

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**SNPs E MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO RACIAL E DE
RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES EM BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO PÉ-DURO**

Thais Miranda Silva Freitas
Orientadora: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA
2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Thais Miranda Silva Freitas

Título do trabalho: SNPs E MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO RACIAL E DE RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ-
DURO

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Thais Miranda Silva Freitas
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 05 / 06 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

THAIS MIRANDA SILVA FREITAS

**SNPs E MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO RACIAL E DE
RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES EM BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO PÉ-DURO**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutora
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos
(SaTS)

Linha de Pesquisa:

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle
das doenças infecciosas dos animais

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Adriana Santana do Carmo - EVZ/UFG

Pesq. Dr^a. Maria Ivete de Moura - PUC Goiás

GOIÂNIA

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Freitas, Thais Miranda Silva
SNPs E MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO RACIAL E DE
RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES EM BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO PÉ-DURO [manuscrito] / Thais Miranda Silva Freitas. -
2018.

xvii, 102 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co
orientadora Dra. Adrina Santana do Carmo; co-orientador Dr. Maria
Ivete de Moura.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. gene BoLA. 2. marcadores moleculares. 3. raça local brasileira. I.
Fioravanti, Maria Clorinda Soares, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO 263 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE POS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Thais Miranda Silva Freitas**. As
4 **14h00min** do dia 05/12/2018 reuniu-se no miniauditório do CERCOMP da Universidade Federal de
5 Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada
6 para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-
7 Graduando (a) **Thais Miranda Silva Freitas**, intitulada "SNPs e microssatélites na
8 caracterização racial e de resistência a enfermidades em bovinos da raça curraleiro pé-duro",
9 apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, junto à Área de
10 Concentração: Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos desta Universidade. O
11 Presidente da Comissão Julgadora **Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti**, iniciando os
12 trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Thais Miranda Silva Freitas** para exposição em
13 **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem
14 sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo
15 máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores
16 Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em
17 sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou**
18 **Reprovado (a):**

19 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Aprovada

20 Prof. Dr. Vincenzo Landi

Aprovada

21 Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Aprovada

22 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

Aprovada

23 Prof. Dr. Kareem Rady Badr

Aprovada

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Thais Miranda**
25 **Silva Freitas**, Habilitado [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a)) pelo(s)
26 motivo(s) abaixo exposto(s):

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39

40

41

42

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti**, lavrei a presente
46 ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

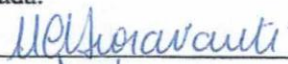
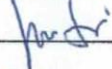
47 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

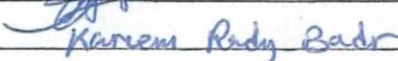
48 Prof. Dr. Vincenzo Landi

49 Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

50 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

51 Prof. Dr. Kareem Rady Badr



Ao meu esposo, Erick Xavier de Alencar,
à minha família e amigos
e aos animais,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A quem faz tudo possível, quem abre as portas e caminhos, quem dá forças na fraqueza e ânimo na aflição, obrigada Deus! Obrigada à Santíssima Trindade e Nossa Senhora por me darem alento.

À minha família, direta e indireta, que observou minha ausência em muitos momentos mas sempre me prestou apoio e confiança. À minha afilhada e família por me darem forças e me acolherem.

Aos meus amigos, que me ajudaram a entender que o tempo e a distância não importam para os sentimentos verdadeiros.

À minha orientadora, que com paciência me ofereceu uma oportunidade única, me orientou nos trabalhos acadêmicos e nas dificuldades da vida, que se tornou não só uma professora, mas uma amiga.

Agradeço às minhas co-orientadoras e aos professores que tiveram paciência em me ensinar, direcionar e aconselhar. Agradeço também a todos os estudantes que me apoiaram, que trabalharam junto em vários projetos, alunos de pós-graduação e de iniciação científica, compondo a “equipe Clorinda”. Agradeço especialmente a Juliana Moraes Dias, Joyce Rodrigues Lobo, Ana Carolina Ferreira Veríssimo, Veridiane da Rosa Gomes, Luanna Kim Pires Guimarães com quem compartilhei vários momentos de alegria e de tristeza, no laboratório ou fora dele.

À Universidade Federal de Goiás, por meio dos funcionários, técnico-administrativos, colaboradores, alunos e professores da Escola de Veterinária e Zootecnia, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que não só me proporcionaram a obtenção deste título mas também fizeram parte do meu crescimento pessoal.

Aos professores Dra. Adriana Santana do Carmo, Dra. Thannya Nascimento Soares e Dr Emmanuel Arnhold que me auxiliaram na compreensão das análises e elaboração da tese. Às professoras responsáveis e aos estudantes do Laboratório de Genética e Biodiversidade do Instituto de Ciências Biológicas por permitirem o uso do laboratório e pelos ensinamentos.

Aos professores, pesquisadores e estudantes da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, que acolheram a mim e à equipe em um momento de dificuldade e nos fizeram sentir em casa. O acolhimento do Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto), Emília Oliveira Alves Costa, Marc Gigonzac, Irene Plaza, Damiana Mírian da Cruz, Eduardo Rocha Pedrosa e todos da equipe foi excepcional.

Ao professor Laerte Guimarães Ferreira, à Janete Rêgo Silva e à Wanessa Campos, pesquisadores do Lapig-UFG, que nos ensinaram com toda disponibilidade a entender e processar os dados geográficos, permitindo as pesquisas epidemiológicas que desenvolvemos nestes últimos anos serem compreendidas a partir da perspectiva geoespacial, enfatizando a compreensão da tríade patógeno-hospedeiro-ambiente.

Ao Dr. Vincenzo Landi, que me possibilitou a realização de um sonho e à Animal Breeding Consulting, nas pessoas de Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Mayra Gómez Carpio, Sergio Nogales Baena e demais pesquisadores e estudantes de vários países que me acolheram e auxiliaram. Aos amigos que fiz durante minha estadia em Córdoba: Gabriela Pizzaro, Amado Canales Vergara, Miguel, Ander Arando Arbulu, Irene Lozano Alfonso, Francisco Javier Navas González, Juan Carlos Silva, Juan Fernando Muñoz Santofimio, Hector Villareal e Sebastian Capello.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEG pelo apoio financeiro destinado à bolsa de pesquisa e aos recursos para o desenvolvimento do projeto.

Aos Kalungas, que deram o apoio na realização de outro projeto, nos recebendo em suas casas com muita simpatia.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização do Doutorado.

“O segredo do sucesso na vida é estar pronto para a oportunidade quando ela surgir”

Robert Hasse

“Um homem nunca sabe aquilo de que é capaz até que o tenta fazer”

Charles Dickens

"Sonhos são gratuitos. Transformá-los em realidade tem um preço."

