

ASSOCIAÇÃO DO GENE BOLA-DRB3.2 COM PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS DA RAÇA GIR¹

AUTORES

Marco Antonio Machado¹, Carlos Souza do Nascimento³, Mário Luiz Martinez², Marcos Vinícius G. Barbosa da Silva², Ana Lúcia Campos², Marta Fonseca Martins Guimarães², Roberto Luiz Teodoro², Rui da Silva Verneque², Simone E. Facioni Guimarães¹

¹ Financiado parcialmente pelo CNPq e Prodatab

² 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

³ Bolsista de Apoio Técnico da FAPEMIG

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 36571-000

RESUMO

O complexo maior de histocompatibilidade bovino (BoLA), mapeado no cromossomo 23, 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*). A associação entre os alelos do gene BoLA-DRB3.2 e produção de leite na raça Gir foi estudada por meio da análise de dados moleculares e fenotípicos de 424 vacas Gir, 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 dados fenotípicos foram a produção de leite em até 305 dias de lactação. Os resultados permitiram concluir que esse gene é altamente polimórfico nessa raça, sendo identificados sete alelos (BoLA-DRB3.2*4, *8, *11, *19, *28, *41 e *48) que não haviam sido encontrados em animais zebuínos. Dois alelos (*16 e *29) estavam significativamente associados com maiores produções de leite, indicando que o próprio gene BoLA-DRB3.2, ou um QTL (*Quantitative Trait Loci*) ligado a ele, influencia essa característica. Entretanto, o método aplicado não consegue estimar a posição do possível QTL.

PALAVRAS-CHAVE

Bovinos, PCR-RFLP, BoLA, Marcadores moleculares

TITLE

ASSOCIATION OF BOLA-DRB3.2 GENE WITH MILK PRODUCTION IN GYR CATTLE

ABSTRACT

The bovine major histocompatibility complex (BoLA), located at chromosome 23, 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 milk production in Gyr breed was studied using molecular and phenotypic data of 424 Gir cows. Genetic data consisted of animal genotypes for BoLA-DRB3.2 alleles and phenotypic data was 305 days milk production. The association between BoLA-DRB3.2 alleles and a putative QTL affecting the trait was investigated using a mixed animal model. BoLA-DRB3.2 gene was found to be highly polymorphic in Gir breed, showing seven alleles (BoLA-DRB3.2*4, *8, *11, *19, *28, *41 e *48) that have not been yet described in Zebu animals. Two BoLA-DRB3 alleles (*16 e *29) were found to be significantly

associated with milk production, which indicates that BoLA-DRB3.2 gene itself or a linked QTL (Quantitative Trait Loci) influences this trait. However, the applied method can only detect linkage, but is not able to estimate the putative QTL position.

KEYWORDS

bovine, PCR-RFLP, BoLA, Molecular markers

INTRODUÇÃO

O loco BoLA tem sido amplamente estudado nos últimos 20 anos em virtude de sua influência sobre as características produtivas e as relacionadas à saúde animal.

Em ruminantes, esse loco é extremamente polimórfico e vários estudos têm confirmado a influência direta e significativa de alguns alelos sobre as características de saúde dos animais em bovinos de leite. Weigel et al. (1990) verificaram associação entre alguns alelos do BoLA com o aumento da resistência à mastite clínica e à redução do custo com a saúde em vacas Holandesas, nos EUA. Batra et al. (1996) encontraram associação significativa do alelo A14 e o aumento da vida produtiva, quantidade de leite, proteína e lactose na raça Holandesa.

As associações encontradas não são influenciadas pela recombinação, esperando-se que os efeitos dos genes candidatos sejam estáveis através das gerações e, conseqüentemente, não necessitem ser reestabelecidos em cada geração. Assim, quando identificado e verificado o efeito de um gene candidato, este pode ser imediatamente utilizado na seleção assistida por marcadores, com resultados satisfatórios.

A despeito de sua importância no desempenho de características produtivas e de saúde, não há nenhum estudo relatando a associação dos alelos deste complexo em animais zebuínos selecionados para leite, no Brasil. Assim, objetivou-se, com este trabalho, verificar a associação entre os alelos do loco BoLA-DRB3.2 com a produção de leite em até 305 dias de lactação em vacas da raça Gir.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 470 vacas da raça Gir, filhas de 99 touros e criadas em dois rebanhos do Estado de Minas Gerais, 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.

O DNA foi extraído a partir das células brancas das amostras de sangue, utilizando protocolo contendo tampão salino e proteinase K, sendo as proteínas removidas com fenol/clorofórmio. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria visando determinar a quantidade e qualidade.

A amplificação do exon2 do gene BoLA-DRB3.2 foi realizada utilizando a técnica de Nested PCR (Van Eijk et al., 1992) e a nomenclatura dos fragmentos foi realizada conforme descrito por Van Eijk et al. (1992).

