

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 5’

FLANQUEADORA DO GENE *DUFFY* EM *Bos indicus* e *Bos taurus*

THAÍS DE LIMA CARVALHO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Genética.

BOTUCATU – SP

Abril-2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 5’

FLANQUEADORA DO GENE *DUFFY* EM *Bos indicus* e *Bos taurus*

THAÍS DE LIMA CARVALHO
Bióloga

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Souza Lima Silveira da Mota
Co-orientador : Dr. Rogério Abdallah Curi

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Bociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Genética.

BOTUCATU – SP
Abril-2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Carvalho, Thaís de Lima.

Isolamento e caracterização da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em *Bos indicus* e *Bos taurus* / Thaís de Lima Carvalho. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Co-orientador: Rogério Abdallah Curi

Assunto CAPES: 20204000

1. Bovino - Genética 2. Genética animal

CDD 591.15

Palavras-chave: Antígeno Duffy; Babesiose; Bovinos; SNP

Este trabalho é dedicado a vocês:

pai, mãe, Flávia e Lígia.

Obrigada por tudo. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

“Nenhuma página

jamais foi limpa.

Mesmo a mais Saara,

ártica, significa.

Nunca houve isso,

uma página em branco.

No fundo, todas gritam,

pálidas de tanto”.

Leminsky, Paulo. *Distraídos Venceremos*, Editora Brasiliense, 1987

Nesta página de agradecimentos, já estava escrito, em ordem alfabética, o nome de todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho:

Adriana Sartori, Prof^a. Adriane Wasko, Prof. Alexandre Borges, Amanda Rios, Ana Teresa Burlamaqui, André Gargano, Andréa Akemi Hoshino, Antônio Sérgio Braz, Débora Colombi, Diego Alonso, Fabiana Akemi, Fábio Severino, Fernanda Alves-Costa, Flávia Carvalho, Flávio Sasaki (Bonsai), Prof. Henrique Nunes, Prof Ivan Maia, Jaime Souza Neto, Letícia Nogueira, Lígia Carvalho, Prof^a. Lígia Mota, Magali Gomes, Marcela

Guidugli, Marcelo Carvalho, Marco Rosselini, Maria Andréa Carvalho, Maria Paravani,
Neguin Hussein, Prof. Paulo Ribolla, Rafaela Teixeira, Regiane Degan, Rogério Curi,
Sandra Drigo, Thiago Buosi, Valquíria Santiloni, Vera Salazar, Vitor Fonseca.

EPÍGRAFE

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós: leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade da nossa vida e a prova evidente de que duas pessoas não se encontram ao acaso.”

Antonie Saint Exupéry

SUMÁRIO

Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Taxonomia dos bovinos.....	2
1.2- Bovinocultura no Brasil.....	3
1.3- Marcadores moleculares.....	4
1.4- Seleção assistida por marcadores moleculares.....	6
1.5- Região promotora.....	8
1.6- Antígeno Duffy.....	12
1.7- Babesiose bovina.....	16
2- OBJETIVOS.....	19
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1- MATERIAIS.....	22
3.2- MÉTODOS.....	22
3.2.1- Coleta de sangue.....	22
3.2.2- Extração de DNA genômico de sangue.....	23
3.2.3- Amplificação da região 5' flanqueadora do gene <i>Duffy</i>	23
3.2.4- Sequenciamento da região 5' flanqueadora do gene <i>Duffy</i>	24
3.2.5- Genotipagem de SNPs (<i>Single nucleotide polymorphisms</i>).....	25
3.2.6- - Caracterização da região 5' flanqueadora do gene <i>Duffy</i>	26
3.2.7 Análise estatística.....	27
3.2.8- Coleta de medula óssea.....	27
3.2.9- Extração do RNA total de medula óssea.....	28
3.2.10- Tratamento com DNase e transcrição reversa.....	28
3.2.11- Quantificação relativa da expressão do gene <i>Duffy</i>	29
4- RESULTADOS	32
4.1- Identificação de SNPs na região 5' flanqueadora do gene <i>Duffy</i> bovino.....	33

4.2- Genotipagem dos SNPs.....	34
4.3- Caracterização da região 5' flanqueadora do gene <i>Duffy</i>	43
4.4- Análise da expressão diferencial do gene <i>Duffy</i> em animais <i>Bos taurus</i> e <i>Bos Indicus</i>	45
5- DISCUSSÃO.....	49
6- CONCLUSÃO.....	60
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Resultado da amplificação da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino, após eletroforese em gel de agarose.....**33**
- Figura 2 -** Frequências dos genótipos resultantes dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.....**41**
- Figura 3:** Caracterização da seqüência de nucleotídeos da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino.....**44**
- Figura 4:** Curva de dissociação dos produtos de amplificação para o gene *Duffy* e para o gene controle *GAPDH* para as amostras de *Bos taurus* e *Bos indicus*.....**46**
- Figura 5:** Curva padrão de eficiência da amplificação, por PCR em tempo real, para o gene alvo (*Duffy*) e para o gene controle (*GAPDH*).....**47**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Frequências alélicas observadas para cada um dos polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.....**37**
- Tabela 2** - Frequências dos genótipos determinados por cada um dos polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.....**38**
- Tabela 3** - Frequências dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.....**39**
- Tabela 4** - Frequências dos genótipos resultantes dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.....**40**
- Tabela 5** – Comparação entre as frequências dos SNPs, dos genótipos formados pelos SNPs, dos haplótipos e dos genótipos formados pelos haplótipos, entre as raças de *Bos indicus* e *Bos taurus* e entre as duas espécies, realizada pelo teste exato de Fisher**42**
- Tabela 6:** Dados da determinação da quantificação relativa do gene *Duffy* nas amostras de animais *Bos indicus* em relação aos animais *Bos taurus*, pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK &SCHIMITTGEN, 2001).....**48**

Resumo

O antígeno Duffy é receptor único para o *Plasmodium vivax*, hemoparasita do filo Apicomplexa causador da malária vivax em humanos. A resistência a este parasita pela maior parte dos indivíduos negros africanos e seus descendentes é devido a uma mutação na região promotora do gene que impede a sua transcrição nos eritrócitos. Em relação à babesiose bovina, sabe-se que animais de raças taurinas são mais susceptíveis à infecção pelo parasita quando comparados aos animais de raças zebuínas. Com o objetivo de verificar se o mesmo processo de resistência dos humanos ocorre entre bovinos, a região 5' flanqueadora do gene *Duffy* foi isolada e caracterizada em *Bos indicus* e *Bos taurus*. Foram identificados e genotipados 4 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP1: -500 C>T; SNP2: -186 C>T; SNP3: -158 A>G e SNP4: -3 A>G) que apresentaram diferenças significativas de frequências ($P \leq 0,001$) entre 99 animais de cada espécie (n=198). A caracterização da região isolada revelou a presença de 6 haplótipos putativos, 14 genótipos formados pelos haplótipos e numerosos sítios putativos para fatores de transcrição. Apenas as timinas nos SNPs 1 e 2, mais comuns em *B. indicus*, alteram alguns desses sítios. Porém, a análise por PCR em tempo real de animais com genótipos homocigotos mais comuns em cada espécie e contrastantes para todos os polimorfismos, revelou não haver diferença de expressão do gene *Duffy* entre os mesmos. Dessa forma, conclui-se que os polimorfismos identificados, a princípio, não seriam úteis como marcadores moleculares em programas de melhoramento para a característica de resistência à babesiose.

Abstract

The Duffy antigen is the only receptor for *Plasmodium vivax*, a hemoparasite of the phylum Apicomplexa and the cause of vivax malaria in humans. Resistance to this parasite in the majority of black African people and their descendents is due to a mutation in the gene promoter region, which blocks its transcription on erythrocytes. Regarding bovine babesiosis, it is known that the taurine breeds are more susceptible to parasite infection than zebu breeds. In order to verify whether the same human resistance occurs in bovine, the 5' flanking region of the Duffy gene was isolated and characterized in *Bos indicus* and *Bos taurus*. Four single nucleotide polymorphisms were identified and genotyped (SNP1: -500 C>T; SNP2: -186 C>T; SNP3: -158 A>G and SNP4: -3 A>G), which showed significant frequency differences among 99 bovine of each species (n=198). Characterization of the isolated region revealed the presence of 6 putative haplotypes, 14 genotypes, which are formed by haplotypes and numerous putative transcription factor binding sites. Just the thymine presence on SNPs 1 and 2, more common in *B. indicus*, alters some of the sites in this region. Despite this fact, analyses using real time PCR on bovine presenting the more common homozygote genotypes from each species, which contrast with all the polymorphisms, revealed that no difference of Duffy gene expression occurred among the same. Thus, in principal, it was concluded that the polymorphisms identified, would not be useful as molecular markers in an improvement program for resistance to babesiosis.

Introdução



1- INTRODUÇÃO

1.1- Taxonomia dos bovinos

Os bovinos pertencem ao Gênero *Bos*, Família *Bovidae*, Ordem *Artiodactyla*, sendo encontrados em praticamente todos os países do mundo, com uma estimativa de que existam mais de 1,2 bilhões de animais de pelo menos 780 raças (FRIES & RUVINSKY, 1999). A evolução humana tem sido influenciada pelos bovinos, que representam importante fonte de alimento (CUNNINGHAM, 1992).

De acordo com a nomenclatura clássica de Linnaeus os bovinos são divididos em duas espécies do gênero *Bos*, *Bos taurus* e *Bos indicus*. A espécie *Bos taurus* (taurinos) engloba as raças européias e africanas, sem cupim e a *Bos indicus* (zebuínos) engloba as raças indianas e africanas, com cupim (DEL LAMA, 1991). Esta classificação é sustentada pela alta diversidade genética, estimada a partir de polimorfismos protéicos (MANWELL & BAKER, 1980), do polimorfismo morfológico do cromossomo Y, geralmente submetacêntrico em taurinos e acrocêntrico em zebuínos (KIEFFER & CARTWRIGTH, 1968) e polimorfismos de microssatélites em cromossomos autossômicos (MACHUGH *et al.*, 1997). Entretanto, muitos autores consideram inadequada a proposta de classificação das raças européias e indianas como espécies diferentes em razão da completa inter-fertilidade e pelo fato de não existir isolamento geográfico, sugerindo assim, a classificação destes grupos como subespécies.

Há duas hipóteses principais para explicar a origem desses grupos. Uma afirma que o gado domesticado primeiro se desenvolveu de um único ancestral selvagem, o Auroque (*Bos primigenius primigenius*), durante a fase Neolítica. Posteriormente foi produzida a população de *Bos indicus* por meio de cruzamento e

seleção do gado *Bos taurus* (EPSTEIN, 1971; EPSTEIN & MASON, 1984; PAYNE, 1991). A hipótese alternativa sugere que a população de zebu foi desenvolvida independentemente no Neolítico, sendo o provável progenitor a subespécie de Aurorque encontrada no sul da Ásia (*Bos primigenius nomadicus*). Esta interpretação é suportada por achados arqueológicos e evidências genéticas (MEADOW, 1993; LOFTUS *et al.*, 1994; BRADLEY *et al.*, 1996, MACHUGH *et al.*, 1997).

Devido às diversas teorias de origem e classificação dos bovinos, na literatura são encontradas várias nomenclaturas: *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*, *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, *Bos indicus* e *Bos taurus*, sendo esta última a utilizada neste trabalho.

1.2- Bovinocultura no Brasil

A bovinocultura nacional conta, atualmente, com mais de 200 milhões de animais, representando o maior rebanho comercial do mundo. Em 2006, o PIB do setor agropecuário brasileiro foi da ordem de 148,31 bilhões de dólares correspondendo a 27,9% do PIB nacional, sendo que destes, aproximadamente 30% (66 bilhões de dólares) são devido à pecuária (CNA, 2006).

O rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 80% de animais da espécie *Bos indicus* de origem indiana e por produtos de seu cruzamento com animais da espécie *Bos taurus* de origem europeia (GARCIA, 1995). Apesar da proximidade filogenética, estas duas espécies apresentam características fenotípicas bastante distintas com reflexos marcantes na eficiência produtiva e reprodutiva.

De maneira geral os zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como a algumas doenças

infecto-contagiosas (SANTIAGO, 1985). Os taurinos, por sua vez, são menos adaptados ao clima tropical, apresentam dificuldade em eliminar o excesso de calor corporal em função de deficiências de seu aparelho termo regulador e apresentam maior susceptibilidade às doenças infecciosas e infestações parasitárias, especialmente a babesiose, anaplasmosse e febre aftosa. Por outro lado, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos.

As doenças infecciosas e parasitárias causam perdas importantes em vários setores da produção pecuária no Brasil e no mundo. Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindam) indicam que o Brasil é o terceiro maior mercado de defensivos e insumos veterinários. Parte significativa dessa soma destina-se a produtos que poderiam ser substituídos por tecnologias mais eficazes e baratas, como, por exemplo, animais geneticamente resistentes aos parasitas (SANTOS, 2001).

1.3- Marcadores moleculares

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Entre as vantagens atribuídas aos marcadores moleculares destacam-se o alto polimorfismo, o fato de não sofrerem influência do meio ambiente, de serem em geral codominantes, de poderem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo, e de poderem caracterizar um indivíduo a partir de suas células ou tecidos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Do ponto de vista molecular ocorrem três tipos principais de variações na molécula de DNA, as regiões repetitivas, as inserções/deleções (InDels) e as alterações de

um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs) (VIGNAL *et al.*, 2002).

Variações moleculares são categorizadas como polimorfismos quando ocorrem em mais de 1% da população, sendo consideradas biologicamente normais. São consideradas funcionais quando promovem alterações na expressão do gene ou na composição da proteína, sendo que, dessa forma podem tornar um indivíduo mais ou menos susceptível a determinada patologia (THOMPSON *et al.*, 1991).

Em relação aos SNPs, as substituições mais freqüentes observadas no DNA envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C), sendo denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou o contrário. As alterações, que posteriormente podem levar aos SNPs, podem ser provocadas por erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA, ou em outros casos, são causadas por agentes ambientais (GUIMARÃES & COSTA, 2002). Os SNPs são marcadores bialélicos, geralmente detectados de forma codominante e são uma fonte importante para a análise de características complexas em bovinos devido a sua abundância no genoma, baixa taxa de mutação e recentes avanços nas técnicas de detecção e genotipagem (HEATON *et al.*, 2001)

Os polimorfismos em geral ocorrem tanto em regiões codificantes como em regiões não codificantes dos genomas. Considerável atenção tem sido focalizada nos polimorfismos de regiões gênicas codificantes e em seu potencial de alterar a estrutura e, conseqüentemente, a função de uma proteína com importância em determinada via metabólica. Quando os polimorfismos resultam em substituição de aminoácido na seqüência protéica são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos

aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora polimorfismos sinonímicos não alterem a seqüência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida. Esta quantidade também pode ser afetada quando ocorrem alterações nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro (5' UTR e 3' UTR). Além disso, polimorfismos gênicos podem promover processamentos alternativos, geração ou supressão de códons de terminação, alteração nos códons de iniciação da tradução e alterações no padrão de expressão de genes quando a troca de bases ocorre em seqüências promotoras (GUIMARÃES & COSTA, 2002).

1.4- Seleção assistida por marcadores moleculares

O melhoramento das características fenotípicas de interesse produtivo em bovinos vem sendo alvo de grandes esforços da humanidade e, mesmo que praticada empiricamente antes do século passado, vem ocorrendo há cerca de 10.000 anos. A domesticação dos animais permitiu ao ser humano exercer a seleção artificial para características desejáveis e alterar, mesmo que inconscientemente, a constituição genotípica das populações (SANTOS, 1995). O conhecimento de que certas características fenotípicas são herdáveis, levou o homem a controlar os acasalamentos nas espécies em domesticação, selecionando os reprodutores (REED, 1984). O sucesso da seleção depende do valor da herdabilidade do caráter, sendo que heranças poligênicas, dominâncias parciais ou completas, a influência do ambiente e o tempo necessário para a avaliação fenotípica freqüentemente são fatores limitantes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O melhoramento genético dos animais domésticos tem sido direcionado para características tais como produção, eficiência reprodutiva, eficiência alimentar e resistência a ecto e endo parasitas aplicando, principalmente, princípios de genética quantitativa, de modo que, os indivíduos de uma população sejam avaliados por meio de modelos estatísticos. A maior parte dos programas de melhoramento genético de bovinos utilizou, até meados de 1980, a teoria dos índices de seleção, com ênfase em seleção dentro de rebanhos. A partir dessa data, a metodologia dos modelos mistos para a estimação do valor genético dos animais, expresso em termos de Diferença Esperada na Progenie (DEP) vem apresentando grande destaque (HENDERSON, 1988).