E. J. Gibbs

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Curraleiro Pé-Duro	4
2.2. Marcadores moleculares	5
2.3. Diversidade genética em espécies animais	7
2.4. Resistência genética a enfermidades	9
2.5. Estudo do ambiente na conservação e biodiversidade.....	12
2.6. Justificativa.....	13
2.7. Objetivos.....	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2 – ESTRUTURA GENÉTICA DE BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO E SUA RELAÇÃO COM PERFIL SOROLÓGICO FRENTE A PATÓGENOS DE INTERESSE ECONÔMICO E ZOONÓTICO	20
1. Introdução.....	21
2. Material e métodos	23
2.1 Amostragem e sorologia.....	23
2.2. Análise genética.....	25
2.3 Análise estatística	29
2.4. Associação entre marcadores moleculares raciais e doenças	30
3. Resultados.....	30
4. Discussão.....	40
5. Conclusão	42
Referências	42
CAPÍTULO 3 - MICROSATELLITES POLYMORPHISM OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX AND SEROLOGICAL PROFILE IN LOCAL BRAZILIAN CATTLE CURRALEIRO PÉ-DURO	46
1. Introduction	47
2. Material and methods	49
2.1. Sampling.....	49
2.2. Diseases diagnosis and epidemiological data.....	51
2.3. Environmental data.....	51
2.4. Selection of the microsatellites panel, PCR amplification and genotyping	51
2.5. Statistical analysis	53

3. Results	54
4. Discussion	61
5. Conclusion.....	63
References	63
CAPÍTULO 4 - ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA ENTRE MARCADORES SNPs E ENFERMIDADES EM BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO	68
1. Introdução.....	69
2. Material e métodos	72
3. Resultados.....	75
4. Discussão.....	81
5. Conclusão	84
Referências	84
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
SUPPLEMENTARY MATERIAL	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 Geolocalização das propriedades de bovinos Curraleiro Pé-Duro amostradas em 2011, no âmbito das atividades da Rede Curraleiro e Pantaneiro.....23
- FIGURA 2 Esquematização dos eletroferogramas I e II obtidos por eletroforese capilar com os marcadores, posições e fluorocromos FAM (azul), NED (amarelo), PET (vermelho) e VIC (verde).....27
- FIGURA 3 Populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro detectadas pelo método de determinação de *clusters* de similaridade genética utilizando marcadores de caracterização racial.....31
- FIGURA 4 Valores de Delta K de Evanno que indica agrupamento de populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro em três grupos ($K = 3$).....31
- FIGURA 5 Árvore filogenética das distâncias Da de Nei construída pelo método Neighbor Joining para as propriedades de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....33
- FIGURA 6 Representação gráfica da análise fatorial de correspondência de bovinos Curraleiro Pé-Duro. A. Representação por *clusters* de similaridade genética (em amarelo *cluster* 1, em azul *cluster* 2 e em branco *cluster* 3). B. Representação por estado (em amarelo Goiás, em azul Piauí e em branco Tocantins).....37

CAPÍTULO 3

- FIGURE 1 A. Curaleiro Pé-Duro specimen showing phenotypic traits of the breed; B. Map of sampling sites for Curraleiro Pé-Duro breed herds in Brazil28. Yellow: farms in Piauí; green: farms in Tocantins; red: farms in Goiás.....50
- FIGURE 2 Bayesian clustering assignment of Curraleiro Pé-Duro breed representing the clusters according the genome proportion of alleles on markers linked to BoLA gene, and the better $k=2$ 55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Estado de colheita, propriedades amostradas, cidade, número de amostras de DNA processadas e número final de amostras analisadas após a filtragem dos dados genotípicos.....	28
TABELA 2	Localidade dos bovinos assignados aos <i>clusters</i> 1, 2 e 3 de similaridade genética racial para a raça Curraleiro Pé-Duro.....	32
TABELA 3	Índices de diversidade genética entre os <i>clusters</i> de caracterização racial de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	33
TABELA 4	Heterozigosidades dos loci microssatélites para caracterização racial de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	34
TABELA 5	Resultados de análises estatísticas F por <i>clusters</i> filogenéticos e por loci nas populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	35
TABELA 6	Distribuição de frequências de soropositivos contra infecções segundo a classificação por <i>clusters</i> genéticos e ambientais.....	38
TABELA 7	Prevalência de anticorpos contra micro-organismos causadores de brucelose, leptospirose, neosporose, leucose, rinotraqueite e diarreia viral em bovinos Curraleiro Pé-Duro por clusters genéticos.....	38
TABELA 8	Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de Curraleiro Pé-Duro de três estados brasileiros baseado em dados de microssatélites.....	39
TABELA 9	Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de Curraleiro Pé-Duro de dezenove rebanhos baseado em dados de microssatélites.....	39

CAPÍTULO 3

TABLE 1	Genotyping of Curraleiro Pé-Duro breed samples with microsatellite markers for BoLA gene, distributed by farm code, location and samples number analyzed.....	50
TABLE 2	Microsatellites for BoLa genes investigated in Curraleiro Pé-Duro breed for infectious diseases association.....	52
TABLE 3	Antibody frequencies against infectious diseases in Curraleiro Pé-Duro (CPD) breed from Brazil.....	54
TABLE 4	Prevalence of infections in Curraleiro Pé-Duro breed clustered by microsatellites of immune response.....	55

TABLE 5	Hardy-Weinberg test for microsatellite loci in the Curraleiro Pé-Duro populations.....	56
TABLE 6	Analysis of heterozygosity and allele number of microsatellite for BoLA and SLC11A1 gene by herd of Curraleiro Pé-Duro breed.....	57
TABLE 7	Microsatellites and endogamic coefficients of Curraleiro Pé-Duro breed.....	57
TABLE 8	Results of univariate analysis for association of diseases and microsatellite alleles on BoLA gene in Curraleiro Pé-Duro breed.....	59
TABLE 9	Multivariate analysis of the individual animal odds of sorology for infections and alleles among brazilian Curraleiro Pé-Duro breed.....	60
CAPÍTULO 4		
TABELA 1	Frequência das infecções nas amostras avaliadas por marcadores SNPs dos rebanhos de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	76
TABELA 2	Resultados da análise univariada de Fisher para SNPs associados a infecções em bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	78
TABELA 3	Resultados significativos ao teste de qui-quadrado para haplótipos SNPs e infecções em Curraleiro Pé-Duro.....	79
TABELA 4	Modelo final da regressão logística de haplótipos SNPs e enfermidades infecciosas em bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	80

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 2**

QUADRO 1	Técnicas de diagnóstico sorológico para identificação de bovinos Curraleiro Pé-Duro suscetíveis ou resistentes às infecções bacterianas, virais e parasitária.....	24
QUADRO 2	Microssatélites utilizados na caracterização racial de Curraleiros Pé-Duro.....	26

CAPÍTULO 4

QUADRO 1	Relação dos marcadores SNPs testados em amostras de Curraleiro Pé-Duro.....	73
QUADRO 2	Haplótipos e SNPs relacionados à resposta imune em bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
CPD	Curraleiro Pé-Duro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EVZ	Escola de Veterinária e Zootecnia
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
Fis	Coeficiente de endogamia
Fit	Índice de fixação global
Fst	Índice de fixação entre subpopulação
GO	Goiás
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
HW	Hardy-Weinberg
ISAG	<i>International Society for Animal Genetics</i>
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Piauí
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
SNP	Polimorfismos de base única (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
STR	Sequências curtas repetidas em série (<i>short tandem repeat</i>)
TO	Tocantins
UFG	Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A raça bovina local brasileira Curraleiro Pé-Duro é patrimônio genético que tem como características rusticidade, adaptabilidade às condições ambientais e resistência a doenças e intoxicações. Objetivou-se com este estudo observar a variabilidade genética em populações da raça, verificando a ocorrência de marcadores SNP e microssatélites para caracterização racial e resistência a infecções por *Brucella abortus*, *Leptospira* spp, *Neospora caninum*, e pelos vírus da leucose, rinotraqueite infecciosa e diarreia viral bovina. Foram usadas 1.182 amostras de bovinos pertencentes ao banco de dados da Rede Pró-Centro-Oeste. Foi realizada amplificação e genotipagem de 28 marcadores microssatélites de caracterização racial e 13 relacionados aos genes do complexo antígeno leucocitário bovino (BoLA). Foram investigados 24 polimorfismos de base única (SNP) em genes relacionados à expressão de citocinas por meio da técnica *Kompetitive Allele-Specific PCR*. Os genótipos foram associados aos fenótipos por análise univariada, seguida de regressão logística, considerando nível de significância de 5%. A análise Bayesiana agrupou os animais em três *clusters* raciais, indicando a presença de subpopulação, com similar prevalência das infecções. As heterozigosidades e os valores de FST, FIT e FIS indicaram pouca diferenciação entre os *clusters* e homozigosidade aumentada. Foram identificados 42 alelos no gene BoLA associados às infecções. Os haplótipos SNPs no BTA6 e BTA15 foram mais frequentes em animais soronegativos enquanto o haplótipo 2 do BTA17 esteve presente em 70% dos animais positivos contra *Neospora caninum*. A raça Curraleiro Pé-Duro possui alelos de resistência a infecções que podem se perder devido à perda da diversidade genética da raça.