As freqüências dos alelos do gene BoLA-DRB3.2 para as 470 vacas foram calculadas por meio de contagem direta.

Visando obter maior consistência dos dados para os estudos de associação, foram eliminadas as informações cujas freqüências eram inferiores a 1% dentro da classe do alelo ou do genótipo BoLA, nas respectivas análises envolvendo cada um destes grupos. Assim, restaram 1.140 registros de produção de leite em até 305 dias das três primeiras lactações de 424 vacas, filhas de 88 touros e com partos entre os anos de 1986 e 2003, que foram pré-ajustados para a idade adulta. Os grupos contemporâneos foram formados pela combinação de ano com estação de parto, dado que os registros foram analisados dentro de cada rebanho. Os dados fenotípicos foram provenientes do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, coordenado pela Embrapa Gado de Leite.

Para estimar o efeito direto de cada alelo, os registros de produção de leite em até 305 dias também foram analisados por meio de um modelo de substituição gênica, o qual considera o efeito aditivo de um alelo no gene BoLA. Tal modelo pode ser representado matricialmente, como:

$$y = Xh + Mm + Z_1a + Z_2p + \varepsilon$$

em que y = vetor de registro de produções; X , Z_1 e Z_2 = matrizes incidência relativas aos efeitos

fixos e aleatórios; e h , a , p e ε = vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo, permanente de ambiente e residual, respectivamente. Ainda, q = vetor de efeitos fixos para os genótipos do gene candidato, Q = matriz de incidência para este efeito, 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. O efeito de ano-estação do parto foi assumido como fixo e os efeitos genético aditivo, permanente de ambiente e residual foram assumidos como aleatórios, tendo distribuição normal, médias iguais a zero e variâncias σ_a^2 , σ_p^2 e σ_e^2 . Este modelo de substituição gênica expressa o efeito de um alelo particular após a remoção dos efeitos aditivos de outros alelos portados pelo animal.

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

O grande número de alelos (27) identificados demonstra que a raça Gir apresenta um alto polimorfismo para o loco BoLA-DRB3.2 (Tabela 1). Neste estudo, foram identificados sete alelos (BoLA-DRB3.2*4, *8, *11, *19, *28, *41 e *48) que não haviam sido citados em animais zebuínos.

As freqüências alélicas variaram de 0,10% a 16,90% e a soma das freqüências dos seis alelos mais comuns foi igual a 64,6%.

No Rebanho A, foram observados 15 diferentes alelos, enquanto no Rebanho B, a diversidade foi maior, sendo observados 26 alelos, o que, provavelmente, se deveu ao tamanho da amostra. Na Tabela 1, pode-se verificar que 14 alelos foram comuns aos dois rebanhos e, dentre esses, destacaram-se os alelos *16 e *27, encontrados em altas freqüências nos dois rebanhos. Os alelos *7, *20, *29 e *42 apresentaram uma grande variação de freqüência entre as duas populações. Tais resultados podem ser explicados pela diferença na população fundadora, pressão de seleção e/ou número de animais genotipados.

O alelo mais freqüente na população total foi o BoLA-DRB3*20. Resultado semelhante foi encontrado por Mota et al. (2002), também na raça Gir, ao investigarem as freqüências alélicas do gene BoLA-DRB3, por meio da técnica de seqüenciamento direto de produtos PCR.

Os efeitos dos alelos DRB3.2 sobre a produção de leite em até 305 dias encontram-se na Tabela 2. Deve ser considerado que a seleção para produção de leite efetuada dentro de cada rebanho e o descarte de vacas podem ter viesado as estimativas, dado que foram considerados os registros do primeiro, segundo e terceiro partos. Ressalte-se que a comparação dos resultados obtidos em diferentes populações deve ser feita com reservas, dado que o desequilíbrio de ligação existente dentro de cada uma delas pode ser diferente.

No Rebanho B, cuja média \pm erro-padrão da produção de leite em até 305 dias foi igual a 3.024 \pm 73 kg, encontrou-se associação significativa ($P < 0,05$) entre alelos *16 e *29 e a produção de leite. Todavia, no Rebanho A, na qual média \pm erro-padrão da produção de leite foi igual a 4.698 \pm 94 kg, não foram encontradas associações significativas entre esta característica e os alelos BoLA-DRB3.2.

O alelo *16, na raça Holandesa, está relacionado a menores escores de células somáticas durante as lactações, refletindo em maiores produções. Esse mesmo alelo pode estar associado a menor incidência de cistos ovarianos e de retenções de placenta, pois ele estaria associado ao aumento da persistência linfocitária, o que poderia explicar sua alta freqüência em ambos rebanhos, dado que animais mais susceptíveis à mastite e com problemas reprodutivos seriam descartados com o passar dos anos. Tal suposição é reforçada pela baixa freqüência do alelo *23, que pode estar associado ao aumento de incidência de mastite clínica, segundo Sharif et al. (1998).