Apesar dos progressos obtidos, algumas limitações tornaram-se aparentes. A eficiência das técnicas tradicionais de seleção é bastante limitada em relação as características de difícil mensuração ou que não podem ser diretamente mensuradas (resistência a doenças e de expressão em um único sexo), de baixa herdabilidade (fertilidade), de expressão tardia ou pós-morte (características de carcaça), ou que apresentam correlações genéticas negativas (produção de leite e porcentagem de gordura no leite) (SCHWERIN *et al.*, 1995).

A análise do genoma dos animais domésticos, por meio de marcadores moleculares, vem contribuindo para solucionar algumas destas limitações. A acurácia das predições e a intensidade de seleção aplicada ao rebanho podem ser incrementadas, diminuindo o intervalo entre gerações e economizando esforços em testes de progênie de touros.

Porém, as conquistas práticas obtidas até o momento são poucas, principalmente para características produtivas e reprodutivas, ou seja, a utilização dessa estratégia no melhoramento genético (Seleção Assistida por Marcadores

Moleculares – MAS) tem sido modesta, já que na maior parte das vezes os resultados de diferentes trabalhos mostraram-se não conclusivos ou contraditórios (CURI, 2004). Essas contradições costumam ser explicadas por variações no desequilíbrio de ligação entre marcadores moleculares e características quantitativas nas diferentes populações e raças, já que muitas vezes os polimorfismos estudados não são os responsáveis diretos por alterações fenotípicas, ou ainda por interações epistáticas diferentes entre o gene candidato e as bases genéticas de populações e raças distintas (CURI *et al.*, 2006). Além disso, dentre o grande número de genes envolvidos na determinação de uma característica de interesse, os genes candidatos para uma variação fenotípica podem não ser necessariamente os principais responsáveis por essa variação. Segundo Rothschild & Soller (1997) a probabilidade de um gene candidato estar associado a uma característica de importância econômica é teoricamente muito pequena.

Atualmente, a busca de genes relacionados à características desejáveis tem se voltado para o estudo da expressão gênica diferencial, baseando-se no princípio de que animais que apresentam características fenotípicas diferentes, podem diferir tanto qualitativa quanto quantitativamente na produção de mRNAs específicos e, conseqüentemente, na produção das respectivas proteínas.

1.5- Região promotora

O processador central da regulação da expressão de um gene é seu promotor, uma vez que contém os sítios de ligação para as RNAs polimerases responsáveis pela transcrição gênica. Promotores gênicos estão, normalmente, localizados imediatamente antes (*upstream*) da região transcrita de um gene.

Em geral, a região promotora de um gene de eucarioto possui uma seqüência conservada (T/A)A(A/T) a aproximadamente 30 pares de bases (pb) do ponto de início da transcrição, a qual é denominada TATA Box, e elementos promotores proximais, localizados a aproximadamente 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) acima do ponto de início da transcrição (GRIFFITHS *et al.*, 2000). Resumidamente, a seqüência TATA é reconhecida pela proteína de ligação TBP (proteína de ligação a TATA) que é uma subunidade do fator de transcrição IID (TFIID), ao qual se liga o fator de transcrição IIA (TFIIA), estabilizando a ligação da TBP ao DNA. A este complexo liga-se ainda o fator de transcrição IIB (TFIIB), formando assim a estrutura que é reconhecida pela RNA polimerase II que inicia o processo de transcrição (BROWN, 1999). Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem por meio de uma intrincada rede de interações envolvendo os elementos citados acima e outros elementos localizados mais distantes do ponto de início da transcrição (*enhancers e silencers*).

Recentemente, grande número de polimorfismos tem sido identificado na região reguladora dos genes, sugerindo que esse tipo de variação é funcional e evolutivamente mais importante do que se pensava (MITCHISON, 2000). Tanto trabalhos clássicos (BRITTEN & DAVIDSON, 1969; KING & WILSON, 1975) quanto recentes (KOHN *et al.*, 2004; STAMATOYANNOPOULOS, 2004; WITTKOPP *et al.*, 2004) consideraram que a principal fonte de variação entre indivíduos pode ser atribuída às diferenças de expressão gênica, motivadas por alterações em regiões regulatórias, e não às diferenças localizadas nas regiões codificantes. Segundo BROWN & FEDER (2005) a variação na expressão gênica entre membros da mesma espécie é a matéria prima da evolução.

Alterações em elementos reguladores podem modificar sítios de interação entre DNA e proteína e, potencialmente, alterar para mais ou para menos os padrões de expressão gênica (ROWNTREE & HARRIS, 2002). Nesse sentido, a identificação e entendimento de variações genéticas que afetam a regulação da expressão gênica são um desafio dentro da genômica e espera-se que seus resultados tenham papel importante na compreensão molecular de características complexas (HUDSON, 2003).

Em seres humanos foram estudadas associações entre polimorfismos da região promotora e expressão gênica de proteínas envolvidas com pressão arterial e hipertensão (MITCHISON, 2000 e MORENO *et al.*, 2003), infarto do miocárdio (KOCH *et al.*, 2001), metabolização da nicotina (PITARQUE *et al.*, 2001), tromboembolia (ENDLER *et al.*, 2001), fibrose cística (ROWNTREE & HARRIS, 2002), mal de Alzheimer (LAWS *et al.*, 2003), osteoporose (FERRARI *et al.*, 2003), diabetes tipo1 (JAHROMI *et al.*, 2003), leucemia mielóide crônica (SIBLEY *et al.*, 2003), câncer cervical (NISHIOKA *et al.*, 2003), risco de câncer em tecido epitelial (CATTANEO *et al.*, 2006), doença de Parkinson (WU, *et al.*, 2006), entre outras.

Em bovinos, estudos de interação DNA-proteína revelaram que variantes da região reguladora dos genes β -lactoglobulina (LUM *et al.*, 1997) e α -caseína (SZYMANOWSKA *et al.*, 2004) podem estar relacionadas à diferenças na transcrição de mRNA e expressão de proteínas na glândula mamária. Rodrigues *et al.* (1998) observaram diferenças nas frequências de um polimorfismo localizado na região promotora do gene do hormônio do crescimento (*GH1*) entre bovinos selecionados para produção de carne e de leite. Este polimorfismo é uma deleção de 3 nucleotídeos (AAG) entre as posições -35 e -33, nove nucleotídeos acima da

seqüência TATAAA, e apresentou freqüência de 0,15 em raças de corte e de 0,0 nas raças leiteiras.

Também em bovinos, a ocorrência de um microsatélite polimórfico localizado na região promotora P1 do gene do receptor de hormônio de crescimento (*GHR*) pode contribuir para a complexidade de sua expressão (HALE *et al.*, 2000). Em rebanhos *Bos indicus* é mais freqüente o alelo curto (S) com 11 repetições TG consecutivas enquanto que, em rebanhos *Bos taurus* predominam os alelos longos (L) com 16 a 20 repetições TG consecutivas (LUCY *et al.*, 1998). Os resultados obtidos por Curi *et al.* (2005a) mostraram a inferioridade do genótipo SS do microsatélite do gene *GHR* em relação ao genótipo LS, para as características ganho de peso e peso corporal ao abate em animais *B. indicus* e *B. indicus* x *B. taurus*. Ge *et al.* (2001) identificaram um polimorfismo de base única na região promotora do gene da insulina como fator de crescimento 1 (*IGF-1*) de bovinos e encontraram associação entre o alelo B desse polimorfismo e maior ganho de peso diário no período pós-desmama em animais *B. taurus*. Os resultados obtidos por Curi *et al.* (2005b) confirmaram a possibilidade desse polimorfismo da região promotora do gene *IGF-1* ser exclusivo de animais *B. taurus* e mostraram associações significativas entre genótipos e características de crescimento em animais *B. indicus* x *B. taurus*, sendo o genótipo BB favorável em relação ao genótipo AB. Cheong *et al.* (2006) relacionaram o polimorfismo -424 A>T na região promotora do gene do fator de liberação de hormônio de crescimento com peso de carcaça fria e área do músculo *Longissimus dorsi*, os quais foram superiores nos homozigotos TT, intermediárias nos heterozigotos AT e inferiores nos homozigotos AA.

1.6- Antígeno Duffy

A descoberta do antígeno Duffy em humanos ocorreu em 1950, por Cutbush *et al.* (1950), que detectaram o anticorpo no soro de um paciente hemofílico multitransfundido e o chamaram de anti-Fy^a, em homenagem ao paciente em questão, o Sr. Duffy. No ano seguinte, Ikin *et al.* (1951) descreveram o anti-Fy^b, anticorpo que define o par antitético do antígeno Fy^a. Posteriormente, Sanger *et al.* (1955) observaram que a ausência do antígeno Duffy era o mais comum em afro-americanos e que provavelmente representava o produto de um alelo silencioso.

Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b são clinicamente significantes na transfusão sanguínea, pois foram associados com reações hemolíticas transfusionais imediatas ou tardias (BOYLAND *et al.*, 1982) e com a doença hemolítica do recém-nascido (VESCIO *et al.*, 1987).

Em humanos, o loco *Duffy* está localizado no cromossomo 1q22-q23 (DONAHUE *et al.* 1968; MATHEW *et al.*, 1994). Inicialmente, acreditava-se que esse gene consistia de apenas um exon que codificava um polipeptídeo de 338 aminoácidos (CHAUDHURI *et al.*, 1995). Estudos posteriores revelaram a presença de um pequeno exon anterior (exon 1) que contém seqüências não traduzidas e seqüências codificantes. Este exon pode ser unido, após *splicing*, ao segundo exon (exon 2) para dar origem ao transcrito mais abundante, chamado transcrito maior, que codifica uma proteína de 336 aminoácidos (IWAMOTO *et al.*, 1996a). As isoformas diferem nos aminoácidos da região amino-terminal (N-terminal), onde o transcrito maior tem 6 aminoácidos e o menor tem 9, porém eles não diferem na ligação com anticorpos anti-Duffy, nem na ligação com quimiocinas (YASDANBAKHSI *et al.*, 2000).

O gene *Duffy* apresenta alelos múltiplos, entre os quais os alelos codominantes *FY*A* e *FY*B*, que codificam os dois antígenos principais, Fy^a e Fy^b , respectivamente (CUTBUSH *et al.*, 1950; IKIN *et al.*, 1951). Estes alelos, diferem por substituição de uma guanina por uma adenina na posição 131 do cDNA do transcrito menor ou 125 do transcrito maior, alterando o códon 44 ou 42, dependendo da isoforma, o qual codifica o aminoácido glicina no antígeno Fy^a e o ácido aspártico no antígeno Fy^b (CHAUDHURI *et al.*, 1993; 1995). As combinações dos alelos definem quatro fenótipos: $Fy(a+b+)$, $Fy(a+b-)$, $Fy(a-b+)$ e $Fy(a-b-)$, os quais apresentam distribuição diferencial entre as populações humanas. Os fenótipos Duffy positivo $Fy(a+b+)$, $Fy(a+b-)$ e $Fy(a-b+)$ apresentam maior frequência nas populações caucasóides e asiáticas, enquanto que o negativo $Fy(a-b-)$, se apresenta em maior frequência nas populações negróides (BEATTIE, 1988).

O fenótipo $Fy(a-b-)$ em negros é devido a uma mutação pontual -33 T>C na região promotora do alelo *FY*B*, na região GATA box (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b). Essa mutação altera o sítio do fator de transcrição eritróide GATA-1, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas nos eritrócitos, não alterando a expressão desta proteína em outros tecidos. Esta mesma mutação foi encontrada no alelo *FY*A* de indivíduos da região endêmica de *Plasmodium vivax* na Papua-Nova Guiné (ZIMMERMAN *et al.*, 1999).

A expressão reduzida do antígeno Fy^b em brancos foi associado à mutação 265 C>T na região codificadora do exon 2 do *FY*B* que promove a troca 89 Arg>Cys na cadeia peptídica, e caracteriza o *FY*X* postulado por Chown *et al.* (1965). Esta mutação enfraquecedora de Fy^b , quando presente, acompanha-se da mutação 298 G>A no mesmo alelo Fy^b , que leva à substituição 100 Ala>Thr na cadeia peptídica, podendo esta última também ser encontrada isoladamente (OLSON *et al.*, 1998;

PARASOL *et al.*, 1998). Porém, de acordo com Yazdanbakhsh *et al.* (2000) a mutação 100 Ala>Thr não influencia na expressão da proteína.

Castilho *et al.* (2004), em estudo com a população brasileira, observaram uma frequência elevada da mutação -33 T>C (12,5%) em indivíduos que se consideram caucasianos, confirmando que no Brasil não existe uma clara distinção de raças. Também foi observada a ocorrência simultânea das mutações -33 T>C, 265 C>T e 298 G>A em indivíduos de descendência africana, o que difere de outros relatos na literatura que mostraram a ocorrência das mutações 265 C>T e 298 G>A em 2 a 5% da população caucasiana, mas não em indivíduos negros (OLSON *et al.*, 1998; PARASOL *et al.*, 1998; YAZDANBAKHSI *et al.*, 2000).

O antígeno sanguíneo Duffy é uma glicoproteína de 35-43 kDa (HADLEY *et al.*, 1984), com 7 domínios transmembrana, que também foi identificado como um receptor promíscuo de quimiocinas e, portanto, foi renomeado DARC (*Duffy Antigen Receptor Chemokine*) (CHAUDHURI *et al.*, 1994; MURPHY, 1994; NEOTE *et al.*, 1994). Além dos eritrócitos, também é encontrado nas células endoteliais de veias pós-capilares em diferentes órgãos e em outros tipos celulares, incluindo as células de Purkinje no cerebelo, células epiteliais dos túbulos coletores do rim e pneumócitos tipo I dos pulmões (HADLEY *et al.*, 1994; GIRARD *et al.*, 1999; HADLEY & PEIPER., 1997; HORUK *et al.*, 1997; PEIPER *et al.*, 1995; CHAUDHURI *et al.*, 1997).

É postulado que sua função nos eritrócitos seja a de neutralizar níveis elevados de quimiocinas na circulação (DARBONNE *et al.*, 1991) e, apesar de sua função nas células endoteliais não ser bem entendida, tem sido sugerido que este receptor facilitaria o transporte de quimiocinas do tecido para o lúmen vascular.

Entretanto, a ligação com quimiocinas não transduz nenhum sinal nem altera a função da célula endotelial (LEE *et al.*, 2003).

MILLER *et al.* (1975) e MASON *et al.* (1977) descreveram correlação entre o antígeno Duffy e a malária, onde portadores do fenótipo Fy(a-b-) eram resistentes à infecção pelo parasita malárico símio *Plasmodium knowlesi*. Esses mesmos autores observaram que, *in vivo*, somente portadores dos antígenos Fy^a e Fy^b contraíam malária por *P. vivax* (MILLER *et al.*, 1976), concluindo que o antígeno Duffy era determinante para a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas do *P. knowlesi* e *P. vivax*.

O sítio de ligação específico para o *Plasmodium vivax* está localizado no domínio N-terminal extracelular (CHITNIS *et al.*, 1996; TOURNAMILLE *et al.*, 2005). Nesta região também está localizado o epítopo de reconhecimento de anticorpos anti-Duffy (WASNIOWSKA *et al.*, 2000; TOURNAMILLE *et al.*, 2003). Porém, é necessária uma ligação com o quarto domínio extracelular para a ligação de quimiocinas (TOURNAMILLE *et al.*, 2003).