Palavras-chave: gene BoLA, marcadores moleculares, raça local brasileira

ABSTRACT

SNPs and microsatellites in the genetic characterization and diseases resistance of Curraleiro Pé-Duro bovine breed

The Brazilian cattle breed Curraleiro Pé-Duro is an important genetic resource that has as characteristics of rusticity, adaptability to environmental conditions, and resistance to diseases and intoxications. This study aims to analyze the genetic diversity of Curraleiro Pé-Duro populations and verify the presence of SNPs and microsatellite polymorphisms for breed characterization and disease resistance to *Brucella abortus*, *Leptospira* spp, *Neospora caninum*, leukosis virus, Infectious Bovine Rhinotracheitis, and Bovine Viral Diarrhea. A total of 1.182 serum and blood samples of Curraleiro Pé-Duro breed belonging to the Pro-Centro-Oeste Network database were used. Amplification and genotyping of 28 microsatellite markers of breed characterization and 13 markers related to the bovine leukocyte antigen (BoLA) and SLC11A genes were used. Twenty-four single-base polymorphisms (SNPs), detected by Kompetitive Allele-Specific PCR, were investigated in genes related to cytokines expression. Univariate analysis was performed for the association of genotypes with phenotypes, followed by logistic regression considering a significance level of 5%. Bayesian analysis grouped the animals into three breed clusters, indicating the presence of subpopulation, with similar prevalence for infections. Heterozygosity and Fst values indicated little differentiation between clusters and increased homozygosity. On BoLA gene, 42 alleles associated to infections were identified. SNP haplotypes in BTA6 and BTA15 were significant in seronegative animals while BTA17 haplotype 2 was presented in 70% of *Neospora caninum* positive animals. The results showed that Curraleiro Pé-Duro cattle breed has alleles of resistance to infections that can be lost due to loss of genetic diversity.

Key-words: BoLA gene, Brazilian cattle breed, molecular markers

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As raças bovinas locais foram a base da pecuária brasileira durante vários séculos. Porém, pela introdução de raças exóticas, se encontram em risco de serem absorvidas. As raças comerciais foram introduzidas no país para aumentar a produtividade dos rebanhos, o que resultou nos cruzamentos sem planejamento adequado e diminuição da diversidade genética. Das cinco raças brasileiras localmente adaptadas, a saber: Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro, Crioulo Lageano e Mocho Nacional, apenas a raça Caracu foi fomentada e as demais encontram-se em risco de extinção¹.

A introdução de raças exóticas e os cruzamentos absorventes ocasionaram a diminuição da diversidade genética dentro das populações de raças locais, colocando a adaptação ao meio ambiente em risco, podendo levar ao desaparecimento de raças locais². Outros fatores que podem diminuir a diversidade genética de uma raça são o desaparecimento de ecossistemas (em casos de guerras, desastres naturais e surtos de doenças, por exemplo) e mudanças de mercado que exigem raças especializadas em algum segmento^{2, 3}.

Devido à importância dos recursos genéticos locais, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) desenvolveu a estratégia global para manejo de recursos genéticos de animais de produção. A estratégia motiva os países membros a lutarem contra a erosão dos recursos genéticos animais e aumenta a demanda por produtos de origem animal, principalmente, nos países em desenvolvimento, que dependem dos rebanhos locais para a segurança alimentar e meios de subsistência sustentáveis. As raças locais possuem adaptabilidade e capacidade de produção e reprodução em ambientes com condições adversas, que contrasta com os sistemas de produção intensivos, que demandam altos custos e recursos (como água e alimentos). Portanto, para reduzir a erosão genética, devido ao uso crescente de um número limitado de raças de alta produção para promover a sustentabilidade da agricultura e o desenvolvimento rural, existe um esforço internacional conjunto para mobilizar recursos humanos e financeiros, bem como para implementar estratégias de conservação de rebanhos em países em desenvolvimento³.

Segundo definições estabelecidas pela FAO, as raças dos animais domésticos são classificadas como transfronteiriças quando as populações que ocorrem em mais de um país podem pertencer a um *pool* genético comum e, portanto, ser consideradas uma mesma raça. As

raças transfronteiriças podem ser nacionais (que ocorrem em vários países de uma mesma região) ou internacionais (que ocorrem em mais de uma região). A classificação de raças locais designa raças que só ocorrem em um país⁴.

Considerando os rebanhos bovinos de raças locais brasileiras, a diversidade genética é baixa em decorrência do excesso de indivíduos homozigotos, característica de populações pequenas, ou seja, com poucos machos e fêmeas em fase reprodutiva. Os programas de conservação das raças devem objetivar o aumento populacional, evitar cruzamentos parentais e demonstrar para o mercado que conservar e melhorar os recursos genéticos locais pode ser mais vantajoso que introduzir raças exóticas não adaptadas às condições locais, como as altas temperaturas^{2, 5}.

A raça local brasileira Curraleiro Pé-Duro (CPD) é um importante recurso genético, que conta com número limitado de indivíduos, mantidos principalmente em regime de criação extensiva, sendo negligenciados os cuidados sanitários e de alimentação, o que beneficiou a permanência de exemplares mais rústicos e resistentes⁶. Embora a raça CPD não tenha sido selecionada e apresente produtividade abaixo de outras raças comerciais, a sua prolificidade e adaptabilidade adequam-se às regiões com pastagens naturais de baixa qualidade, como as da região da Caatinga no Nordeste e do Cerrado no Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil^{1, 7}.

Com a necessidade de conservar as raças bovinas locais brasileiras em face do risco de extinção, pesquisadores caracterizaram geneticamente o Curraleiro Pé-Duro e observaram uma grande diversidade genética nas populações, que pode ser usada em programas de conservação e melhoramento⁸⁻¹⁰. Uma vez identificados os genes relacionadas à adaptação ao ambiente e resistência às doenças e intoxicações, o próximo passo será o seu uso em programas de melhoramento de outras raças, com a introgressão desses genes.

Para o uso de genes que promovam a melhoria de determinada característica, faz-se a seleção genética pelo controle de acasalamentos e pela escolha de reprodutores com perfil para o melhoramento das características pesquisadas^{11, 12}. Algumas características não podem ser diretamente mensuradas, a exemplo da resistência a doenças, que ou possui baixa herdabilidade ou apresenta expressão tardia. Para contornar estas limitações, é possível somar à seleção genética de características quantitativas com base em fenótipos, as análises genéticas por meio de marcadores moleculares, buscando diminuir o intervalo entre as gerações para a melhora em uma ou mais características¹¹.

As doenças infecciosas impactam em todos os sistemas de produção animal por aumentarem os custos resultantes do tratamento das infecções individuais, do uso de produtos químicos e antibióticos, além de serem prejudiciais à indústria, saúde pública e bem-estar

animal. Os mecanismos da tolerância às infecções envolve mecanismos moleculares usados para eliminar os patógenos e prevenir a infecção¹³.

