelo estaria relacionado a menores escores de células somáticas durante as lactações, refletindo em úberes mais saudáveis e, conseqüentemente, maiores produções de leite.

A ausência de associações entre características de crescimento e os genes do complexo BoLA foram relatadas por Arriëns et al. (1996), sendo que uma das possíveis explicações para este fato possa ser a neutralidade seletiva do polimorfismo da classe II em relação às características de crescimento.

## CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir que há grande polimorfismo no loco BoLA-DRB3.2 na população estudada. Este estudo, embora não tenha sido conclusivo para identificar alelos do loco DRB3.2 para os quais a seleção resultaria em aumento das características ligadas ao crescimento em bovinos, foi importante por contribuir para o maior conhecimento do loco BoLA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALIZADEH, Z.; KARROW, N.; MALLARD, B.A.. Biological effect of varying peptide binding affinity to the BoLA-DRB3\*2103 allele. *Genet. Sel. Evol.*, v.35 (Suppl. 1), S51-S65, 2003.
2. ARRIENS, M.A.; HOFER, A.; OBEXER-RUFF, G. et al . Association of serologically defined BoLA class I alleles with milk production traits in three Swiss cattle breeds. *Livest. Prod. Sci.*, v. 45, p.163, 1996.
3. DIETZ, A.B.; DETILLEUX, J.C.; FREEMAN, A.E. et al . Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.400-405, 1997.
4. MACHADO, M.A., NASCIMENTO, C.S., MARTINEZ, M.L. et al. Associação do gene BoLA-DRB3.2 com a produção de leite em até 305 dias de lactação em vacas da raça Gir . *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 2004.(No prelo)
5. SAS. *SAS User's guide: Basic and Statistics* SAS® INST. INC., Cary, NC, 2000.
6. SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N.; et al. A Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.*, v.29,p.185-193, 1998.

**41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**  
19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1 – Freqüências alélicas para o gene BoLA-DRB3.2\* observada em 410 animais, segundo o grupo genético

Alelos	Freqüência por grupamento genético (%)			
	HPB	Gir	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>
3	12,50	1,85	5,48	8,33
5	-	7,41	2,05	8,83
6	-	12,97	1,37	0,83
7	-	1,85	-	-
10	-	1,85	3,42	1,83
11	12,50	-	4,79	5,50
15	12,50	-	6,16	2,17
16	25,00	-	13,01	11,67
18	-	7,41	4,11	1,67
20	-	16,67	13,7	10,00
22	12,50	-	7,53	4,17
23	12,50	-	7,53	9,50
27	12,50	7,41	13,02	28,50
28	-	1,85	-	-
29	-	1,85	-	-
31	-	11,12	2,05	1,50
33	-	3,70	-	-
34	-	3,70	4,79	1,83
35	-	9,26	4,15	1,33
42	-	3,70	3,42	1,00
44	-	1,85	1,37	0,33
47	-	3,70	1,37	0,33
51	-	1,85	0,68	0,67
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

\* A designação dos alelos está de acordo com o 5<sup>th</sup> BoLA Workshop (1992).

**41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**  
19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 2 – Efeito de substituição dos alelos BoLA e respectivos erros-padrão ( $\hat{b} \pm EP$ ) para as características de peso aos 205 dias (P205) e ganhos de peso do nascimento aos 60 dias (GP\_N\_60) e dos 60 dias aos 205 dias de idade (GP\_60\_205)

Alelos	P205		GP_N_60		GP_60_205	
	$\hat{b}$	EP	$\hat{b}$	EP	$\hat{b}$	EP
3	-3,140	8,220	-0,069	0,036	-0,002	0,050
5	1,700	8,390	-0,045	0,038	0,036	0,051
10	-19,230	12,060	-0,003	0,059	-0,121	0,073
11	-19,590*	8,700	-0,030	0,039	-0,113*	0,053
15	-5,490	9,990	-0,033	0,049	-0,017	0,061
16	-3,650	8,290	-0,021	0,036	-0,018	0,050
18	-4,660	15,070	-0,018	0,076	-0,024	0,092
20	-14,360	7,530	-0,037	0,033	-0,092*	0,045
22	-11,310	8,970	-0,016	0,044	-0,072	0,054
23	-3,930	8,080	-0,059	0,038	-0,013	0,049
27	1,310	8,060	-0,027	0,036	0,009	0,049
31	-5,510	11,860	0,054	0,059	-0,041	0,072
34	-6,680	11,500	-0,004	0,055	-0,045	0,070
35	-5,520	11,440	-0,106*	0,054	-0,013	0,069

\*(P<0,05)