Recentemente algumas associações têm sido feitas entre a ausência do antígeno Duffy nos eritrócitos (indivíduos Fy(a-b-)) e a angiogênese tumoral (MOORE *et al.*, 1999; LENTSH, 2002; SHEN *et al.*, 2006), que seria favorecida pelo excesso de quimiocinas na circulação devido à ausência do receptor nos eritrócitos. Aproximadamente 70% dos afro-americanos não expressam os antígenos Duffy nos eritrócitos e a incidência do câncer de próstata nesses indivíduos é 60% maior do que aquela encontrada em caucasianos, com taxa de mortalidade duas vezes mais elevada (STANFORD *et al.*, 1999).

O gene *Duffy* em *B. taurus* (GenBank: BT021079.1) é composto por dois éxons de 21 e 972 nucleotídeos, respectivamente, e um íntron de 426 nucleotídeos.

Marteline (2003) isolou e sequenciou o gene *Duffy* de *Bos indicus* e o alinhamento com a seqüência de *B. taurus* mostrou 99,6% de identidade entre as duas seqüências. As cinco alterações encontradas foram: duas transversões (572 C>G e 647 T>G), uma inversão de dinucleotídeo (1030-1031 GA>AG) e uma transição (1343 A>G).

1.7- Babesiose bovina

A babesiose bovina é causada pelos parasitas intraeritrocitários *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* e *B. major* (McCOSKER, 1981). O primeiro parasita foi descrito por Babes (1888), que o encontrou no sangue de um animal com hemoglobinúria, e o nome *Babesia* foi adotado em sua homenagem (RISTIC & LEVY, 1981). No Brasil, a babesiose é causada pela *B. bovis* e *B. bigemina*, sendo o carrapato do gênero *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* o único vetor (PAIVANETO, 2004).

MONTENEGRO (1992) observou que 70% dos casos de doenças hemotrópicas dos bovinos de países em desenvolvimento são devidos à *Babesia* spp.. Em 1981, McCosker estimou que mais de 600 milhões de bovinos de países tropicais e subtropicais, estariam expostos à infecção por *Babesia* spp., o que segundo Montenegro (1992), provoca prejuízo econômico de mais de 1,3 bilhão de dólares por ano. As perdas econômicas são devido à redução na produção de leite e carne, infertilidade temporária de machos e fêmeas, custo de tratamentos, gasto com medidas preventivas necessárias quando se introduz animal de áreas livres em áreas endêmicas e, principalmente, devido à mortalidade (GONÇALVES, 2000).

A babesiose também é conhecida como “malária bovina”, devido à semelhança dos quadros clínicos observados entre bovinos infectados por *Babesia*

bigemina e *Babesia bovis* e os quadros clínicos apresentado por seres humanos infectados por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (COOKE *et al.*, 2005). Os gêneros *Babesia* e *Plasmodium* pertencem ao filo Apicomplexa e apresentam características comuns no processo de invasão eritrocitária, sendo possível que reconheçam os mesmos receptores (DUBREMETZ, 1998). Nesse sentido, Taylor *et al.* (1990) e Menard (2001) sugeriram a presença de antígenos conservados nos estágios de invasão dos eritrócitos para todo o filo Apicomplexa.

As variações raciais e individuais de susceptibilidade ou resistência bovina à *Babesia* spp. são conhecidas, sendo as raças taurinas mais susceptíveis e as raças zebuínas mais resistentes à infecção por este protozoário (ZWART & BROCKLESBY, 1979; BOCK *et al.*, 1999a, 1999b). Bock *et al.* (1999a), em trabalho de desafio de bovinos contra a *B. bigemina*, constataram que tanto animais *Bos indicus* quanto cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus*), são mais resistentes que animais *Bos taurus*. Entretanto, foram observadas variações individuais dentro de cada grupo. Em outro estudo realizado com animais *Bos indicus* e cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus*), que não tiveram contato prévio com carrapatos, Bock *et al.* (1999b) observaram que animais puros têm alto grau de resistência à babesiose, enquanto que animais cruzados são suficientemente susceptíveis para garantir o uso de medidas preventivas.

Em geral, de acordo com a literatura, os animais indianos são mais resistentes aos carrapatos do que os taurinos (VILARES, 1941, UTECH *et al.*, 1978; PAIVA-NETO, 2004). Assim, este fato poderia explicar a maior resistência dos animais indianos à babesiose. Porém Bock *et al.* (1997), por meio de inoculação intravenosa de sangue contendo parasitas *B. bovis* e *B. bigemina*, verificaram que os

animais indianos eram mais resistentes aos parasitas, independentemente da resistência ao carrapato.

Uma possível explicação para os zebuínos serem menos susceptíveis à babesiose, é que estes convivem com hemoparasitas de *Babesia* spp. e carrapatos há milhares de anos sendo que, indivíduos susceptíveis sofrem uma maior pressão de seleção e, portanto, se mantêm em uma baixa frequência nas populações. Por outro lado, os taurinos estão expostos a estes hemoparasitas e carrapatos há pouco mais de algumas centenas de anos, não tendo sofrido igual pressão de seleção (DALGLIESH, 1993).

Apesar de algumas hipóteses terem sido levantadas, as bases bioquímicas, fisiológicas e genéticas dessas variações de resistência e susceptibilidade bovina à babesiose ainda não foram esclarecidas. Diante disso, a hipótese levantada a partir da revisão apresentada é que, a exemplo do que ocorre em humanos em relação à malária vivax, a resistência ou susceptibilidade dos bovinos à babesiose pode estar relacionada, entre outros fatores, à ausência ou presença do antígeno Duffy na superfície dos eritrócitos, em decorrência de alterações que por ventura ocorram na região 5' flanqueadora do gene que o codifica.

Objetivos



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

Possibilitar a realização de pesquisa de interesse estratégico visando o aprofundamento dos conhecimentos referentes aos mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos na característica de resistência ou susceptibilidade à babesiose, os quais poderão contribuir para o melhoramento genético de bovinos e conseqüentemente para o aumento da competitividade da pecuária nacional.

2.2- Objetivos específicos

Isolamento e identificação de polimorfismos na região reguladora (5' flanqueadora) do gene *Duffy* de bovinos, de maneira a permitir que essas regiões do genoma possam ser utilizadas como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético.

Materiais e Métodos



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MATERIAIS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências dos Laboratórios de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) e de Biologia Molecular Animal (LBMA), ambos situados no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Botucatu.

Amostras de sangue de 198 animais não aparentados, sendo 99 *Bos taurus* (72 da raça Angus e 27 da raça Holandesa) e 99 *Bos indicus* (68 da raça Nelore e 31 da raça Gir) foram fornecidas pelos Departamentos de Melhoramento e Nutrição Animal e de Produção e Exploração Animal e pela Fazenda São Manuel, todos pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu, pela Central Bela Vista Ltda. e pela Fazenda Clarão da Serra, ambas situadas no município de Pardinho/SP.

Amostras de medula óssea de três animais *B. indicus* e três animais *B. taurus* não aparentados foram fornecidas, respectivamente, pela Fazenda São Manuel e pelo Departamento de Produção e Exploração Animal.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Coleta de sangue

Amostras de 5 mL de sangue total foram colhidas por venipunctura da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos vacutainer (BD, EUA), contendo 7,5 mg de EDTA. Imediatamente após a coleta, o sangue foi homogeneizado em EDTA e mantido sob refrigeração em gelo.

3.2.2- Extração de DNA genômico de sangue

A extração do DNA genômico de cada um dos 198 animais estudados foi realizada a partir de uma alíquota de 200 μ L da amostra de sangue total, utilizando o procedimento proposto por Zadworny & Kuhnlein (1990) e modificado por Miretti (1998). Aos 200 μ L de sangue total foram acrescentados 700 μ L de solução TKM2 a 4 °C [Tris-HCl 1 M; KCl 1 M; MgCl₂ 1 M; EDTA 0,1 M; NaCl 1 M] e 150 μ L de SDS 10% previamente aquecido (55°C). Após homogeneização, esta solução foi incubada em banho termostático a 55 °C por 1 hora. Em seguida foram adicionados 500 μ L de NaCl 6 M saturado e a solução foi homogeneizada e centrifugada a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C. Um mililitro do sobrenadante foi transferido para tubos contendo o mesmo volume de álcool isopropílico gelado. Os DNAs precipitados foram transferidos para outro tubo contendo 1 mL de etanol 70% gelado. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets*, depois de secos, ressuspendidos em TE [Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,1 M]. Para verificação da quantidade e integridade do DNA, as amostras obtidas foram submetidas à eletroforese em géis de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio. As amostras foram comparadas a um padrão de concentração conhecida para serem posteriormente diluídas para concentração de trabalho de 10 ng/ μ L.

3.2.3- Amplificação da região 5' flanqueadora do gene *Duffy*

Os oligonucleotídeos, Duffy F – 5' TGAATGATACACAAGGAGCCC 3' e Duffy R – 5' GATGACAGAAGGAGCGAGG 3', utilizados para isolar e amplificar um fragmento de 707 pb da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* de bovinos foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 (ROZEN & SKALETSKY, 1998) com

base na seqüência depositada no GenBank pelo Bovine Genome Project (número de acesso: NW_402248.1), o qual foi coordenado pela International Society of Animal Genetics (ISAG) e conduzido por um consórcio internacional de Centros de Pesquisa. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 38 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 57 °C e 2 minutos a 72 °C. Cada reação continha 50 ng de DNA genômico, 0,75 unidades de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Science, EUA) com seu respectivo tampão (1X), 1,5 mM de MgCl₂, 0,24 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) e 0,12 µM de oligonucleotídeos Duffy F e Duffy R. O fragmento resultante foi visualizado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb para confirmação da especificidade da amplificação.

3.2.4- Sequenciamento da região 5' flanqueadora do gene *Duffy*

Do total de amplificações, 16, sendo oito amostras de *Bos indicus* (quatro amostras de Nelore e quatro de Gir) e oito amostras de *Bos taurus* (quatro de Holandês e quatro de Angus) foram realizadas utilizando-se a enzima *Taq* Pfu DNA polimerase (Fermentas Life Science, EUA), com seu respectivo tampão (1X) e 1,5 mM de MgSO₄, nas condições descritas acima, para posterior realização do sequenciamento direto.

A reação de sequenciamento direto seguiu o protocolo descrito pelo fabricante do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA), com modificações. Os produtos de PCR utilizados nas reações de sequenciamento foram purificados com a mistura de enzimas ExoSap-IT (GE, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos Duffy F e Duffy R foram utilizados como iniciadores para a enzima *AmpliTaq* DNA polimerase,

hibridizando-se à região 5' e 3' do produto de PCR, respectivamente. Cada reação contou com um volume final de 20 μL , sendo constituída de 2 μL do *Terminator Ready Reaction Mix* (Big Dye Terminator v 3,1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, EUA) com seu respectivo tampão (1X), 0,16 μM de oligonucleotídeo e 200 ng do produto de PCR purificado. A amplificação foi realizada em 25 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 52 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos.

As reações de sequenciamento foram precipitadas pela adição de 80 μL de isopropanol 65% e incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 25 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 200 μL de etanol 70% a temperatura ambiente. Depois de centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, o sobrenadante das amostras foi descartado e o *pellet* foi seco no escuro por 45 minutos a temperatura ambiente. Após este período, o *pellet* foi ressuscitado em 3 μL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA). As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e 1 μL de cada uma delas foi aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (4%). A eletroforese foi realizada no aparelho de sequenciamento automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, EUA). As seqüências geradas foram alinhadas utilizando-se o software Sequencher 3.1 (GeneCodes, EUA).

3.2.5- Genotipagem de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

A genotipagem de SNPs foi realizada por mini-sequenciamento utilizando-se o kit *ABI Prism SnaPshot Multiplex* (Applied Biosystems, EUA). As amplificações anteriormente realizadas com os oligonucleotídeos Duffy F e Duffy R foram quantificadas em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR foram purificados com a mistura de enzimas ExoSap-IT, segundo

as recomendações do fabricante. Cada reação de genotipagem foi composta de multiplex dos seguintes oligonucleotídeos reversos: SNP1- 5' AAGTGACGTGTTTGTGGGAG 3'; SNP2- 5' AGCCCCAGGACCACTTAC + 6C 3'; SNP3- 5' TGTTTACCCCACGCCAC + 10C 3' e SNP4- 5' GTAAAGACAGTTCCCCATGA +12C 3', os quais diferiam em tamanho de 4 pares de bases. As reações do mini-sequenciamento continham 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, tampão 1X [Tris HCl 20 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 9,0], 1 µL de *SnaPshot Multiplex Ready Reaction Mix* e 100 ng do produto de PCR purificado, constituindo um volume final de 10 µL. As amostras foram submetidas a 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 5 segundos a 50 °C e 30 segundos a 60 °C. Com o objetivo de eliminar os didesoxinucleotídeos (ddNTPs) não incorporados, as amostras foram tratadas com 1 U de fosfatase alcalina de camarão (SAP) (GE, EUA), a 37 °C por 1 hora e 80 °C por 20 minutos. Após adição de 11 µL de Formamida HI-DI, as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e 1 µL do seu volume foi aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (4%). A eletroforese foi realizada utilizando-se o aparelho de sequenciamento automático ABI Prism 377 DNA Sequencer.

3.2.6- Caracterização da região 5' flanqueadora do gene *Duffy*

A ocorrência de haplótipos determinados pelos polimorfismos encontrados na região 5' flanqueadora foi calculada utilizando o software Arlequin 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) empregando o método do algoritmo ELB.

O programa SIGNAL SCAN (PRESTRIDGE, 2000) e os bancos de dados de fatores de transcrição TDF e TRANSFAC foram utilizados para verificar, na região

seqüenciada, os possíveis sítios de ligação de elementos transcricionais já identificados em mamíferos.

3.2.7- Análise estatística

As freqüências dos alelos de cada um dos polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* e a freqüência dos genótipos formados por estes polimorfismos foram calculadas por contagem direta dos resultados obtidos pela genotipagem. As freqüências dos haplótipos determinados pelos quatro polimorfismos e dos genótipos formados pelos haplótipos foram calculadas utilizando o software Arlequin 3.01.

A comparação entre as freqüências dos SNPs, dos genótipos formados pelos SNPs, dos haplótipos e dos genótipos formados pelos haplótipos, entre as raças de cada espécie e entre as duas espécies, foi realizada pelo teste exato de Fisher por meio do software SAS Systems 8.1 (Instituto SAS, EUA).

3.2.8- Coleta de medula óssea

A coleta de medula óssea de três animais *Bos taurus* portadores do genótipo homozigoto CCAA e três animais *Bos indicus* portadores do genótipo homozigoto TTGG, foi realizada com agulha especial para biópsia aspirativa de medula óssea (Komiyashiki, Japão). Os animais foram contidos em decúbito lateral de maneira que o osso esterno permanecesse acessível. Depois de feita a anti-sepsia, a agulha foi pressionada sobre o esterno por meio de um movimento rotativo até atingir a cavidade medular. O mandril foi removido e conectou-se uma seringa de 20 mL, umedecida com EDTA a 3% diluído em solução fisiológica estéril. Foram aspirados

até 5 mL de material medular de cada animal e depois de homogeneizadas, as amostras foram mantidas sob refrigeração em gelo.

3.2.9- Extração do RNA total de medula óssea

Imediatamente após a coleta, o RNA total das amostras de medula óssea foi isolado utilizando o reagente *TRizol LS* (Invitrogen, EUA). Para tal, 300 µL de amostra foram homogeneizados com 700 µL de *TRizol*. A esse volume foram adicionados 200 µL de clorofórmio e seguiu-se homogeneização vigorosa e incubação a temperatura ambiente por mais 5 minutos. Na seqüência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e procedeu-se a precipitação do RNA pela adição de 500 µL de isopropanol gelado, incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e submetido a nova centrifugação a 7.500 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* seco a temperatura ambiente por 7 minutos. Após esta secagem, o *pellet* foi ressuscitado em 15 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato a 1% (DEPC). A integridade e quantidade do material foram verificadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e um RNA de concentração conhecida foi utilizado como padrão. A seguir, as amostras foram armazenadas a -80 °C para posterior utilização na síntese da fita de DNA complementar (cDNA).