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é um complexo de moléculas altamente polimórficas em animais domésticos e silvestres, essenciais para a defesa do organismo às infecções. A frequência dos alelos em genes presentes na região de classe II do antígeno leucocitário bovino (BoLA), que corresponde ao MHC na espécie bovina, é variável entre raças e por isso vários estudos buscam conhecer em cada raça quais são os alelos mais comuns e a que estão relacionados. A pesquisa de marcadores genéticos em bovinos busca conhecer e manter variabilidade de alelos na região do gene BoLa visto que a presença de indivíduos heterozigotos em loci deste gene indica que o indivíduo é capaz de reconhecer vários antígenos, aumentando sua capacidade de resistência contra doenças infecciosas¹³.

Esta pesquisa está vinculada à Rede Pró-Centro-Oeste “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”, que tem como objetivo consolidar uma rede inter-regional e interdisciplinar de pesquisa e transferência de conhecimento com a finalidade de caracterizar duas raças bovinas brasileiras locais em risco de extinção, o Curraleiro Pé-Duro e o Pantaneiro.

A Rede também se propõe a integrar diferentes linhas de pesquisa em um contexto multidisciplinar para gerar dados que subsidiam o desenvolvimento de um modelo de exploração pecuária para o Cerrado e o Pantanal, utilizando as raças locais. São priorizadas a conservação dos ecossistemas, a sustentabilidade e a diversidade genética. Dessa forma, a Rede garante o desenvolvimento de pesquisas para atender às demandas de produção de alimento de forma sustentável, frente às mudanças ambientais.

Este estudo foi desenvolvido para aplicar os objetivos da Rede e das organizações internacionais que trabalham na conservação dos recursos genéticos, caracterizar a raça Curraleiro Pé-Duro e estudar a variabilidade dos genes relacionados à resposta imune frente a patógenos de importância na bovinocultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Curraleiro Pé-Duro

A raça Curraleiro Pé-Duro foi reconhecida em 2012 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e recebeu este nome por ser conhecida no Nordeste como Pé-Duro e no Centro-Oeste brasileiro como Curraleiro. Os animais dessas duas distintas regiões geográficas foram considerados uma só raça quando pesquisas genéticas observaram parentesco entre o Curraleiro do Centro-Oeste e o Pé-Duro do Piauí. Assim, foi comprovada a existência de alelos comuns entre os rebanhos, apesar da distância genética desses animais em razão do isolamento geográfico que resultou em deriva genética. Tal semelhança é um indicativo que os rebanhos atuais são remanescentes de um grande rebanho que predominou em grande parte do Brasil e recentemente houve distanciamento entre o rebanho fundador e os demais¹⁴.

O Curraleiro Pé-Duro é conhecido pelos seus atributos de docilidade, rusticidade e resistência, tolerância a temperaturas elevadas, a parasitas, à seca e às pastagens naturais do Nordeste que apresentam vegetação de Caatinga. Os bovinos Curraleiro Pé-Duro podem ser criados em regiões de baixa a média tecnificação, pouco exploradas e impróprias à agricultura e ao cultivo de pastagens. Com o consumo da vegetação nativa, há redução dos custos de produção e redução da biomassa vegetal, reduzindo o risco de incêndios comuns na região¹⁵. Não obstante o seu pequeno porte, baixa produtividade e rentabilidade, os produtores relatam boa prolificidade ao observar que, em condições adequadas, as vacas parem uma vez ao ano e possuem bom rendimento de carcaça visto a pouca necessidade de cuidados e os baixos custos de produção¹.

Constantes pesquisas buscam relacionar as características de resistência da raça a doenças infecciosas para testar quais os fatores a tornaram mais adaptada às infecções. A primeira pesquisa relacionada ao tema foi direcionada à avaliação comparativa do sistema fagocitário de animais de raças locais. O estudo demonstrou a maior eficiência da resposta imune inata de animais CPD. Desde a publicação desses resultados, iniciou-se o programa sanitário dos núcleos de conservação *in situ*, buscando definir estratégias de manejo sanitário para o controle de enfermidades nos rebanhos^{16, 17}.

Os bovinos das raças Nelore e Curraleiro Pé-Duro foram submetidos a desafio para caracterizar aspectos da resposta imunológica celular e humoral. O desafio consistiu na aplicação da vacina BCG, composta pelo bacilo de Calmette & Guérin, obtido pela atenuação do *Mycobacterium bovis*. A raça local apresentou resposta específica e inespecífica com maior

número de células de defesa (leucócitos, segmentados, linfócitos e monócitos) e de imunoglobulinas séricas. A análise dos linfócitos por citometria de fluxo demonstrou maior número de células TCD4 e TCD8 e que a produção de IFN- γ por células TCD4 TCD8 foi mais eficiente, específica e inespecificamente, sugerindo resposta imunológica mais eficiente^{18, 19}. Esses resultados conferiram base científica para estimular o desenvolvimento de estudos de resistência genética das raças bovinas locais brasileiras às doenças.

2.2. Marcadores moleculares

Nos genomas existem loci, regiões responsáveis pela manifestação de características de interesse e uma forma comum de acessá-los é por meio do uso de marcadores moleculares, também chamados marcadores genéticos. Os marcadores moleculares são provenientes de um gene ou de um segmento de DNA e são polimórficos entre indivíduos de uma população²⁰. Os marcadores são herdados e podem ser usados em estudos de diversidade genética por diferenciarem os indivíduos²¹, e para investigar regiões dos genes que controlam a expressão do fenótipo. Com isso, é possível identificar marcadores relacionados a causas de doenças genéticas, associados com a produtividade, com o grau de parasitismo, a qualidade do leite, a diversidade genética de populações, entre outras várias aplicações²².

Os marcadores moleculares podem ser classificados conforme a metodologia usada para a sua identificação, sendo os marcadores revelados por hibridação com uma sonda de DNA ou por amplificação do DNA por PCR (reação em cadeia da polimerase). No primeiro grupo encontram-se os marcadores do tipo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e os minissatélites VNTR (*variable number of tandem repeats*). Na segunda categoria encontram-se o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), microssatélites SSR (*simple sequence repeat*), STR (*short tandem repeat*) e SNP (*single nucleotide repeat*)^{22, 23}.

Os marcadores são variações específicas no DNA, tais como inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais, que identificam os indivíduos. São muito importantes nos programas de melhoramento genético, visto que podem reduzir o tempo de seleção para determinadas características, como produtividade e resistência a doenças. Além disso, possuem aplicação imediata nos testes de filiação, na distância genética de populações, determinação de zigosidade gemelar, de freemartinismo e do sexo de embriões, identificação de portadores de doenças, seleção de animais tolerantes ao calor e seleção assistida por marcadores²².

Entende-se que algumas características não são regidas por um único gene, mas vários atuando ao mesmo tempo, o que dificulta a seleção de marcadores associados à resistência às doenças. Em bovinos foram descritos por volta de 344 loci de características quantitativas (QTL), ou seja, regiões do DNA que codificam alguma característica de interesse, associados à produção de leite e 71 QTLs associados à mastite. A associação específica alelo fenótipo foi descrita em 24 loci com variações na sequência que se associaram à produção leiteira e apenas 10 loci cujas variações se associaram à mastite. Além dos efeitos das alterações no DNA, modificações epigenéticas que podem ser afetadas por fatores ambientais também contribuem significativamente na regulação da expressão gênica, estando associadas às diferenças fenotípicas observadas²⁴.

Em estudos genéticos de manejo e conservação de populações, podem-se utilizar marcadores microssatélites, que são sequências variáveis de DNA polimórfico, de um a seis pares de bases, repetidas em série que podem estar em regiões codificantes ou não^{2, 25}. Os microssatélites são marcadores de fácil uso e, por terem alta taxa de mutação, são empregados nos estudos de diversidade genética entre e dentro de populações²². Possuem a vantagem de serem específicos por espécie e determinar a diversidade dentro das raças, os níveis de consanguinidade, a diferenciação entre as raças, a introgressão ou a mistura de raças²⁶.