Neste estudo, o alelo *29 estava associado a aumento significativo na produção de leite no Rebanho B; todavia, em razão de sua baixa freqüência nesse rebanho, o resultado obtido pode ter

sido ao acaso, como reflexo da amostragem.

Para os demais alelos, não foram encontradas associações significativas, provavelmente em função do tamanho da população analisada ou, então, devido à real ausência de tais associações na população. Também, tal inconsistência pode ter sido causada por diferenças no desequilíbrio de ligação ou por associações ocasionais.

Com o objetivo de se verificar a existência de possíveis interações entre os alelos, realizou-se uma análise conjunta dos genótipos dos animais, mas que, todavia, não apresentou nenhum resultado significativo.

Apesar dos resultados não mostrarem grande consistência sobre a associação entre alelos BoLA e a produção de leite em até 305 dias devido ao limitado número de animais, este trabalho certamente contribuiu para o maior conhecimento desse loco dentro da raça Gir, dado que foram identificados sete novos alelos que não haviam sido, até então, relatados em raças zebuínas.

CONCLUSÕES

Observou-se grande polimorfismo no loco BoLA-DRB3.2 na raça Gir, sendo identificados sete alelos não citados anteriormente em raças zebuínas. Este estudo, embora não tenha sido conclusivo para identificar associações, contribuiu para o maior conhecimento do loco BoLA, mostrando alguma consistência em relação aos alelos *16 e *29, que podem estar relacionados a maiores produções de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BATRA, T.R.; STEAR, M.J.; MACDONALD, P.A.. Association of class I bovine lymphocyte antigens with profitability and lifetime yields in the Holstein breed. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.145, 1996.
2. MOTA, A. F. da; GABRIEL, J.E.; MARTINEZ, M.L.. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *Europ. J. Immunogen*, v.29, p.223-227, 2002.
3. SAS. *SAS User's guide: Basic and Statistics*.. SAS® INST. INC., Cary, NC, 2000.
4. SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N.; et al.. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA) with production traits in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.*, v.30, p.157-160, 1998.
5. VAN EIJK, M.J.T.; STEWART-HAYNES, J.A.; LEWIN, H.A. . Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, v.23, p.483-496, 1992.
6. WEIGEL, K.A.; FREEMAN, A.E.; KEHRLI JR, M.E.; et al.. Association of class I bovine lymphocyte antigen complex alleles with health and production traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.2538, 1990.

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

Tabela 1 – Frequência alélica do gene BoLA-DRB3.2* observada em 470 animais da raça Gir

Alelos	Frequência por rebanho (%)		
	A	B	Total
3	0,70	3,10	2,30
4	-	0,30	0,20
5	-	6,10	4,10
6	0,30	6,10	4,30
7	15,70	0,50	5,30
8	-	1,10	0,70
10	-	0,20	0,10
11	0,70	5,50	3,90
15	-	3,30	2,20
16	12,00	11,40	11,60
18	-	2,70	1,80
19	1,00	0,30	0,50
20	0,30	24,70	16,90
23	0,70	-	0,20
27	19,30	11,30	13,80
28	-	0,50	0,30
29	27,00	1,10	9,40
31	0,70	6,40	4,60
33	-	0,20	0,10
35	9,30	6,70	7,60
41	-	0,30	0,20
42	10,70	0,90	4,00
46	-	0,20	0,10
47	-	0,20	0,10
48	0,70	0,50	0,50
51	-	1,10	0,70
54	1,00	5,60	4,10
Total	100,00	100,00	100,00

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 ($\hat{\beta} \pm EP$) do alelo BoLA para a produção de leite em até 305 dias, por rebanho, na raça Gir.

Alelo BoLA	$\hat{\beta} \pm EP$	
	Rebanho A	Rebanho B
3	-	283,89 ± 227,77
5	-	-38,04 ± 202,28
6	-	-74,44 ± 199,93
7	196,36 ± 196,82	-
8	-	434,48 ± 275,48
11	-	230,60 ± 219,89
15	-	197,53 ± 217,55
16	-155,40 ± 210,44	382,50 ± 194,87*
18	-	-215,39 ± 267,85
20	-	132,28 ± 175,10
27	-13,93 ± 193,84	-58,33 ± 185,35
29	-130,43 ± 177,96	659,76 ± 335,81*
31	-	163,19 ± 195,82
35	62,97 ± 207,73	163,37 ± 204,83
42	-129,26 ± 200,12	109,28 ± 314,28
51	-	368,41 ± 365,00
54	-	-187,60 ± 216,84

*(P<0,05).