3.2.10- Tratamento com DNase e transcrição reversa

As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase (Invitrogen, EUA) para garantir a pureza do material. Para tanto, alíquotas contendo

aproximadamente 1 µg do RNA total foram incubadas com 1 U de DNase a 37 °C por 30 minutos, seguido de incubação a 65 °C por 10 minutos após adição de 1 µL de EDTA a 25 mM.

As fitas de cDNA foram sintetizadas com o kit *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas Life Science, EUA), utilizando-se oligo dT (12-18), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A seguir, os produtos foram congelados a -20 °C para posterior utilização na PCR em tempo real.

3.2.11- Quantificação relativa da expressão do gene *Duffy*

A análise de PCR em tempo real foi realizada em equipamento Applied Biosystems Amp 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA) com o agente fluorescente *SybrGreen*.

As reações para a determinação da expressão do gene alvo (*Duffy*) e do gene controle (*GAPDH*) dos três animais *B. taurus* e três animais *B. indicus* foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços (Axygen Scientific, EUA). Os oligonucleotídeos para o gene *Duffy* (número de acesso: BT021079.1), *Duffy* RTF- 5' TGCGCTTCTCAGACCTTTGTT 3' e *Duffy* RTR- 5' GCCAGTTGCACCAGGGTAGA 3', quanto para o gene controle *Gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase* (*GAPDH*) (número de acesso: NM_001034034.1), *GAPDH* F- 5' ATGCCTCCTGCACCACCA 3' e *GAPDH* R- 5' TCATAAGTCCCTCCACGATGC 3', foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express versão 2.0 (Applied Biosystems, EUA).

Cada reação foi composta por 1,5 µL do cDNA (diluído cinco vezes), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e 5 µL de *SyBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), em um volume final de 10 µL. Para cada gene em estudo foram realizados controles negativos, também em triplicata, constituídos da mistura de

reagentes e água. A amplificação consistiu dos seguintes passos: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto. Em seguida uma curva de dissociação (CD) foi construída para cada amostra.

As análises do gene alvo foram realizadas em relação à quantidade de expressão do gene controle. Curvas de eficiência foram delineadas para os dois pares de oligonucleotídeos (Duffy e GAPDH). As reações foram realizadas com um *pool* de cDNA de todas as amostras em uma diluição seriada: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. Foram construídos gráficos dos valores dos Cts (ciclo do *threshold* - quantidade necessária de ciclos para que o alvo amplificado atinja o limiar fixado) de cada ponto da curva em relação à quantidade de RNA e foram calculadas as equações das retas. As eficiências dos oligonucleotídeos foram calculadas através da fórmula $E=10^{(-1/\text{inclinação})}$, sendo E igual a eficiência dos oligonucleotídeos e inclinação igual ao coeficiente de inclinação da reta formada pelos Cts obtidos em cada uma das amostras da diluição seriada.

A quantificação relativa (QR) do gene *Duffy* entre as três amostras de *B. taurus* (genótipo homozigoto CCAA) e três amostras de *B. indicus* (genótipo homozigoto TTGG) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) como segue: $\Delta Ct = Ct_{Duffy} - Ct_{GAPDH}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Bos\ indicus} - \Delta Ct_{Bos\ taurus}$; $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Sendo: Ct – ciclo do threshold; ΔCt – diferença entre o Ct do gene alvo (*Duffy*) e Ct do gene endógeno (*GAPDH*); $\Delta\Delta Ct$ – diferença entre o ΔCt da amostra (*Bos indicus*) e ΔCt do controle (*Bos taurus*); QR – quantificação relativa – determina o valor da expressão do gene alvo (*Duffy*) nas amostras (*B. indicus*) em relação ao grupo controle (*B. taurus*). Para os cálculos foram utilizadas as médias dos três animais *B. taurus* e três animais *B. indicus* e, no cálculo final da expressão relativa (QR), o erro foi estimado pela utilização do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando $\Delta\Delta Ct$ mais o

desvio padrão e $\Delta\Delta Ct$ menos o desvio padrão, de acordo com o proposto por Livak & Schmittgen (2001).

Resultados



4- RESULTADOS

4.1- Identificação de SNPs na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino

Com o objetivo de identificar SNPs na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* de animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, foram amplificados e seqüenciados fragmentos de 707 pares de base (Figura 1), que continham parte da região reguladora, a região 5' UTR, o primeiro exon e parte do intron do gene *Duffy* bovino. Através do alinhamento das seqüências obtidas foram identificadas 4 transições, três localizadas na região reguladora: SNP1 (-500 C>T); SNP2 (-186 C>T); SNP3 (-158 A>G) e uma na região 5' UTR: SNP4 (-3 A>G), considerando a posição +1 a adenina do códon de início da tradução (ATG).

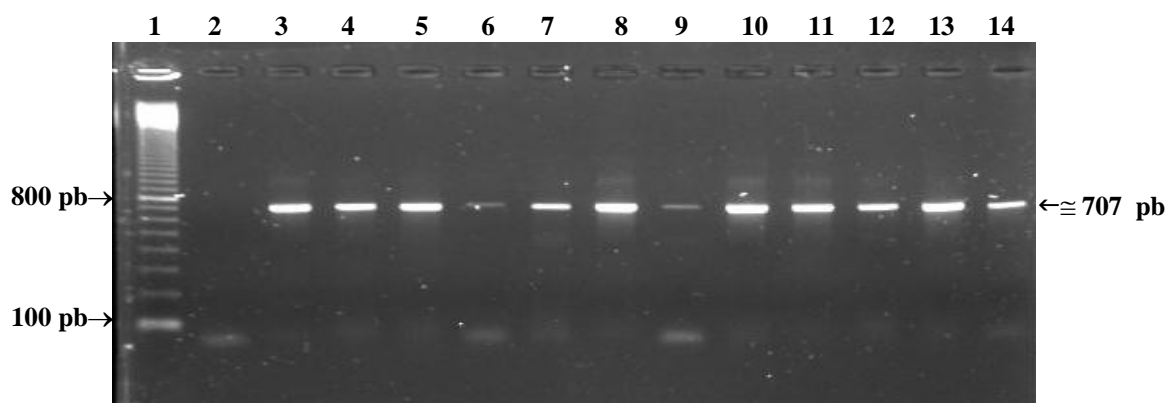


Figura 1: Resultado da amplificação da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino, após eletroforese em gel de agarose a 2%: coluna 1: marcador de peso molecular 100 pb, coluna 2: controle negativo (sem DNA), colunas 3 a 8: amostras de *Bos taurus* amplificadas, colunas 9 a 14: amostras de *Bos indicus* amplificadas. A legenda ao lado direito da figura indica o tamanho do fragmento amplificado em pares de bases.

4.2- Genotipagem dos SNPs

A genotipagem dos quatro SNPs localizados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino em animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, realizada por mini-sequenciamento, permitiu observar que a frequência alélica destes 4 SNPs variou significativamente ($P \leq 0,001$) entre as raças taurinas e zebuínas (Tabelas 1 e 5). Para o SNP1, os zebuínos apresentaram frequências de 59,1% para o alelo T e 40,9% para o alelo C, enquanto que nos taurinos o alelo C foi o mais frequente (98,0%), apresentando-se quase que de forma fixada. Para o SNP2, a maior parte dos zebuínos apresentou o alelo T (75,8%), enquanto que nos taurinos a forma predominante foi o alelo C, com 99,0% de frequência. Já os SNPs 3 e 4 apresentaram os mesmos alelos, ou seja, A ou G, sendo que entre os zebuínos a maior parte apresentou o alelo G em ambas as posições (81,3%) e entre os taurinos, predominou o alelo A (95,5%).

Em consequência disso, os genótipos determinados por estes alelos também variaram significativamente ($P \leq 0,001$) entre os animais *B. indicus* e *B. taurus* (Tabelas 2 e 5). Para os SNPs 1 e 2, a maior parte dos taurinos apresentou o genótipo homozigoto CC (96,0% e 98,0%, respectivamente), não sendo identificado nenhum animal homozigoto TT. Já entre os zebuínos ocorreram animais homozigotos para os dois genótipos, TT (36,4% e 55,6% para os SNP1 e SNP2, respectivamente) e CC (18,1% e 4%), e animais heterozigotos TC (45,5% e 40,4%). Da mesma forma que os SNPs anteriores, para os SNPs 3 e 4, a maior parte dos taurinos apresentou o genótipo homozigoto para um determinado alelo, AA, com frequência de 91,9%. Foi encontrado apenas um animal homozigoto GG e 7,1% dos animais apresentaram o genótipo heterozigoto AG para ambos os polimorfismos. Entretanto, há diferença significativa ($P \leq 0,05$) na frequência dos genótipos formados

por estes SNPs, quando a comparação ocorre entre as raças taurinas, sendo a frequência de heterozigotos 6,6 vezes maior nos animais da raça Holandesa em relação aos animais da raça Angus (Tabela 2). Entre os zebuínos, o genótipo mais comum foi o homozigoto GG, com frequência de 63,7%, seguido pelos genótipos heterozigoto AG (33,3%) e homozigoto AA (3,0%).

Na amostra de animais estudada, foram identificados 6 haplótipos putativos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino: CCAA (A), TTGG (B), CCGG (C), CTGG (D), TTAA (E) e TCAA (F) (Tabela 3) e 14 genótipos, como é mostrado na Tabela 4 e ressaltado na Figura 2: AA, AB, AC, AD, AE, AF, BB, BC, BD, CC, CD, CE, DD e EE. As distribuições alélica e genotípica desses haplótipos putativos também variaram significativamente ($P \leq 0,001$) entre as raças zebuínas e taurinas (Tabelas 3, 4 e 5). Apenas o haplótipo F não foi encontrado em animais indianos, e os haplótipos B e D não foram encontrados em taurinos, sendo o primeiro (B) o mais freqüente em *B. indicus* (58,0%). Apenas dois haplótipos F e dois haplótipos E foram encontrados em animais da raça Angus e dois haplótipos E foram encontrados em animais da raça Nelore. Já em taurinos, o haplótipo A foi o mais comum, com frequência de 93,5% e o haplótipo C ocorreu em 4,5% dos animais. A distribuição dos haplótipos variou significativamente ($P \leq 0,01$) entre as raças indianas, na qual o haplótipo C foi encontrado em 8,1% dos animais da raça Nelore e não foi encontrado em animais da raça Gir. Além disso, o haplótipo D foi encontrado com uma frequência 2,6 vezes maior em animais da raça Gir em comparação com os animais Neloires.

Com relação aos genótipos formados por estes haplótipos, em *B. taurus* foram encontrados 6 e em *B. indicus*, 10. O genótipo mais comum em taurinos foi o AA com frequência de 88,9%, seguido por AC (6,1%), que foi representado

principalmente por animais da raça Holandesa, que apresentaram freqüência de 18,5% para este genótipo. Os genótipos restantes, AE, AF, CC e CE, foram encontrados apenas em animais da raça Angus, em freqüência extremamente baixa (1,0; 2,0; 1,0 e 1,0%, respectivamente), considerando o total de animais taurinos. Já em animais indianos, a variabilidade foi maior, sendo os genótipos BB (35,4%), AB (21,2%), BD (18,2%) os mais freqüentes, AD (10,1%) e BC (6,1%) os de freqüência intermediária e CD (3,0%), AC (2,0%), AA (2,0%), DD (1,0%) e EE (1,0%) os de freqüência baixa. Entretanto, quando observa-se as raças indianas separadamente, para Nelore o genótipo BD é encontrados com freqüência intermediária (11,8%) e o genótipo DD não foi identificado em nenhum animal. Já para a raça Gir, o genótipo AD é encontrado em alta freqüência (19,4%) e o genótipo AB possui freqüência intermediária (12,9%). Os genótipos AC, BC, CD e EE não foram identificados na amostra de animais da raça Gir.

Como observado, a Tabela 5 resume os resultados da análise estatística realizada pelo teste exato de Fisher. A diferença observada entre as freqüências dos SNPs, dos genótipos formados pelos SNPs, dos haplótipos e dos genótipos formados pelos haplótipos, entre as duas espécies foi significativa ($P \leq 0,001$). Já a diferença encontrada entre as raças indianas só foi significativa para os haplótipos ($P \leq 0,01$) e genótipos formados pelos haplótipos ($P \leq 0,05$) e entre as raças taurinas, foi significativa para os genótipos dos SNPs 3 e 4 ($P \leq 0,05$) e genótipos formados pelos haplótipos ($P \leq 0,05$).

Tabela 1 - Freqüências alélicas observadas para cada um dos polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Grupos Genéticos						
Alelos	Nelore (n=68)	Gir (n=31)	<i>Bos indicus</i> (n= 99)	Angus (n=72)	Holandês (n=27)	<i>Bos taurus</i> (n=99)
SNP1						
T	0,625	0,516	0,591	0,028	0,00	0,020
C	0,375	0,484	0,409	0,972	1,00	0,980
SNP2						
T	0,735	0,806	0,758	0,014	0,00	0,010
C	0,265	0,194	0,242	0,986	1,00	0,990
SNP3						
A	0,199	0,194	0,197	0,972	0,907	0,955
G	0,801	0,806	0,803	0,028	0,093	0,045
SNP4						
A	0,199	0,194	0,197	0,972	0,907	0,955
G	0,801	0,806	0,803	0,028	0,093	0,045

Tabela 2 - Freqüências dos genótipos determinados por cada um dos polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Grupos Genéticos						
Genótipos	Nelore (n=68)	Gir (n=31)	<i>Bos indicus</i> (n= 99)	Angus (n=72)	Holandês (n=27)	<i>Bos taurus</i> (n=99)
SNP1						
TT	0,397	0,290	0,364	0,000	0,000	0,000
TC	0,456	0,452	0,455	0,056	0,000	0,040
CC	0,147	0,258	0,181	0,944	1,000	0,960
SNP2						
TT	0,515	0,645	0,556	0,000	0,000	0,000
TC	0,441	0,323	0,404	0,028	0,000	0,020
CC	0,044	0,032	0,040	0,972	1,000	0,980
SNP3						
AA	0,029	0,032	0,030	0,958	0,815	0,919
AG	0,338	0,323	0,333	0,028	0,185	0,071
GG	0,633	0,645	0,637	0,014	0,000	0,010
SNP4						
AA	0,029	0,032	0,030	0,958	0,815	0,919
AG	0,338	0,323	0,333	0,028	0,185	0,071
GG	0,633	0,645	0,637	0,014	0,000	0,010

Tabela 3 - Frequências dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Grupos Genéticos						
Haplótipos	Nelore (n=68)	Gir (n=31)	<i>Bos indicus</i> (n= 99)	Angus (n=72)	Holandês (n=27)	<i>Bos taurus</i> (n=99)
A	0,184	0,194	0,187	0,944	0,907	0,935
B	0,610	0,516	0,580	0,000	0,000	0,000
C	0,081	0,000	0,056	0,028	0,093	0,045
D	0,110	0,290	0,167	0,000	0,000	0,000
E	0,015	0,000	0,010	0,014	0,000	0,010
F	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,010

Tabela 4 - Freqüências dos genótipos resultantes dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Grupos Genéticos						
Genótipos	Nelore	Gir	<i>Bos indicus</i>	Angus	Holandês	<i>Bos taurus</i>
	(n=68)	(n=31)	(n= 99)	(n=72)	(n=27)	(n=99)
AA	0,015	0,032	0,020	0,916	0,815	0,889
AB	0,250	0,129	0,212	0,000	0,000	0,000
AC	0,029	0,000	0,020	0,014	0,185	0,061
AD	0,059	0,194	0,101	0,000	0,000	0,000
AE	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,010
AF	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,020
BB	0,382	0,290	0,354	0,000	0,000	0,000
BC	0,088	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000
BD	0,118	0,323	0,182	0,000	0,000	0,000
CC	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,010
CD	0,044	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000
CE	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,010
DD	0,000	0,032	0,010	0,000	0,000	0,000
EE	0,015	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000

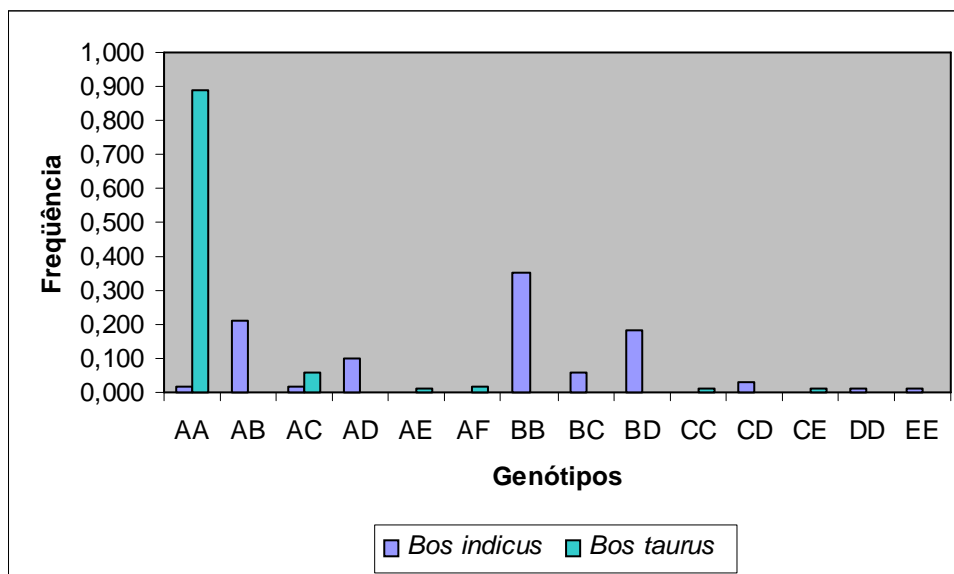


Figura 2 - Frequências dos genótipos resultantes dos haplótipos determinados pelo conjunto de polimorfismos identificados na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* em animais *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Tabela 5 – Comparação entre as freqüências dos SNPs, dos genótipos formados pelos SNPs, dos haplótipos e dos genótipos formados pelos haplótipos, entre as raças de *Bos indicus* e *Bos taurus* e entre as duas espécies, realizada pelo teste exato de Fisher.