Os polimorfismos de base única (SNPs) estão gradualmente substituindo o uso de microssatélites. Os SNPs são marcadores bialélicos e caracterizam-se por serem mudanças em uma única base do DNA, no qual é possível encontrar dois nucleotídeos na mesma posição. São os marcadores mais abundantes no genoma e podem ser observados a partir de analisadores genéticos de alta performance²².

A pesquisa de SNPs tem sido associada aos estudos de doenças multifatoriais. O envolvimento de haplótipos de SNPs em determinados fenótipos de doenças é de interesse no estudo da resistência genética a doenças²³. O estudo de associação ampla do genoma utilizando chip de alta densidade de SNPs tem sido útil na identificação de loci de resistência a doenças. Nos bovinos, foram identificadas associações entre SNPs e resistência à tuberculose^{22, 27}, ao desenvolvimento da forma latente de paratuberculose²⁸, à mastite clínica²⁹, além de loci relacionados a genes que codificam citocinas, importantes na resposta imune de bovinos³⁰.

Outra vantagem é a ampla distribuição no genoma, em locais que codificam proteínas, nos íntrons e nas regiões que flanqueiam os genes. Os SNPs são encontrados em STS (*sequence tagged sites*), regiões específicas dentro do genoma e são utilizados na elaboração de mapas genéticos, na definição de estruturas genéticas de populações e em estudos de doenças, a exemplo da anemia falciforme humana, uma doença causada por uma mutação pontual. Por

estarem distribuídos no genoma uniformemente, são detectados por técnicas simples, como sequenciamento, e apresentam baixa taxa de mutação e alta heterozigosidade nas populações^{2, 23}.

Os marcadores moleculares começaram a ser utilizados na produção animal com o objetivo de distinguir os animais geneticamente superiores, ou seja, com genes para maior produtividade e resistência às doenças, buscando transmitir essa superioridade genética para a progênie, a fim de alcançar um rebanho selecionado. No entanto, algumas características de interesse possuem herdabilidade baixa e dependem do tipo de herança (dominância, codominância, poligênica), da influência do ambiente e do tempo para que se possa avaliar fenotipicamente a progênie, sendo, portanto, esses fatores limitantes do processo de seleção^{11, 31}.

Os SNPs e microssatélites são úteis para observar a diversidade genética, a ancestralidade e a miscigenação, que fornecem informações para direcionar o programa de conservação da raça Curraleiro Pé-Duro e outras raças bovinas locais⁷.

2.3. Diversidade genética em espécies animais

A diversidade genética é a medida da variação total do genoma dentro de cada espécie. Essa variação ocorre naturalmente e a ocorrência de polimorfismos genéticos explica em parte a diversidade dentro de mesma população e/ou entre populações^{2, 32}. A variabilidade genética em populações domésticas e selvagens tem grande importância no estudo da evolução das espécies porque avalia a presença de forças evolutivas, como seleção, endogamia, estrutura de populações que alteram a adaptação e a sobrevivência das espécies, impostas pelas condições do meio. Os diferentes genótipos podem gerar fenótipos que respondem de formas distintas ao impacto de mudanças climáticas que afetam a produção, reprodução e saúde. A diversidade de genótipos também é alvo da seleção animal eficiente¹³.

Especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) perceberam a necessidade de elaborar o Plano Global de Ação para Recursos Genéticos Animais a fim de padronizar medidas de variabilidade genética aplicáveis a nível internacional para a gestão da biodiversidade das espécies pecuárias²². O plano prevê diretrizes técnicas que auxiliam os países a adotarem suas estratégias de manejo de recursos genéticos, além de uma lista de marcadores moleculares para os estudos de caracterização e monitoramento dos riscos à diversidade das espécies pecuárias, em conjunto com as diretrizes de caracterização fenotípica³³.

As populações pequenas, quando isoladas por distância geográfica, tendem a divergir geneticamente e ocorre subestruturação após várias gerações. Não obstante, quando há fluxo gênico, pela migração de indivíduos ou gametas, as frequências alélicas tendem a ser similares e a diferença genética entre populações reduzida. O impacto do fluxo de genes depende do tamanho efetivo da população^{2, 34, 35}. Um programa de conservação busca identificar, descrever e caracterizar os indivíduos de uma ou mais populações a fim de determinar a frequência dos alelos particulares e característicos de determinada população e de como esta pode contribuir futuramente para a conservação².

Os estudos de diversidade genética avaliam a variabilidade por meio da determinação de frequências alélicas por população e por *loci*; pela determinação de heterozigosidade (ou índice de diversidade genética); por determinar distâncias genéticas e ao detectar estrutura de populações. Sabe-se que a variabilidade em populações pequenas é baixa, e que as frequências alélicas se tornam similares entre as populações próximas, porém, quanto mais distantes geograficamente, mais diferentes são os alelos identificados^{34, 35}.

Além do tamanho efetivo da população, o maior número de alelos determina a maior diversidade e o menor risco de extinção³⁶. Dessa forma, utilizando-se marcadores é possível observar deriva genética e preveni-la, gastando menos recursos financeiros do que tentar resgatar uma raça do risco de extinção.

A heterozigosidade é uma medida de variabilidade genética que indica a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *loci* marcador. Tal medida considera um *loco* polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é inferior a 0,95. Portanto, quanto maior o número de alelos, mais polimórfico o marcador é considerado. A heterozigosidade é considerada em relação aos valores observados (heterozigosidade observada – H_o) e em relação aos valores esperados (heterozigosidade esperada – H_e). A H_o é a proporção de indivíduos heterozigotos na amostra e a heterozigosidade média esperada é a medida da H_o considerando as populações em completo equilíbrio³⁷.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é um modelo hipotético aplicado a uma população na qual as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes entre as gerações. Um completo equilíbrio só é possível teoricamente quando se considera uma população grande, com acasalamientos ao acaso e sem eventos de migração, mutação ou seleção. Em condições normais, o completo equilíbrio não é alcançado. Os desvios do EHW podem indicar que há acasalamientos direcionados; subdivisões nas populações; endogamia pela presença de ancestrais comuns; seleção; migração ou fluxo de genes. Porém, um desvio do

EHW pode indicar também erros de amostragem ou de genotipagem, quando os alelos nulos não são detectáveis³⁷.

Os marcadores também podem ser avaliados pelo Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)³⁸, um indicador da qualidade de informação do marcador. Valores de PIC inferiores a 0,25 indicam que o marcador é pouco informativo, enquanto valores superiores a 0,5 são considerados muito informativos³⁷. Marcadores pouco informativos não são adequados para os estudos de variabilidade genética porque apresentam os mesmos alelos na maioria das populações.

As raças Curraleiro Pé-Duro (CPD) e Pantaneiro possuem pequeno tamanho efetivo e compartilham alguns alelos semelhantes quando comparadas a outras raças bovinas. Foram observados menor diversidade genética e altos índices de endogamia na raça Curraleiro Pé-Duro em relação a outras raças locais brasileiras, indicando a necessidade de adotar estratégias de manejo e gestão para minimizar uma possível perda de diversidade alélica⁹.

A caracterização genética avalia a distância entre populações e dá suporte à escolha dos animais que farão parte da conservação, a partir da estimativa dos índices de similaridade entre indivíduos. Assim, formam-se pares para o cruzamento de forma a aumentar a variabilidade genética, evitando manutenção e cruzamentos de indivíduos similares³⁹.

A diminuição da diversidade genética das raças locais, principalmente nos países em desenvolvimento³, ocorreu pela substituição por raças exóticas, além dos cruzamentos absorventes, levando ao rápido desaparecimento destas raças e de suas linhagens, com consequente redução da variabilidade genética⁴⁰.

Os marcadores moleculares provaram ser um meio eficaz para a medição da diversidade genética, sendo fundamentais para selecionar uma raça para conservação. Entretanto, outras informações também devam ser consideradas, tais como o grau de ameaça de extinção, as características de importância econômica e/ou científica e os valores de relevância ecológica, cultural e histórica⁴¹.

2.4. Resistência genética a enfermidades

A biotecnologia tem sido empregada para aumentar a eficiência, qualidade e sustentabilidade da produção de alimentos de origem animal. Além do aumento produtivo, também é empregada na sanidade animal, com a produção de vacinas recombinantes, testes de DNA para a seleção de animais com genótipos superiores como forma de prevenção de doenças e aumento da resistência a ecto e endoparasitos. Pesquisas têm buscado encontrar genes ou marcadores cujos transcritos sejam associados à resposta imune⁴².

Grande parte da variabilidade observada na resposta às doenças em bovinos é de origem genética e a variação da resposta imunológica pode ser relacionada a diferenças raciais ou individuais⁴³. Sabe-se que aproximadamente 200 enfermidades de animais de produção podem ser causadas por variações genéticas em um único gene e que muitas mutações ainda não foram elucidadas²².

O estabelecimento da susceptibilidade a enfermidades relacionadas a fatores genéticos fez com que inúmeros estudos fossem desenvolvidos buscando associar essas características aos polimorfismos em genes candidatos, os quais são o meio de determinação da resposta da imunidade inata, considerando a relação da mesma com a adaptabilidade de uma população frente às pressões do meio^{24, 30, 44-46}.

As mudanças que ocorrem nos genes e que determinam se um organismo é suscetível ou resistente a uma enfermidade tem sido alvo de estudos em diversas espécies que têm demonstrado que as variações que afetam a resistência podem ocorrer em regiões codificantes, como as regiões de reconhecimento de antígenos que podem modificar a afinidade dos anticorpos aos antígenos, ou as alterações podem ocorrer em regiões não codificantes que são promotoras que controlam a transcrição dos genes, alterando o nível de expressão das proteínas⁴⁷.

Inicialmente, buscaram-se genes que codificam os componentes principais da imunidade inata, especialmente as famílias dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), onde estão compreendidos os receptores NOD-like (NLRs), que são divididos em três subgrupos, os chamados receptores RIG-like (RLRs), os receptores SRCR (do inglês *scavenger receptor cysteine-rich*) e os receptores Toll-like (*toll like receptors* - TLRs)⁴⁴.

Os vertebrados possuem em seu genoma o complexo principal de histocompatibilidade, conhecido como MHC (*major histocompatibility complex*), uma região composta por genes altamente polimórficos e polialélicos, que codificam moléculas relacionadas com a resposta imune, o que o torna o sistema genético mais importante na resistência genética às doenças infecciosas. Existem três grupos de moléculas de histocompatibilidade a antígenos: as classes I, II e III. As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas e têm a função de apresentar peptídeos de antígenos aos linfócitos T CD8+, que eliminam as células infectadas. As moléculas de classe II são expressas por células apresentadoras de antígenos, as quais apresentam os peptídeos de patógenos extracelulares às células T CD4+ e uma vez ativadas, geram a resposta inflamatória pela ativação de macrófagos e linfócitos B, os produtores de anticorpos. Na região de classe III, encontram-se genes

codificadores de componentes do sistema complemento, de enzimas esteroides hidroxilases (CYP) e do fator de necrose tumoral⁴⁸.

Nos bovinos, o MHC é conhecido como antígeno linfocitário bovino (*bovine lymphocyte antigen* - BoLA) e está presente no cromossomo autossômico 23 (BTA23). Os genes BoLA existem como um sistema organizado em *clusters*, alguns em estreita ligação e outros mais distantes. Na sub-região de classe IIa existem os *clusters* de genes DR e DQ, que são ligados aos genes de classe I e III. Os genes DR e DQ são subdivididos em genes DRA, DRB, DQA e DQB. A sub-região de classe IIb possui genes envolvidos no processamento e transporte de antígenos e nesta região existe o loci DRB3, o qual possui polimorfismos relacionados ao sítio de apresentação de antígenos. Portanto, alterações nessa região são relacionadas às distintas formas da resposta imune aos patógenos. O loci DRB3.2, o segundo éxon do terceiro gene DRB, possui alto grau de polimorfismo e as frequências gênicas são diferentes entre as raças. Os alelos BoLA-DRB3 são associados à suscetibilidade à dermatofilose e resistência à leucose, bem como a outras doenças infecciosas em diferentes raças bovinas⁴⁸.

Devido à sua importância, inúmeros trabalhos focaram na busca de genes codificantes dos componentes principais da imunidade inata, especialmente as famílias de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que englobam os receptores RIG-like (RLRs), os receptores SRCR e os receptores *Toll-like*⁴⁴.

Os TLRs são uma família de receptores de reconhecimento de patógenos, altamente conservados que desencadeiam a resposta imune adaptativa ao reconhecer os patógenos^{29, 49, 50}. Eles dão início às respostas imunológicas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e mediam a resposta imune inata a sítios de ligação presentes em uma vasta gama de patógenos, tais como bactérias, vírus, parasitos e fungos⁵¹.

Os TLR 2 e 4 atuam na resposta imune inata e adaptativa, reconhecendo os patógenos associados a padrões. O TLR4 reconhece a lipoproteína A presente nas bactérias Gram-negativas, enquanto o TLR2 é ativado por peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas no interior do fagossomo²². Foi observado que o gene TLR4 está implicado no reconhecimento de antígenos de micobactérias⁵², regula a produção de citocinas e estimula a imunidade do hospedeiro. Os polimorfismos em genes da família TLR foram relacionados à paratuberculose⁵³, à mastite²⁹ e à tuberculose⁵⁰.

Variações em sequências do DNA nos genes candidatos BoLA-DRB3, IL8RA, TLR4 e LTF foram associadas a casos de mastite²². Polimorfismos no gene que codifica o INF- γ foram associados a resistência a carrapatos⁵⁴ e a paratuberculose em bovinos⁴⁵.

O gene *solute linked carrier 11A1* (SLC11A1) codifica uma proteína de membrana conhecida como NRAMP 1 (proteína 1 do macrófago associada à resistência natural), responsável pela resistência inata a vários patógenos intracelulares. Este gene foi relacionado com a prevenção do crescimento bacteriano em macrófagos durante os estágios iniciais da infecção⁵⁵. Foi descrita relação entre polimorfismos na extremidade 3' não traduzida (3'UTR) desse gene e a brucelose bovina e bubalina²².

2.5. Estudo do ambiente na conservação e biodiversidade

A produção animal é afetada e causa problemas ambientais, mudanças climáticas e desequilíbrio ecológico. Mudanças climáticas podem afetar os sistemas de criação desfavoravelmente, limitando recursos disponíveis, ou favoravelmente, ao tornar regiões frias mais propícias à criação animal. As principais áreas da produção animal afetadas por mudanças climáticas são a produção de alimentos e pastagens, crescimento e reprodução animal. As mudanças na distribuição de parasitos e doenças também afeta a saúde dos animais, reduzindo o potencial produtivo⁴⁰.

O ambiente onde ocorrem as interações entre hospedeiros e patógenos é composto por fatores físicos, químicos, climáticos e biológicos que estão em interação e estes fatores estimulam os genomas a desenvolver uma resposta compatível com o estímulo recebido. Mudanças no ambiente natural alteram o fenótipo e a fisiologia, resultando em características únicas de adaptação, como a convivência com humanos, observada pela docilidade de alguns animais, adaptação aos recursos alimentares e de água disponíveis, aos requerimentos metabólicos, às mudanças climáticas severas, às doenças e parasitos⁵⁶.