	Gir X Nelore	Holandês X Angus	<i>Bos indicus</i> X <i>Bos taurus</i>
Alelos			
SNP1	NS	NS	* * *
SNP2	NS	NS	* * *
SNP3	NS	NS	* * *
SNP4	NS	NS	* * *
Genótipos			
SNP1	NS	NS	* * *
SNP2	NS	NS	* * *
SNP3	NS	*	* * *
SNP4	NS	*	* * *
Haplótipos	* * ¹	NS ²	* * *
Genótipos dos haplótipos	*	*	* * *

* * * $P \leq 0,001$, * * $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$, NS: não significativo

¹ não considerou o haplótipo F

² não considerou os haplótipos B e D

4.3- Caracterização da região 5' flanqueadora do gene *Duffy*

Na análise de caracterização da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* utilizando o programa SIGNAL SCAN (PRESTRIDGE, 2000) e os bancos de dados de fatores de transcrição TDF e TRANSFAC, foram encontrados possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição existentes nessa região, sendo que alguns desses se apresentam sobrepostos como mostra a Figura 3. Dentre os sítios putativos mais comuns em *B. taurus*, foram encontrados oito para o fator AP-2 (*activator protein-2*), dois para o fator de transcrição eritróide GATA1 (*GATA transcriptional factor 1*), sete consenso gamma-IRE (*interferon- gamma response element*), seis para o fator Sp1 (*specific protein 1*), quatro para PEA3 (*polyomavirus enhancer activator 3*) e um para CREB (*cAMP response element-binding*). Em *Bos indicus*, as timinas, bases mais comuns no SNP1 (-500) e no SNP2 (-186), alteram dois sítios putativos para fatores de transcrição. A presença de timina no SNP1 forma um sítio consenso cis para um elemento regulatório negativo (NRE Box 1 CS) entre as bases -504 e -496, excluindo os sítios AP-2 e Sp1, mais freqüentes em *B. taurus*. Em relação ao SNP2, a timina insere um consenso cis do sítio gamma-IRE, entre as bases -186 e -178, que não é encontrado nos indivíduos com a citosina nesta posição.

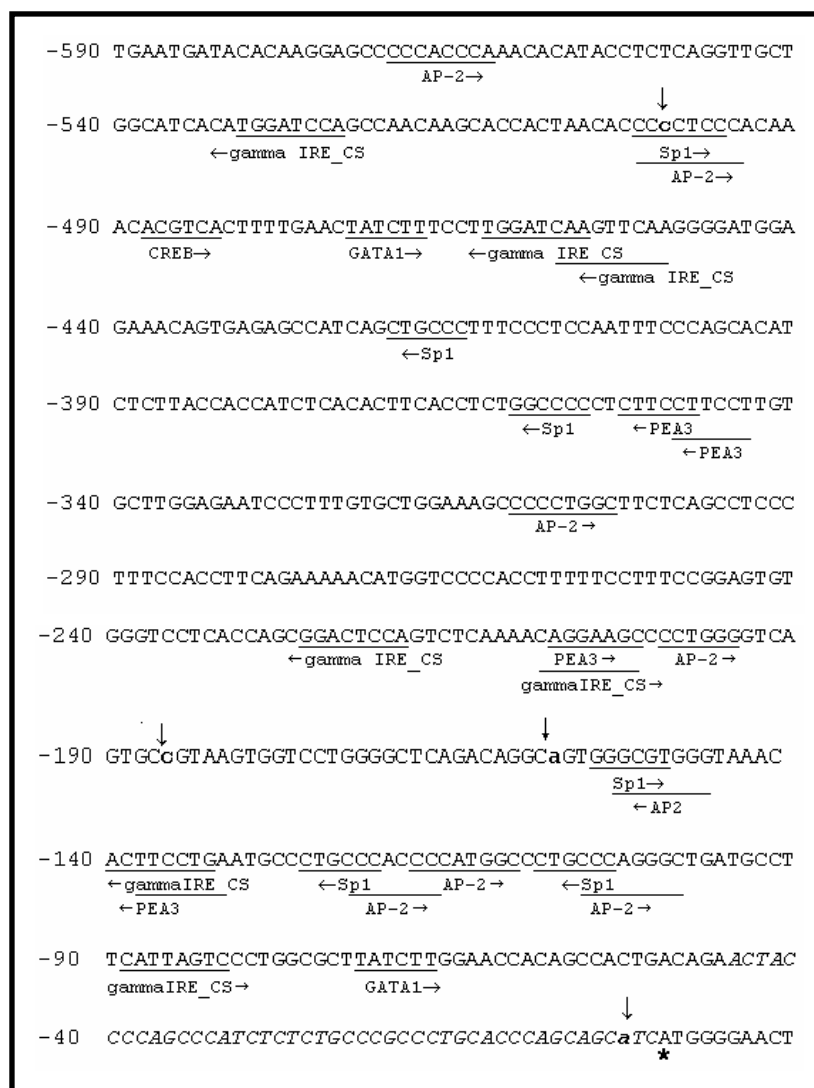


Figura 3: Caracterização da seqüência de nucleotídeos da região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino. Na seqüência, a posição +1 corresponde a adenina do códon do início da tradução (indicada por um asterisco). Nucleotídeos da região 5' não traduzida (5' UTR) estão representados em itálico. Nucleotídeos destacados com letras minúsculas e seta (↓) indicam o loco do SNP com as bases mais comuns em *Bos taurus*. SNP1: -500, SNP2: -186, SNP3: -158 e SNP4: -3. Setas indicam a orientação dos sítios putativos: cis (→) e trans (←).

4.4- Análise da expressão do gene *Duffy* em animais *Bos taurus* e *Bos indicus*

A PCR em tempo real foi realizada para verificar a existência de diferença na expressão do gene *Duffy* entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus* portadores dos genótipos mais comuns em cada espécie. Para tal, foram utilizadas amostras de medula óssea de três animais *Bos taurus*, de genótipo homozigoto CCAA, e três *Bos indicus* de genótipo homozigoto TTGG.

A Figura 4 mostra as curvas de dissociação dos produtos de amplificação para o gene analisado (*Duffy*) e para o gene controle (*GAPDH*). As curvas de dissociação formam picos únicos, o que demonstra a presença de um único produto amplificado e ausência de formação de dímeros de oligonucleotídeos para os dois genes analisados. Também é possível observar que, com relação à dissociação, os produtos gerados não diferem entre *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Pelo fato das eficiências de amplificação do gene alvo (*Duffy*) e do controle (*GAPDH*), terem sido parecidas e próximas de 100% ($E_{Duffy}=1,99$ e $E_{GAPDH}=2,12$), como observado na Figura 5, a quantificação relativa foi feita utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

A Tabela 6 mostra os dados da determinação da QR do gene *Duffy* nas amostras de animais *Bos indicus* em relação aos animais *Bos taurus*. Observa-se que não houve expressão diferencial (0,93) do gene *Duffy* entre os animais das duas espécies estudadas.

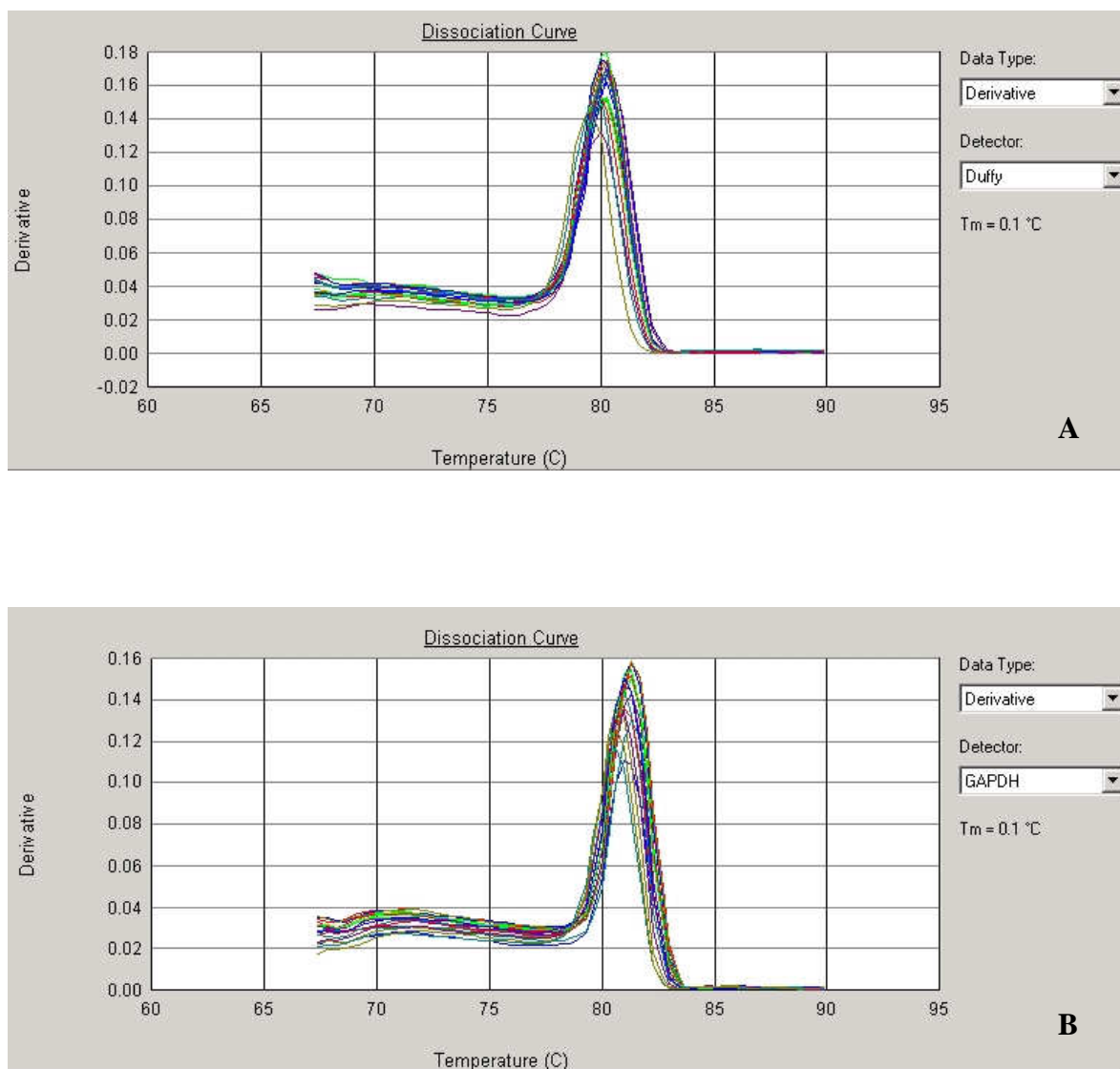


Figura 4: Curva de dissociação dos produtos de amplificação para o gene *Duffy* (A) e para o gene controle *GAPDH* (B) para as amostras de *Bos taurus* e *Bos indicus*. A altura do pico indica a intensidade da fluorescência, relacionada à quantidade de cópias geradas durante a amplificação. A temperatura de dissociação, aproximadamente 80 °C para o gene *Duffy* e 81 °C para o gene *GAPDH*, está relacionada ao tamanho e composição do produto de PCR.

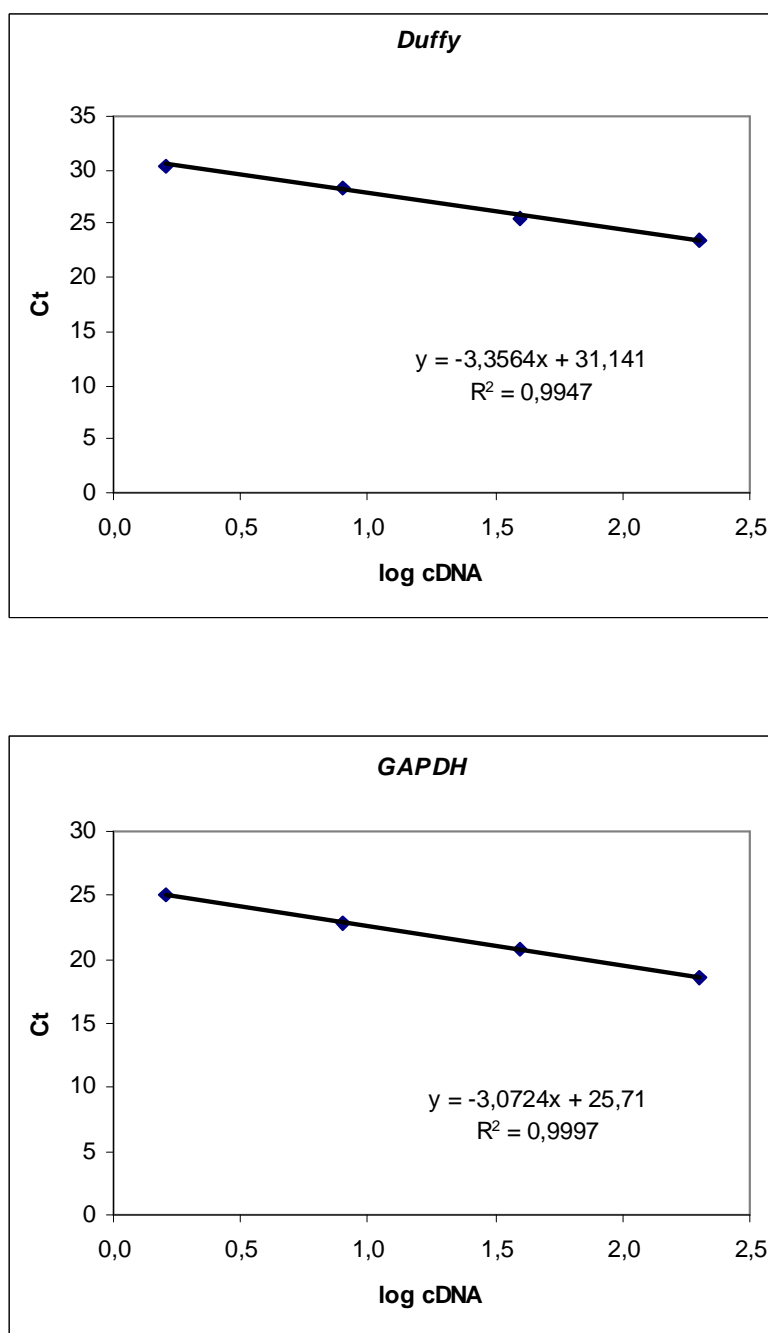


Figura 5: Curva padrão de eficiência da amplificação, por PCR em tempo real, para o gene alvo (*Duffy*) (A) e para o gene controle (*GAPDH*) (B). As médias dos valores de Ct das triplicatas de amplificação foram utilizadas para gerar as curvas. Para os dois genes analisados os valores de eficiência de amplificação foram similares, próximas de 100%.

Tabela 6: Dados da determinação da quantificação relativa do gene *Duffy* nas amostras de animais *Bos indicus* em relação aos animais *Bos taurus*, pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Espécie	Ct <i>Duffy</i>	Ct <i>GAPDH</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Quantificação relativa do gene <i>Duffy</i>
<i>Bos taurus</i>	22,31	18,02			
	23,03	18,91			
	22,81	18,82			
Média	22,72	18,58	4,13	0,00	
	(±0,37)	(±0,49)	(±0,15)	(±0,15)	1,00 (0,90-1,11)
<i>Bos indicus</i>	24,15	19,79			
	20,36	16,55			
	20,61	16,10			
Média	21,71	17,48	4,23	0,10	
	(±2,12)	(±2,01)	(±0,37)	(±0,37)	0,93 (0,73-1,21)

Discussão



5- DISCUSSÃO

O antígeno Duffy é o único receptor para o *Plasmodium vivax* (MILLER *et al.*, 1976), hemoparasita do filo Apicomplexa que causa a malária vivax em humanos. A resistência a este parasita pela maioria dos indivíduos negros africanos e seus descendentes é devido a uma mutação na região promotora do gene que impede a sua transcrição apenas nos eritrócitos (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b). Em relação a babesiose bovina, sabe-se que animais de raças taurinas são mais susceptíveis à infecção pelo parasita quando comparados aos animais de raças zebuínas (ZWART & BROCKLESBY, 1979; BOCK *et al.*, 1999a, 1999b). Baseado nestas evidências, o presente estudo foi realizado objetivando verificar se o mesmo processo de resistência observado em humanos ocorre em bovinos.

Neste sentido, o isolamento e caracterização da região promotora do gene *Duffy* bovino revelou a presença de 4 SNPs, todos transição, que apresentaram diferenças significativas de frequência ($P \leq 0,001$) entre animais *B. indicus* e *B. taurus*. Nos SNPs 1 (-500) e 2 (-186) foram encontradas as bases pirimidínicas timina ou citosina, enquanto que nos SNPs 3 (-158) e 4 (-3), foram encontradas as bases purínicas guanina ou adenina. Caso as mutações fossem aleatórias, a taxa de transição sobre a taxa transversão deveria ser 0,5, já que existem duas possibilidades de transição e quatro possibilidades de transversão (VIGNAL, 2002). Porém, dados deste e de outros trabalhos indicam clara tendência às transições. Collins & Jukes (1994) compararam seqüências humanas e de roedores e verificaram que a taxa de transição foi 1,4 vezes maior que a taxa de transversão. Já os resultados de estudos com EST (*expressed sequence tags*) humanas, indicaram que a taxa de transição foi 1,7 vezes maior que a taxa de transversão (PICOULT-NEWBERG, 1999). O fato de apenas transições terem sido identificadas

possivelmente se deve ao tamanho relativamente pequeno da região isolada e caracterizada.

Os alelos mais comuns para os SNPs 1, 2, 3 e 4 em animais zebuínos foram T, T, G, G, com frequência de 59,1%, 75,8%, 80,3% e 80,3%, respectivamente, e em taurinos, C, C, A, A, com frequência de 98%, 99%, 95,5% e 95,5%, respectivamente. Os SNPs 3 e 4 sempre se acompanham, ou seja, sempre que a adenina é encontrada no polimorfismo 3, ela também é encontrada no polimorfismo 4 e vice-versa. Os genótipos determinados por cada um desses polimorfismos também variaram significativamente ($P \leq 0,001$) entre as espécies zebuínas e taurinas. Entre os taurinos a maior parte foi homocigota em cada loco, para uma determinada base (CC-96,0%; CC-98,0%; AA-91,9%; AA-91,9%, para os SNPs 1, 2, 3 e 4, respectivamente) e, entre os zebuínos a maior parte foi homocigota para o alelo menos freqüente em *B. taurus* (TT-55,6%, GG-63,7%, GG-63,7%, para os SNPs 2, 3 e 4, respectivamente) ou heterocigota (TC-45,5% para o SNP1). Como esta região está sendo caracterizada em bovinos pela primeira vez, não existem dados de literatura para a comparação dos resultados obtidos.

No total, foram estabelecidos 6 haplótipos putativos e 14 genótipos determinados por estes haplótipos, na amostra de animais estudados. Em taurinos, a variabilidade observada foi menor do que a encontrada entre os zebuínos, considerando a presença de diferentes haplótipos e conseqüentemente os diferentes genótipos formados. A maior parte dos animais taurinos foi homocigota para o genótipo AA (88,9%), enquanto que entre os zebuínos os genótipos mais comuns foram BB (35,4%), AB (21,2%) e BD (18,2%).

Algumas variações foram significativas entre as raças de cada espécie. Em taurinos, apesar da frequência dos alelos não ter sido significativamente diferente

entre animais Holandeses e Angus, ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,05$) na formação dos genótipos dos SNPs 3 e 4. Isto provavelmente ocorreu devido à frequência 6,6 vezes maior de heterozigotos em animais da raça Holandesa em relação aos animais da raça Angus. Houve também diferenças nos genótipos formados pelos haplótipos ($P \leq 0,05$), que pode ser explicada pela frequência 13 vezes maior do genótipo AC nos Holandeses em relação aos Angus. Nesta última raça, os haplótipos C encontrados levaram a formação de um genótipo AC, um CE e um homozigoto CC, sendo que em animais Holandeses todos os haplótipos C formaram o genótipo AC. Em relação aos animais indianos, as diferenças encontradas foram na frequência dos haplótipos ($P \leq 0,01$) e também na frequência dos genótipos formados pelos haplótipos ($P \leq 0,05$). Essas diferenças provavelmente são resultado das variações de frequência dos haplótipos C, D e E observadas entre os animais da raça Nelore e os animais da raça Gir e as diferentes combinações dos haplótipos para formar os genótipos. Entretanto, a utilização de uma amostra com maior número de animais não aparentados provenientes de diferentes rebanhos seria útil para confirmar as diferenças encontradas dentro de cada espécie. Já as diferenças entre as duas espécies são evidentes, independentemente da amostra estudada.

Esse conjunto de resultados mostrou que há maior homogeneidade entre os animais taurinos e maior heterogeneidade entre os animais zebuínos. Tal situação pode ser consequência da formação do gado zebuíno na América do Sul. Meirelles *et al.* (1999), verificaram que entre os animais zebuínos brasileiros das raças Gir e Nelore registrados, puros de origem importados (POI) ou puros de origem (PO), e animais da raça Brahman, apenas um terço (35%) apresentaram DNA mitocondrial de *B. indicus*. Segundo os autores, isto ocorre devido à existência de uma grande

proporção de linhagens maternas de zebu americano derivadas de cruzamento de fêmeas nativas de origem taurina com touros importados do continente indiano. Desses cruzamentos, provavelmente restaram resquícios do genoma taurino nas seqüências do gado indiano brasileiro. Segundo Bradley *et al.* (1998) introgressões do genoma de uma espécie bovina na outra parecem ser comuns já que cruzamentos entre elas têm ocorrido há milhares de anos, uma vez que ambas foram domesticadas e puderam ser transportadas através de barreiras geográficas. Identificações de haplótipos espécie-específicos podem ser importantes em programas de melhoramento, onde determinado haplótipo esteja associado à características de importância econômica. Dessa forma, a identificação de haplótipos indianos associados à características de resistência a parasitas seriam importantes para programas de melhoramento genético bovino por introgressão, assim como outros já identificados para outras características de interesse econômico. Lagziel *et al.* (1998) associaram o haplótipo indiano do gene do hormônio de crescimento com o aumento da concentração protéica do leite em gado leiteiro taurino. Estes autores sugeriram que haplótipos indianos localizados em outros genes candidatos poderiam afetar outras características de importância econômica e poderiam ser utilizados para melhorar as raças taurinas. Hale *et al.* (2000) verificaram uma situação contrária, na qual o haplótipo indiano do gene do receptor do hormônio de crescimento representou desvantagem para o crescimento de bovinos, sugerindo que a seleção assistida por marcadores deveria ser feita contra o mesmo. Já Curi *et al.* (2005a) verificaram que o haplótipo taurino do gene do receptor do hormônio de crescimento encontrado no gado indiano apresentava vantagem para o crescimento bovino.

A análise *in silico* de sítios putativos para fatores de transcrição na região isolada mostrou que o promotor do gene *Duffy* bovino não possui seqüência TATA Box nem CAAT Box, assim como o promotor do gene *Duffy* humano (TOURNAMILLE *et al.*, 1995) e murino (LUO *et al.*, 1997). Como é comum em genes que não possuem TATA Box, foram encontrados numerosos sítios putativos para o fator Sp1, os quais são ricos em GC. Estes sítios para Sp1 são considerados uns dos responsáveis pelo recrutamento da proteína de ligação TATA (*TATA-binding protein*) na ausência da TATA box (PUGH & TJIAN, 1991). Assim como no promotor murino, foram encontrados sítios potenciais para AP-2 (*activator protein 2*), PEA3 (*enhancer activator 3*) e CREB (*cAMP response element binding*) (LUO *et al.*, 1997). Também foram encontrados dois sítios putativos para o fator eritróide GATA 1. Em humanos, uma mutação neste sítio (-33 T>C) é responsável por abolir a expressão do antígeno Duffy apenas nos eritrócitos (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b), conferindo resistência ao parasita *P. vivax* (MILLER *et al.*, 1976), o que ocorre com a maioria dos negros africanos e seus descendentes. Além desses sítios putativos já identificados anteriormente nos promotores do gene *Duffy* de outras espécies (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; LUO *et al.*, 1997), também foram encontrados sete consensos do sítio gamma-IRE (*interferon-gamma response element*). O consenso deste sítio foi descrito no promotor do gene humano *HLA-DPA* (*major histocompatibility complex, class II, DP alpha*), cuja expressão é aumentada na presença de interferon gamma (YANG *et al.*, 1990).

Além disso, no SNP1, a timina, mais frequente em *B. indicus*, exclui os sítios AP-2 e Sp1 encontrados com a citosina nesta posição e insere um consenso cis de um sítio putativo para um elemento regulatório negativo (NRE Box 1 CS), descrito por Baniahmad *et al.* (1987). Já a timina do SNP2 insere mais um consenso de um

sítio putativo gamma-IRE (*interferon-gamma response element*). Apesar dessas alterações, a análise de expressão do gene *Duffy*, por PCR em tempo real, em animais homozigotos para haplótipos contrastantes mais freqüentes em cada espécie, mostrou que não há diferença na expressão gênica deste antígeno, indicando que os SNPs encontrados não influenciam no processo de transcrição. Apesar da amostra de animais utilizada ser pequena, pode-se afirmar que ocorre transcrição do antígeno *Duffy* em ambas as espécies, porém um número maior de animais seria desejável para a confirmação da inexistência de variações da expressão gênica dentro e entre as espécies. Cabe ressaltar que além da regulação transcricional, pode haver controles pós-transcricionais, mediados por elementos de ação cis localizados nas regiões 5' e 3'UTR do RNA mensageiro (MIGNONE *et al.*, 2002). Com a PCR em tempo real, não foi possível analisar se há diferença na expressão do antígeno *Duffy* devido ao polimorfismo no SNP4, localizado na região 5'UTR.

Além disso, alterações na seqüência codificante também podem influenciar na expressão protéica (GUIMARÃES & COSTA, 2002). Nesse sentido, KIMCH-SARFATY *et al.* (2007), verificaram que mesmo mutações silenciosas, que não alteram a seqüência de aminoácidos, podem alterar a quantidade da proteína expressa, provavelmente porque é afetada a co-tradução e dobramento da proteína. O alinhamento de exons e introns do gene *Duffy* de *B. indicus* e *B. taurus* mostrou 99,6% de identidade entre as duas seqüências. As cinco alterações encontradas foram: duas transversões (572 C>G e 647 T>G), uma inversão de dinucleotídeo (1030-1031 GA>AG) e uma transição (1343 A>G). A alteração 572 C>G localizada na região intrônica, não afeta a seqüência da proteína. A alteração 647 T>G substitui na posição 22 o aminoácido fenilalanina encontrado em *B. taurus* por uma leucina

em *B. indicus*. Já a inversão 1030-1031 GA>AG resulta na alteração 152 Arg> Glu e a transição 1343 A>G é uma alteração silenciosa (MARTELINE, 2003). Em humanos, a mutação 265 C>T na região codificante do exon 2 do alelo FY*B, a qual promove a troca do aminoácido 89 Arg>Cys na cadeia peptídica, é responsável pelo enfraquecimento do antígeno Fy^b e caracteriza o FY*X postulado por Chown *et al.* em 1965. Esta mutação enfraquecedora de Fy^b, quando presente, acompanha-se da mutação 298 G>A no mesmo alelo Fy^b, que leva à substituição 100 Ala>Thr na cadeia peptídica, podendo esta última também ser encontrada isoladamente (OLSON *et al.*, 1998; PARASOL *et al.*, 1998). Porém, de acordo com Yazdanbakhsh *et al.* (2000) esta mutação 100 Ala>Thr não influencia na expressão da proteína. Estudos que quantifiquem o antígeno Duffy nos eritrócitos bovinos serão potencialmente úteis para verificar se as alterações na região codificante e/ou 5'UTR tem a propriedade de alterar a quantidade de proteína expressa.

De acordo com o modelo teórico construído por *Threading* do antígeno Duffy bovino, a troca 22 Phe>Leu está localizada na região N-terminal e a troca 152 Arg> Glu está no fim da quarta alfa hélice transmembrana da proteína (comunicação pessoal, BRAZ). Pelo fato de tanto a arginina quanto a glutamina do aminoácido 152 favorecerem a alfa hélice (PETSKO & RINGE, 2004), provavelmente esta alteração não afeta a estrutura da proteína. Embora a troca 22 Phe>Leu ocorra entre dois aminoácidos apolares, a fenilalanina possui um anel aromático que pode influenciar na interação com outras proteínas.

Em humanos, o sítio de reconhecimento no antígeno Duffy pela região II da proteína de ligação ao Duffy do *P. vivax* (PvDBP-RII) está localizado entre os aminoácidos Ala8 e Tyr30 (TOURNAMILLE *et al.*, 2005). Deste modo, se o antígeno Duffy for o receptor para parasitas da babesiose bovina, é possível que o sítio de

reconhecimento do parasita também esteja localizado na região N-terminal do antígeno Duffy bovino e alterações nesta região poderiam influenciar a ligação do parasita ao receptor. Considerando-se esta hipótese, estudos de associação entre o SNP 647 T>G e a característica de resistência à babesiose em populações cruzadas *B. indicus* X *B. taurus* seria de interesse.

Entretanto, diferentemente do *P. vivax*, cujo único receptor é o antígeno Duffy, o *Plasmodium falciparum*, possui múltiplas vias de invasão do eritrócito (MICHON *et al.*, 2002). Entre os receptores identificados estão a glicoforina A (SIM *et al.*, 1994), B (DOLAN *et al.*, 1994) e C (MAIER *et al.*, 2003) bem como receptores não conhecidos denominados X (DOLAN *et al.*, 1994), Y (RAYNER *et al.*, 2001), Z (DURAISHINGH *et al.*, 2003) e E (GILBERGER *et al.*, 2003). Além disso, algumas linhagens utilizam predominantemente ligantes que interagem com receptores que contem ácido siálico e outras que se ligam a receptores independentemente ao ácido siálico (DURAISHINGH *et al.*, 2003).