As variáveis ambientais que exercem maior influência no espaço e podem modificar a ocorrência de doenças são a cobertura vegetal, precipitação pluviométrica, as temperaturas máxima e mínima, altitude, umidade relativa do ar, radiação solar⁵⁷, velocidade do vento e taxas de evaporação. Os eventos ambientais extremos tendem a aumentar em intensidade e duração e estima-se que o calor e a seca serão as principais causas das mudanças na produção animal. Nesse contexto de mudanças ambientais, os animais precisarão ter genes favoráveis e sofrer mudanças fenotípicas para se adaptarem às novas condições impostas⁴⁰.

A adaptabilidade é a principal ferramenta para o bom desempenho em um ambiente alterado. A adaptabilidade pode ser definida como a capacidade fisiológica ou genética de sobreviver e reproduzir em um ambiente ou a uma gama de variações ambientais. Os ambientes podem ser favoráveis ou podem ser caracterizados por escassos recursos de água e alimentos, alta pressão das doenças, grande variação climática e adaptar-se a estes fatores depende não só

da capacidade de aprender a viver em condições de estresse como também do componente genético. Nos sistemas de produção animal em larga escala, o ambiente é adaptado às necessidades dos animais. Porém, nos sistemas de pecuária de subsistência os animais devem ser adaptados ao ambiente. As diferentes formas de produção exigem diferentes genótipos⁵⁶.

Entender como as doenças ocorrem no ambiente é a primeira etapa na busca por uma paisagem para a promoção da saúde. Contudo, a saúde também é resultado das condições sociais, culturais, econômicas e políticas das populações^{58, 59}. Barreiras ambientais, processos históricos e processos naturais, como o acasalamento, podem moldar a estrutura das populações, por isso populações próximas possuem estrutura genética mais semelhante em relação a populações distantes⁶⁰.

A variabilidade genética dos rebanhos é imprescindível na adaptação ao ambiente e seus fatores. Se houver perda de variabilidade, os meios para o combate às doenças podem ser perdidos. Portanto, a manutenção da diversidade de genes é um recurso imprescindível no combate aos efeitos da evolução dos patógenos⁶¹.

A diversidade de marcadores relacionados à resistência genética a doenças é um importante recurso para a redução do uso de antimicrobianos na produção animal e aumenta a possibilidade de resistir à introdução de novos patógenos⁵⁶. À medida que fatores bioecológicos, como temperatura, umidade, fauna e fatores antrópicos modificam a circulação do agente infeccioso⁶², alterando a prevalência das doenças, torna-se mais importante a compreensão do espaço na epidemiologia das infecções. Populações em paisagens mais modificadas são mais suscetíveis aos patógenos e têm maior prevalência das infecções. Dessa forma, não só em ambiente natural, mas também em rebanhos domésticos é possível explicar como os componentes ambientais podem afetar diferentemente a variação genética de rebanhos^{45, 55}.

2.6. Justificativa

A conservação da diversidade genética tem por intuito aumentar o número efetivo da população, além de ser muito mais eficaz do que evitar a extinção⁶³. Programas de melhoramento de raças locais, em países como o Brasil, são importantes, pois constituem um recurso alternativo para a manutenção da produção animal. Sobretudo, em possíveis condições adversas futuras decorrente de modificações ambientais e econômicas.

O pequeno número efetivo de indivíduos nas populações e cruzamentos parentais diminuem a diversidade genética e colocam em risco de extinção as raças locais. A caracterização genética dos indivíduos auxilia na identificação de subdivisões dentro das

populações, endogamia, migração ou fluxo gênico e seleção natural, que são informações úteis nos programas de acasalamento direcionados à seleção de animais mais resistentes a doenças e que possuem maior diversidade alélica para manutenção da diversidade.

Para estimular a criação de raças locais, faz-se o estudo genético como forma de identificar as características próprias da raça, que indiquem a mesma como portadora de marcadores moleculares de resistência a enfermidades, possivelmente úteis para os programas de conservação e no cruzamento com outras raças.

Sob este enfoque, foi desenvolvido o presente estudo com o objetivo de identificar marcadores moleculares relacionados a genes de resistência e susceptibilidade contra as enfermidades em bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro e relatar influências ambientais e socioeconômicas na distribuição de animais sororreagentes às enfermidades estudadas, com intuito de subsidiar o programa de conservação de raças bovinas locais e também auxiliar futuras pesquisas em melhoramento animal.

2.7. Objetivos

2.7.1. Objetivo geral

Com este estudo objetivou-se caracterizar geneticamente as populações de Curraleiro Pé-Duro, verificando a ocorrência de marcadores genéticos para caracterização racial e para resistência às enfermidades (virais, bacterianas e parasitárias) e relacionando os marcadores tipo SNP e microssatélites com as características fenotípicas sanitárias, as respostas aos testes sorológicos, obtidas a partir do banco de dados da Rede Pró-Centro-Oeste “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”.

2.7.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de marcadores microssatélites de caracterização racial, determinar a variabilidade intra e inter populacional, determinar a estrutura genética das populações e relacionar com a frequência de anticorpos contra patógenos de amostras colhidas em 2011, em rebanhos localizados nos estados de Goiás, Tocantins e Piauí.
- Avaliar a presença de marcadores microssatélites relacionados à resistência a enfermidades em bovinos Curraleiro Pé-Duro e relacionar com a frequência de anticorpos contra patógenos

de amostras colhidas em 2011, em rebanhos localizados nos estados de Goiás, Tocantins e Piauí.

- Avaliar a presença de alelos determinados por SNPs presentes em regiões codificadoras do DNA relacionadas à resposta imune com a frequência de anticorpos contra patógenos de amostras colhidas em 2011, em rebanhos de Curraleiro Pé-Duro localizados nos estados de Goiás, Tocantins e Piauí.

REFERÊNCIAS

1. Fioravanti MCS, Juliano RS, Costa GL, Abud LJ, Cardoso VS, Carpio MG, et al. Conservación del bovino Curraleiro: Cuantificación del censo y caracterización de los criadores. *Animal Genetic Resources*. 2011;48:109-16.
2. Quiroz J. Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas. Tesis Doctoral Universidad de Córdoba, Córdoba, España. 2007:155.
3. Cardellino RA. Animal genetic resources conservation and development: The role of FAO. *Archivos de zootecnia*. 2003;52(198).
4. FAO. Plano de ação mundial para os recursos genéticos animais e declaração de Interlaken. Conferência Técnica Internacional sobre Recursos Genéticos Animais para a Alimentação e a Agricultura; Interlaken, Suíça: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2010. p. 21.
5. Segura-Correa JC, Montes-Pérez RC. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Revista Biomédica*. 2001;12(3):196-206.
6. Fioravanti MCS, Moura MI, Silva MC, Carvalho GMC. Valoração econômica para raças locais: bovinos Curraleiro Pé-Duro. I Simpósio Internacional de Raças Nativas: Sustentabilidade e Propriedade Intelectual; Teresina, 2015.
7. Egitto AA. Diversidade genética, ancestrabilidade individual e miscigenação das raças bovinas no Brasil com base em microsatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para conservação. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
8. Egitto AA, Fioravanti MCS, Grattapaglia D, Ramos AF, Albuquerque MSM, Mariante AS. Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça Curraleira de diferentes regiões do Brasil. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*. 2011;1:110-3.
9. Egitto AA, Lara MAC, Albuquerque MSM, Martinez AM, Landi V, Juliano RS, et al. Estrutura populacional e diversidade genética de raças bovinas brasileiras localmente adaptadas. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*. 2014;4:16-8.