Embora existam poucos estudos para as babésias em relação aos plasmódios, alguns potenciais receptores já foram descritos para estes parasitas (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Alguns estudos indicaram os resíduos de ácido siálico de eritrócitos bovinos como receptores para parasitas da babesiose bovina (*B. bovis*, *B. divergens*, *B. bigemina*) no processo de invasão eritrocitária pelos merozoítas (KANIA *et al.*, 1995; ZINTL *et al.*, 2002a, GAFFAR *et al.*, 2003, LOBO, 2005). Adicionalmente foi mostrado que *B. bovis* e *B. divergens*, podem invadir não só eritrócitos bovinos, mas também eritrócitos humanos e de outros animais por mecanismos dependentes de ácido siálico (GAFFAR *et al.*, 2003, ZINTL *et al.*, 2002a, b), sendo que Lobo (2005) identificou as glicoforinas A e B dos eritrócitos humanos como sendo os prováveis receptores para a *B. divergens*.

Além disso, proteínas sensíveis à tripsina ou α -quimiotripsina também são potenciais receptores para as babesias (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Kania *et al.* (1995) verificaram que o pré-tratamento *in vitro* de eritrócitos bovinos com tripsina diminui a invasão dos eritrócitos por *B. bigemina*, enquanto que a α -quimiotripsina teve pouco efeito na redução da invasão. Por outro lado, a invasão dos eritrócitos por *B. divergens* não foi afetada pelo tratamento com tripsina, enquanto que o pré-tratamento com α -quimiotripsina levou a redução do crescimento do parasita (ZINTL *et al.*, 2002a). Na mesma linha, Gaffar *et al.* (2003) demonstraram os efeitos inibitórios da tripsina e α -quimiotripsina na invasão dos eritrócitos por *B. bovis*. Estes resultados indicaram que pode haver diferentes receptores sensíveis a estas degradações proteolíticas ou diferentes vias nos passos de invasão dos eritrócitos para as diferentes espécies de babesias (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

Proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas entre *B. taurus* e *B. indicus*, e sensíveis a algum desses tratamentos enzimáticos, podem ser potenciais receptores aos parasitas da babesiose e, conseqüentemente, um dos possíveis fatores que explique a resistência diferencial a esta infecção entre as duas espécies de animais. Apesar do antígeno Duffy ser sensível ao tratamento com quimiotripsina (Barnwell *et al.*, 1989) e a região promotora deste gene possuir frequências diferentes de haplótipos formados por quatro SNPs entre animais indianos e taurinos, os resultados deste trabalho indicaram que não há expressão diferencial do gene *Duffy* entre as duas espécies de bovinos. Porém, estudos de expressão protéica serão necessários para confirmar se a quantidade de proteína na membrana dos eritrócitos é semelhante entre as duas espécies, uma vez que trabalhos têm demonstrado que o conteúdo de uma proteína na célula nem sempre é reflexo direto da abundância do seu RNA mensageiro específico (GYGI *et al.*,

1999; CHEN *et al.*, 2002). Além disso, alterações da seqüência de aminoácidos existentes entre a proteína produzida por animais taurinos e zebuínos também podem ser fatores que influenciam na interação com outras proteínas.

Conclusão



6- Conclusão

Apesar de terem sido encontrados 4 SNPs na região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino, com diferença significativa de frequência ($P \leq 0,001$) entre animais indianos e taurinos e, as timinas nos SNPs 1 e 2, mais comuns em *B. indicus*, alterarem os sítios putativos para fatores de transcrição da região, a análise por PCR em tempo real de animais com genótipos homozigotos mais frequentes em cada espécie, os quais são contrastantes para todos os SNPs, revelou não haver diferença de expressão do gene *Duffy* entre os grupos genéticos estudados. Dessa forma, conclui-se que os polimorfismos identificados não influenciam na transcrição do RNA mensageiro do antígeno Duffy e que conseqüentemente, essa região do genoma não se apresenta promissora, a princípio, para a utilização em programas de melhoramento genético bovino para a característica de resistência à babesiose.

Referências Bibliográficas



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABÈS, V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. **Comp. Rendues de l'Académ. Sci.**, v.107, p.692-4, 1888.
- BANIAHMAD, A., MULLER, M., STEINER, C., RENKAWITZ, R. Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. **EMBO J.**, v.6, p.2297-2303, 1987.
- BARNWELL, J.W., NICHOLSI, M.E., RUBINSTEINI, P. In vitro evaluation of the role of the duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J. Exp. Med.**, v.169, p.1795-1982, 1989.
- BEATTIE, K.M. The Duffy blood group system: distribution, serology and genetics. In: PIERCE, S. R., MacPHERSON, C. (Eds) **Blood group systems**: Duffy, Kidd and Lutheran. Arlington: American of Blood Banks, 1988. p.1-25.
- BOCK, R.E., DE VOS, A.J., KINGSTON, T.G., mCIELLAN, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Aust. Vet. J.**, v.75, p.337-40, 1997.
- BOCK, R.E., KINGSTON, T.G., STANDFAST, N.F., DE VOS, A.J. Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of *Babesia bigemina*. **Aust. Vet. J.**, v.77, p.465-6, 1999a.
- BOCK, R.E., KINGSTON, T.G., DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v.77, p.461-4, 1999b.
- BOYLAND, I.P., MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J. Delayed hemolytic transfusion reaction caused by anti- Fy^b in a splenectomized patient (letter). **Transfusion**, v.2, p.402, 1982.

- BRADLEY, D.G., MACHUGH, D.E., CUNNINGHAM, P., LOFTUS, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.5131-5, 1996.
- BRADLEY, D.G., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., MACHUGH, D.E. Genetics and domestic cattle origins. **Evol. Anthropol.**, v.6, p.79-86, 1998.
- BRITTEN, R.J., DAVIDSON, E.H. Gene regulation for higher cells – a theory. **Science**, v.165, p.349-57, 1969.
- BROWN, T.A. **Genética: um enfoque molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 336p.
- BROWN, R.T., FEDER, M.E. Reverse transcriptional profiling: non-correspondence of transcript level variation and proximal promoter polymorphism. **BMC Genomics**, v.6, p.110-20, 2005.
- CASTILHO, L., RIOS, M., PELLEGRINO Jr, J., SAAD, S.T.O, COSTA, F.F., REID, M.E. A novel FY allele in brazilians. **Vox Sang.**, v.87, p.190-5, 2004.
- CATTANEO, F., VENESIO, T., MOLATORE, S., RUSSO, A., FIOCCA, R., FRATTINI, M., SCOVASSI, A.I., OTTINI, L., BERTARIO, L., RANZANI, G.N. Functional analysis and case-control study of -160C/A polymorphism in the E cadherin gene promoter: association with cancer risk. **Anticancer Res.**, v.26, p.4627-32, 2006.
- CHAUDHURI, A., POLYAKOVA, J., ZBRZEZNA, V., WILLIAMS, K., GULATI, S., POGO, A.O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the subunit of the Duffy blood group system and the receptor for *Plasmodium vivax* malarial parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.10793-7, 1993.
- CHAUDHURI, A., ZBRZEZNA, V., POLYAKOVA, J., POGO, A.O., HESSELGESSER J., HORUK, R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.7835-8, 1994.

- CHAUDHURI, A., ZBRZEZNA, V., POLYAKOVA, J., POGO, A.O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non erythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Blood**, v.85, p.615-21, 1995.
- CHAUDHURI, A., NIELSEN, S., ELKJAER, M.L., ZBRZEZNA, V., FANG F., POGO A.O. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. **Blood**, v.89, p.701-2, 1997.
- CHEN, G., GHARIB, T.G., HUANG, C.C., TAYLOR, J.M., MISEK, D.E., KARDIA, S.L., GIORDANO, T.J., IANNETONI, M.D., ORRINGER, M.B., HANASHI, S.M., BEER, D.G. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol. Cell. Proteomics**, v.1, p.304-13, 2002.
- CHEONG, H.S., YOON, D.H. KIM, L.H., PARK, B.L., CHOI, Y.H., CHUNG, E.R., CHO, Y.M., PARK, E.W., CHEONG, I.C., OH, S.J., YI, S.G., PARK, T., SHIN, H.D. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits os meat in Korean cattle. **BMC Genet**, v.7, p.35-41, 2006.
- CHITNIS, C.E., CHAUDHURI, A., HORUK, R., POGO, A.O., MILLER, L.H. The domain on the Duffy blood group antigen for binding Plasmodium vivax and P. knowlesi malarial parasites to erythrocytes. **J. Exp. Med.**, v.184, p.1531-6, 1996.
- CHOWN, B., LEWIS, M., KAITA, H. The Duffy blood group system in caucasians: evidence for a new allele. **Am. J. Hum. Genet.**, v.17, p.384-9, 1965.
- CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Agropecuária Brasileira: balanço 2006, perspectivas 2007**. Disponível em <<http://cna.org.br>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

- COLLINS, D.W., JUKES, T.H. Rates of transition and transversion in coding sequence since the human-rodent divergence. **Genomics**, v.20, p.386-96, 1994.
- COOKE, B.M., MOHANDAS, N., COWMAN, A.F., COPPEL, R.L. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Vet. Parasitol.**, v.132, p.273-295, 2005.
- CUNNINGHAM, E.P. Livestock Production in the Mediterranean Area. In **Selected Issues in Livestock Industry Development**. Washington: EDI/World Bank, 1992. p. 1-12.
- CURI, R.A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico Superprecoce**. Botucatu, 2004. 126p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- CURI, R.A., OLIVEIRA, H.N., SILVEIRA, A.C., LOPES, C.R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of the IGF-I and GHR genes on growth and carcass traits in beef cattle. **Anim. Genet.**, v.36, p.58-62, 2005a.
- CURI, R A, OLIVEIRA, H.N., SILVEIRA, A.C., LOPES, C.R. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. **Livest. Prod. Sci.**, v.94, p.159-67, 2005b.
- CURI, R.A., PALMIERI, D.A., SUGISAWA, L., OLIVEIRA, H.N., SILVEIRA, A.C., LOPES, C.R. Growth and carcass traits associated with GH1/Alu I and POU1F1/ Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. **Genet. Mol. Biol.**, v.29, p.56-61, 2006.
- CUTBUSH, M., MOLLISON, P.L., PARKIN, D.M. A new human blood group. **Nature**, v.165, p.188-9, 1950.

- DALGLIESH, R.J. Babesiosis. In: WARREN, S.K. (Ed.) **Immunology and molecular biology of parasites infection**. Oxford: Blakwell, 1993. p.352-83
- DARBONNE, W.C., RICE, G.C., MOHLER, M.A., APPLE, T., HÉBERT, C.A., VALENTE, A.J., BAKER J.B. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1362-9, 1991.
- DEL LAMA, S.N. **Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos**. Ribeirão Preto, 1991. 207p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- DOLAN, S.A., PROCTOR, J.L., ALLING, D.W., OKUBO, Y, WELLEMS, T.E., Glycophorin B as as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.64, p.55-63, 1994.
- DONAHUE, R.P., BIAS, W.B., REWICK, J.K., MCKUSICK, V.A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.61, p.949-55, 1968.
- DUBREMETZ, J.F. Host invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends Microbiol.**, v.6, p.27-30, 1998.
- DURASINGH, M.T., MAIER, A.G., TRIGLIA, T., COWMAN, A.F. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilising sialic acid-dependent and independent pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.4796-4801, 2003.
- ENDLER, G., EXNER, M., MANNHALTER, C., MEIER, S., RUZICKA, K., HANDLER, S., PANZER, S., WAGNER, O., QUEHENBERGER, P. A common C → T polymorphism at nt 46 in the promoter region of coagulation factor XII is associated with decreased factor XII activity, **Thromb. Res.**, v.101, p.225-60, 2001.

- EPSTEIN, H. **The origin of the domestic animals of Africa**. 1v. New York: Africana Publishing Cooperation, 1971. 537p.
- EPSTEIN H., MASON, I.L. Cattle. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p.6- 27.
- EXCOFFIER, L.G. LAVAL, S. SCHNEIDER. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform. Online** v.1, p.47-50, 2005.
- FERRARI, S.L., AHN-LUONG, L., GARNERO, P., HUMPHRIES, S.E., GREENSPAN, S.L. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, p. 255-9, 2003.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FRIES, R., RUVINSKY, A. **The genetics of cattle**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 710p.
- GAFFAR, F.R., FRANSSEN, F.F., DE VRIES, E. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine, and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. **Int. J. Parasitol.**, v.33, p.1595-1603, 2003.
- GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos**. São Paulo, 1995. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

- GE, W., DAVIS, M.E., HINES, H.C., IRVIN, K.M., SIMMEN, R.C. Association of genetic markers with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.1757-62, 2001.
- GILBERGER, T.W., THOMPSON, J.K., TRIGLIA, T., GOOD, R.T., DURASINGH, M.T., COWMAN, A.F. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.14480-6, 2003.
- GIRARD, J.P., BAEKKEVOLD E.S., YAMANAKA, T., HARALDSEN G., BRANDTZAEG, P., AMALRIC, F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. **Am. J. Pathol.**, v.155, p.2043-55, 1999.
- GONÇALVES, P.M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciênc. Rural**, v.30, p.187-94, 2000.
- GRIFFITHS, A.J.F., GELBART, W.M., MILLER, J.H., LEWONTIN, R.C. Regulation of gene transcription In: **Modern Genetic Analysis**. 3 ed., New York: W.H. Freeman and Company, 2000.
- GUIMARÃES, P.E.M., COSTA, M.C.R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotechnolog. Ciênc. Desenvolv.**, n. 26, 2002.
- GYGI, S.P., ROCHON, Y., FRANZA, B.R., AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cel. Biol.**, v.19, p.1720-30, 1999.
- HADLEY, T.J., DAVID, P.H., MCGINNISS, M.H., MILLER, L.H. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. **Science**, v.223, p.597-9, 1984.
- HADLEY, T.J., LU, Z.H., WASNIOWSKA, K., MARTIN, A.W., PEIPER, S.C., HESSELGESSER, J., HORUK, R. Postcapillary venule endothelial cells in

kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. **J. Clin. Invest.**, v.94, p.985-91, 1994.

HADLEY, T.J., PEIPER, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v.89, p. 3077-91, 1997.

HALE, C.S., HERRING, W.O., SHIBUYA, H., LUCY, M.C., LUBAHN D.B., KEISLER D.H., JOHNSON G.S. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. **J. Anim. Sci.**, v.78, p.2099-104, 2000.

HEATON, M.P., GROSSE, W.M., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., CHITKO-MCKOWN, C.G., CUNDIFF, L.V., BRAUN, A., LITTLE, D.P., LAEGREID, W.W. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes. **Mamm. Genome**, v.12, p.32-7, 2001.

HENDERSON, C.R. Use of an average numerator relationship matrix for multiple sires joining. **J. Anim. Sci**, v. 66, p.1614-21, 1988.

HORUK, R., MARTIN, A.W., WANG, Z., SCHWEITZER, L., GERASSIMIDES, A., GUO, H., LU, Z., HESSELGESSER, J., PEREZ, H.D., KIM, J., PARKER, J., HADLEY T.J., PEIPER S.C. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. **J. Immunol.**, v.158, p.2882-90, 1997.

HUDSON, T.J. Wanted regulatory SNPs. **Nat. Genet.**, v.33, p.439-40, 2003.

IKIN, E.W., MOURANT, A.E., PETTENKOFER, H.J., BLUMENTHAL, G. Discovery of the expected hemagglutinin, anti Fy^b. **Nature**, v.168, p.1077, 1951.

IWAMOTO, S., LI, J., OMI, T., IKEMOTO, S., KAJII, E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. **Blood**, v.87, p.378-85, 1996a.

- IWAMOTO, S., LI, J., SUGIMOTO, N., OKUDA, H., KAJII, E. Characterization of the Duffy gene promotor: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.222, p.852-9, 1996b.
- JAHROMI, M.M., MILLWARD, B.A., DEMAINE, A.G. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 Diabetes Mellitus. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.20, p.885-8, 2003.
- KANIA, S.A., ALLRED, D.R., BARBET, A.F. *Babesia bigemina*: host factors affecting the invasion of erythrocytes. **Exp. Parasitol.**, v.80, p.76-84, 1995.
- KIEFFER, N.M., CARTWRIGTH, T.C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. **J. Hered.**, v.59, p.34-6, 1968.
- KIMCHI-SARFATY, C., OH, J.M., KIM, I.W., SAUNA, Z.E., CALCAGNO, A.M., AMBUDKAR, S.V., GOTTESMANT, M.M. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**, v.315, p.525-8, 2007.
- KING, M.C., WILSON, A.C. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. **Science**, v.188, p.107-16, 1975.
- KOCH, W., KASTRATI, A., BOTTIGER, C., MEHILLI, J., VON BECKERATH, N., SCHOMIG A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v.159, p.137–44, 2001.
- KOHN, M.H., FANG, S., WU, C.I. Inference of positive and negative selection on the 5' regulatory regions of Drosophila genes. **Mol Biol Evol**, v.21, p.374-83, 2004.
- LAGZIEL, A., LIPKIN, E., SOLLER, M. Association between SSCP haplotype at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v.142, p.945-51, 1996.

- LAWS, S.M., HONE, E., GANDY, S., MARTINS, R.N. Expanding the association between the *APOE* gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for *APOE* promoter polymorphisms and alterations in *APOE* transcription, **J. Neurochem.**, v.84, p.1215-36, 2003.
- LEE, J.S., FREVERT, C.W., WURFEL, M.M., PEIPER, S.C., WONG, V.A., BALLMAN, K.K., RUZINSKI, J.T., RHIM, J.S., MARTIN, T.R., GOODMAN, R.B. Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. **J. Immunol.**, v.170, p.5244-51, 2003.
- LENTSH, A.B. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? **Faseb J.**, v.16, p.1093-5, 2002.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-8, 2001.
- LOBO, C.A. *Babesia divergens* and *Plasmodium falciparum* use common receptors, glycoporphins A and B to invade the human red blood cell. **Infect. Immun.**, v.73, p.649-51, 2005.
- LOFTUS, R.T., MACHUGH, D.E., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M., CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.2757-61, 1994.
- LUCY, M.C., JOHNSON, G.S., SHIBUYA, H., BOYD C.K., HERRING W.O. Polymorphic (GT)_n microsatellite in the bovine somatotropin receptor gene promoter. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.2209-10, 1998.
- LUM, L.S., DOVC, P., MEDRANO, J.F. Polymorphisms of bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1389-97, 1997.

- LUO, H., CHAUDHURI, A., JOHNSON, K.R., NEOTE, K., ZBRZEZNA, V., HE, Y. POGO, A.O. Cloning, characterization, and mapping of a murine promiscuous chemokine receptor gene: homolog of the human Duffy gene. **Genome Res.**, v.7, p.932-41, 1997.
- MACHUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v.146, p.1071-86, 1997.
- MAIER A.G., DURAISINGH, M.T., REEDER, J.C., PATEL, S.S., KAZURA, J.W., ZIMMERMAN, P.A., COWMAN, A.F. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. **Nat. Med.**, v.9, p.87-92, 2003.
- MANWELL, C., BAKER, C.M.A. Chemical classification of cattle two phylogenetic tree and specific status of zebu. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.**, v.11, p.151-62, 1980.
- MARTELINE, M.A. **Identificação e seqüenciamento do gene Duffy em *Bos indicus***. Botucatu, 2003. 47p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- MASON, S.J., MILLER, L.H., SHIROISHI, T., DVORAK, J.A., MCGINNISS, M.H. The Duffy blood group determinants: their role in the susceptibility of human and animal erythrocytes to *Plasmodium knowlesi* malaria. **Br. J. Haematol.**, v.36, p.327- 35, 1977.
- MATHEW, S., CHAUDHURI, A., MURTY, V.V., POGO, A.O. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (Fy) at 1q22-23 by fluorescence in situ hybridization. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.67, p.68, 1994.
- McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M., KRIER, J.P. (Eds). **Babesiosis**, New York: Academic Press, 1981. p.1-24.

- MEADOW, R.H. Animal domestication in the Middle East: a view from the Eastern : a revised view from the eastern margin . In: Possehl, G.L. (Ed). **Harappan Civilization**. 2 ed. New Delhi: Oxford and IBH, 1993, p.295-320.
- MEIRELLES, F.V., ROSA, A.J.M., LOBO, R.B., GARCIA, J.M., SMITH, L.C., DUARTE, F.A.M. Is the American zebu really *Bos indicus*? **Genet. Mol. Biol.**, v.22, p. 543-46, 1999.
- MENARD, R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. **Cell. Microbiol.**, v.3, p.63-73, 2001.
- MICHON, P., STEVENS, J.R., KANEKO, O., ADAMS, J.H. Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. **Mol. Biol. Evol.**, v.19, p.1128-42, 2002.
- MIGNONE, F., GISSI, C., LIUNI, S., PESOLE, G. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biol.**, v.3, p.1-10, 2002.
- MILLER, L.H., MASON, S.J., DVORAK, J.A, McGINNISS, M.H., ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinant. **Science**, v.189, p.561-3, 1975.
- MILLER, L.H., HAYNES, J.D., McCAULIFFE, I.M. SHIROISHI, T., DUROCHER, J.R., McGINNISS, M.H. Evidence for difference in erythrocyte surface receptors for malarial parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. **J. Exp. Med.**, v.146, p.277-81, 1976.
- MIRETTI, M.M. **Variabilidade genética no locus BoLA-DRB3.2 de bovinos nativos e exóticos**. Ribeirão Preto, 1998. 98p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MITCHISON, N.A. Polymorphism in regulatory gene sequences. **Genome Biol.**, v.2, p.1-6, 2000.

- MONTENEGRO, J. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, p.327-36, 1992.
- MOORE, B.B., ARENBERG, D.A., STOY, K. MORGAN, T., ADDISON, C.L., MORRIS, S.B., GLASS, M., WILKE, C., XUE, Y.Y., SITTING, S., KUNKEL, S.L., BURDICK, M.D., STRIETER, R.M. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. **Am. J. Pathol.**, v.154, p.1503-12, 1999.
- MORENO, M.U., JOSE, G.S., ORBE, J., PARAMO, J.A., BELOQUI, O., DIEZ, J., ZALBA, G. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22^{phox} gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension, **FEBS Lett.**, v.542, p.27-31, 2003.
- MURPHY, M.T. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.593-633, 1994.
- NEOTE, K., MAK, J.Y., KOLAKOWSKI, L.F., SCHALL, T.J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v.84, p.44-52, 1994.
- NISHIOKA, Y., SAGAE, S., NISHIKAWA, A., ISHIOKA, S., KUDO, R. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. **Cancer Lett.**, v.200, p.49-55, 2003.
- OLSON, M.L., SMYTHE, J.S., HANSSON, C., POOLE, J., MALLINSON, G., JONES, J., AVENT, N.D., DANIELS, G. The Fy^x phenotype is associated with a missense mutation in the Fy^b allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. **Br. J. Haematol.**, v.103, p.1184-91, 1998.
- PAIVA-NETO. Estudo da incidência e localização de carrapato (*Boophilus microplus*) em bovinos nelore, holandês e curraleiro no Distrito Federal. **Circular técnica Embrapa**, v.34, p.10-35, 2004.

- PARASOL, N., REID, M., RIOS, M., CASTILHO, L., HARARI, I., KOSOWER, N.S. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. **Blood**, v.92, p.2237-43, 1998.
- PAYNE, W.J.A. Domestication: a forward step in civilization. In HICKMAN, C.G. (Ed.). **Cattle Genetic Resources**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.51-72.
- PEIPER, S.C., WANG, Z.X., NEOTE, K., MARTIN, A.W., SHOWELL, H.J., CONKLYN, M.J., OGBORNE, K., HADLEY, T.J., LU Z.H., HESSELGESSER, J. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **J. Exp. Med.**, v.181, p.1311-17, 1995.
- PETSKO, G.A., RINGE, D. **Protein Structure and Function**. London: New Science Press, 2004. p.195.
- PICOULT-NEWBERG, L., IDEKER, T.E., POHL, M.G., TAYLOR, S.L., DONALDSON, M.A., NICKERSON, D.A., BOYCE-JACINTO, M. Mining SNPs from EST databases. **Genome Res.**, v.9, p.167-74, 1999.
- PITARQUE, M., VON RICHTER, O., OKE, B., BERKCAN, H., OSCARSON, M., INGELMAN-SUNDBERG M. Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the CYP2A6 gene: impairment of its promoter activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.284, p.455-60, 2001.
- PRESTRIDGE, D.S. Computer software for eukaryotic promoter analysis. **Methods Mol. Biol.**, v.130, p.265-95, 2000.
- PUGH, B.F., TJIAN, R. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. **Genes Dev.**, v.5, p.1935-45, 1991.
- RAYNER, J.C., VARGAS-SERRATO, E., HUBER, C.S., GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax*

reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. **J. Exp. Med.**, v.194, p.1571-81, 2001.

REED, C.A. The beginnings of the animal domestication. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p.1-6.

RISTIC, M., LEVY, M.G. A new era of research toward solution of bovine babesiosis. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. (Eds.) **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p.509-49.

RODRIGUES, C.V., GUIMARÃES, S.E.F., NETO, E.D., PINHEIRO, L.E.L. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the bovine growth hormone gene. **Anim. Genet.**, v.29, p.65-6, 1998.

ROTHSCHILD, M.F., SOLLER M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v.8, p.13-18, 1997.

ROWNTREE, R., HARRIS, A. DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the CFTR gene alter transcription factor binding. **Hum. Genet.**, v.111, p.66-74, 2002.

ROZEN, S., SKALETSKY, H.J. Primer3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. , 1998.

SANGER. R., RACE, R.R., JACK, J. The Duffy blood group of New York Negroes: the phenotype Fy(a-b-). **Br. J. Haematol.**, v.1, p.370-4, 1955.

SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 774p.

SANTOS, R. **Nelore: a vitória brasileira**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1995. 392p.

- SANTOS, I.K.F.M. **Polimorfismo do sistema imunológico e sua aplicação no melhoramento animal para resistência a doenças infecciosas e parasitárias**. In: REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.41-60
- SCHWERIN, M., BROCKMANN, G., VANSELOW, J., SEYFERT, H.M. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement- An overview. **Anim. Res. Dev.**, v.42, p.14-26, 1995.
- SHEN, H., SCHUSTER, R., STRINGER, K.F., WALTZ, S.E., LENTSCH, A.B. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. **Faseb J.**, v.20, p.59-64, 2006.
- SIBLEY, K., ROLLINSON, S., ALLAN, J.M., SMITH, A.G., LAW, G.R., RODDAM, P.L., SKIBOLA, C.F., SMITH, M.T., MORGAN, G.J. Functional FAZ promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. **Cancer Res.**, v.63, p.4327-30, 2003.
- SIM, B.K., CHITNIS, C.E., WASNIOKA, K., HADLEY, T.J., MILLER, L.H. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Science**, v.264, p.1941-4, 1994.
- STAMATOYANNOPOULOS, J.A. The genomics of gene expression. **Genomics**, v.84, p.449-57, 2004.
- STANFORD, J. L., STEPHENSON, R. A., COYLE, L. M., CERHAN, J., CORREA, R., ELEY, J. W., GILLILAND, F., HANKEY, B., KOLONEL, L. N., KOSARY, C., ROSS, R., SEVERSON, R., WEST, D. Prostate Cancer Trends 1973–1995 SEER Program, National Cancer Institute Bethesda, MD. NIH Pub. No. 99–4543, 1999.

- SZYMANOWSKA, M., MALEWSKI, T., ZWIERZCHOWSKI, L. Transcription factor binding to variable nucleotide sequences in 5'-flanking regions of bovine casein genes. **Int. Dairy J.**, v.14, p.103-15, 2004.
- TAYLOR, D.W., EVANS, C.B., ALEY, S.B., BARTA, J.R., DANFORTH, H.D. Identification of an apically located antigen that is conserved in sporozoan parasites. **J. Protozool.**, v.37, p.540-5, 1990.
- THOMPSON, M.W., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F. **THOMPSON & THOMPSON: Genetics in Medicine.** 5 ed. Pensilvania: Philadelphia, 1991. 500p.
- TOURNAMILLE, C., COLIN, Y., CARTRON, J.P., LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat. Genet.**, v.10, p.224-8, 1995.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., WASNIOOWSKA, K., GANE, P., LISOWSKA, B., CARTRON, J.P., COLIN, Y., LE VAN LIM, C. Structure-function analyses of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites. **Br. J. Haematol.**, v.122, p.1014-1023, 2003.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., BAUDAT, C., RIOTTOT, M.M., LONGACRE, S., CARTRON, J.P., LE VAN LIM, C, COLIN, Y. Fine mapping of the Duffy antigen binding site for *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.144, p. 100-3, 2005.
- UTECH, K.B.W., WHARTON, R.H., KEER, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v.29, p.885-895, 1978.
- VESCIO, L.A., FARINA, D., ROGIDO, M. Hemolytic disease of the newborn caused by anti-Fy^b (letter). **Transfusion**, v.27, p.366, 1987.

- VIGNAL, A., MILAN, D., SAN CRISTOBAL, M., EGGEN, A. A review on SNP and others types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.**, v.34, p. 275-305, 2002.
- VILLARES, J.B. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Bol. Ind. Anim.**, v.4, p.60-86, 1941.
- WASNIOWSKA, K., CZERWINSKI, M, JACHYMEK, W., LISOWSKA, E. Expression and binding properties of a soluble chimeric protein containing the N-terminal domain of the Duffy antigen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.273, p.705-711, 2000.
- WITTKOPP, P.J., HAERUM, B.K., CLARK, A.G. Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. **Nature**, v.430, p.85-8, 2004.
- WU, Y.R., FENG, I.H., LYU, R.K., CHANG, K.H., LIN, Y.Y., CHAN, H., HU, F.J., LEE-CHEN, G.J., CHEN, C.M. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with the risk of Parkinson's disease. **Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.**, in press, 2006.
- YANG, Z., SUGAWARA, M., PONATH, P.D., WESSENDORF, L., BANERJI, J., LI, Y., STROMINGER, J.L. Interferon γ response region in the promoter of the human DPA gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.9226-30, 1990.
- YAZDANBAKHSH, K., RIOS, M., STORRY, J.R., KOSOWER, N.S., PARASOL, N., CHAUDHURI, A. REID., M. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, v.40, p.310-20, 2000.
- YOKOYAMA, N., OKAMURA, M., IGARASHI, I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. **Vet. Parasitol.**, v.138, p.22-32, 2006.

- ZADWORNÝ, D., KUNHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theor. Appl. Genetic**, v.80, p.631-634, 1990.
- ZIMMERMAN, P.A., WOOLEY, I., MASINDE, G.L., MILLER, S.M., McNAMARA, D.T., HAZLETT, F., MGONE, C.S., ALPERS, M.P., GENTON, B., BOATIN, B.A., KAZURA, J.W. Emergence of FY*A null in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.96, p.13973-7, 1999.
- ZINTL, A., WESTBROOK, C., MULCAHY, G., SKERRETT, H.E., GRAY, J.S. Invasion, and short and long-term survival of *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa) cultures in non-bovine sera and erythrocytes. **Parasitology**, v.124, p.583-8, 2002a.
- ZINTL, A., WESTBROOK, C., SKERRETT, H.E., GRAY, J.S., MULCAHY, G. Chymotrypsin and neuraminidase treatment inhibits host cell invasion by *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa). **Parasitology**, v.125, p.45-50, 2002b.
- ZWART, D., BROCKLESBY, D.W. Babesiosis: non specific resistance immunological factors and pathogenesis. **Adv. Parasitol.**, v.17, p.49-112, 1979.