10. Salles PdA, de Medeiros GR, Costa RG, Ramos CTC, Borburema JB, de Oliveira Almeida MJ, et al. Programa de conservação e melhoramento de uma raça bovina brasileira: Curraleiro (Pé-Duro). AICA. 2011;1:453-6.
11. Carvalho TdL. Isolamento e caracterização da região 5' flanqueadora do gene Duffy em *Bos indicus* e *Bos taurus* Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2007.
12. Reed CA. The beginnings of the animal domestication. In: MASON IL, editor. Evolution of domesticated animals. London: Longman; 1984. p. 1 -6
13. Giovambattista G, Takeshima SN, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LA, Saito H, et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. Gene. 2013;519(1):150-8.
14. Carvalho GMC, Almeida MJO, Azevêdo DMMR, Araújo Neto RB, Leal TM, Monteiro FC, Frota MNL, Neto AFL. Origem, formação e conservação do gado Pé-Duro, o bovino do Nordeste brasileiro. Documentos 208. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 25 p.
15. Carvalho JH. Potencial Econômico do Bovino Pé-Duro. Teresina-PI: Embrapa Meio-Norte; 2002. 14 p.
16. Juliano RS, Fioravanti MCS, Sereno JRB, de Abreu UGP, Jayme VS, Silva AC, et al. Aspectos sanitários dos núcleos de conservação *in situ* de bovinos pantaneiros. Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 103. 2011.
17. Juliano RS. Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2006.
18. Lobo JR. Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros curraleiro e nelore vacinados com mycobacterium bovis-BCG. 2009.
19. Maggioli MF, Lobo JR, Fioravanti MCS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Cellular immune response of Curraleiro Pé-duro and Nelore calves following Mycobacterium bovis-BCG vaccination. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013;33:1403-8.
20. Grattapaglia D, Ferreira M. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA, Brasília. 1998;3.
21. Milach SCK. Marcadores de DNA em plantas. Porto Alegre, 1998.
22. Singh U, Deb R, Alyethodi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, et al. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. Biomarkers and Genomic Medicine. 2014;6(2):49-58.
23. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet Sel Evol. 2002;34(3):275-305.
24. Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. Anim Genet. 2009;40(6):832-51.

25. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*. 2002;11(1):1-16.
26. Xu X, Peng M, Fang Z. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet*. 2000;24(4):396-9.
27. Bermingham ML, Bishop SC, Woolliams JA, Pong-Wong R, Allen AR, McBride SH, et al. Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity (Edinb)*. 2014;112(5):543-51.
28. Vázquez P, Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, et al. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle. *Vet Med Int*. 2014;2014:321327.
29. Russell CD, Widdison S, Leigh JA, Coffey TJ. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Vet Res*. 2012;43:17.
30. Grosse WM, Kappes SM, Laegreid WW, Keele JW, Chitko-McKown CG, Heaton MP. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mamm Genome*. 1999;10(11):1062-9.
31. Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília 1998. 220 p.
32. Andersson L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat Rev Genet*. 2001;2(2):130-8.
33. Food and Agriculture O. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. 2011.
34. Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*. 2003;18(4):189-97.
35. Barbujani G. DNA variation and language affinities. *Am J Hum Genet*. 1997;61(5):1011-4.
36. Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology*. 1998;12(4):844-55.
37. Menezes MPC, Martinez AM, Ribeiro MN, Filho ECP, Bermejo JVD. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *R Bras Zootec*. 2006 35(4):1336-41.
38. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 1980;32(3):314.

39. Egito, de AA, Albuquerque MS, Mariante AdS. Caracterização genética de raças naturalizadas. Simpósio de recursos genéticos para América Latina e Caribe; Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná; 2001 p. 121-6.
40. McManus C, Canozzi ME, Bracellos J, Paiva SR. Pecuária e mudanças climáticas. Revista UFG. 2012;Ano XIII(13).
41. Talle SB, Chenyabuga WS, Fimland E, Syrstad O, Meuwissen T, Klungland H. Use of DNA technologies for the conservation of animal genetic resources: A review. Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science. 2005(55):1-8.
42. Coutinho LL, Rosário MFd, Jorge EC. Biotecnologia animal. Estudos Avançados. 2010;24:123-47.
43. Morris CA. A review of genetic resistance to disease in Bos taurus cattle. Vet J. 2007;174(3):481-91.
44. Novák K. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. Vet Immunol Immunopathol. 2014;157(1-2):1-11.
45. Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, et al. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. Prev Vet Med. 2009;91(2-4):189-96.
46. Kadarmideen HN, Ali AA, Thomson PC, Müller B, Zinsstag J. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. Anim Genet. 2011;42(6):656-8.
47. Díaz S, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Analecta Veterinaria. 2005;25.
48. Behl JD, Verma NK, Tyagi N, Mishra P, Behl R, Joshi BK. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. ISRN Veterinary Science. 2012;2012:872710.
49. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11(5):373-84.
50. Sun L, Song Y, Riaz H, Yang H, Hua G, Guo A, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. Vet Immunol Immunopathol. 2012;147(3-4):195-201.
51. Basith S, Manavalan B, Lee G, Kim SG, Choi S. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). Expert Opin Ther Pat. 2011;21(6):927-44.
52. Weiss DJ, Souza CD, Evanson OA, Sanders M, Rutherford M. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. J Leukoc Biol. 2008;83(1):48-55.

53. Koets A, Santema W, Mertens H, Oostenrijk D, Keestra M, Overdijk M, et al. Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 2010;93(4):305-15.
54. Maryam J, Babar ME, Nadeem A, Hussain T. Genetic variants in interferon gamma (IFN- γ) gene are associated with resistance against ticks in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Mol Biol Rep.* 2012;39(4):4565-70.
55. Paixão TA, Martinez R, Santos RL. Polymorphisms of the coding region of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2012;64:1081-4.
56. Mirkena T, Duguma G, Haile A, Tibbo M, Okeyo AM, Wurzinger M, et al. Genetics of adaptation in domestic farm animals: A review. *Livestock Science.* 2010;132(1-3):1-12.
57. Pikula J, Beklova M, Holesovska Z, Skocovska B, Treml F. Ecology of brucellosis of the European hare in the Czech Republic. *Vet Med Czech.* 2005;50(3):105-9.
58. Luz MT. Ordem social, instituições e políticas de saúde no Brasil. Rio de Janeiro: UERJ; 2009. 225 p.
59. Buss PM. Promoção da saúde e a saúde pública: contrinuição para o debate entre as escolas de saúde pública da américa latina. Rio de Janeiro: Ensp.; 1998.
60. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol.* 2002;11(2):155-65.
61. FAO. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Rome2007.
62. Silva LJd. O conceito de espaço na epidemiologia das doenças infecciosas. *Cadernos de Saúde Pública.* 1997;13(4):585-93.
63. Simianer H. Decision making in livestock conservation. *Ecological Economics.* 2005(53):559-72.

CAPÍTULO 2 – ESTRUTURA GENÉTICA DE BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO E SUA RELAÇÃO COM PERFIL SOROLÓGICO FRENTE A PATÓGENOS DE INTERESSE ECONÔMICO E ZOONÓTICO

Resumo

Os bovinos da raça local brasileira Curraleiro Pé-Duro são animais rústicos e resistentes a doenças infecciosas e parasitárias. Estratégias para conservação da raça e do potencial genético de resistência a doenças também deve considerar as características próprias da raça. O objetivo da pesquisa foi analisar a diversidade e estrutura populacional de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro por avaliação de marcadores microssatélites e correlacionar com o perfil sorológico frente aos agentes causadores da brucelose, leptospirose, neosporose, leucose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e diarreia viral bovina (BVD). Amostras de DNA de 608 bovinos foram amplificadas e genotipadas usando 28 marcadores microssatélites de caracterização racial. Os genótipos identificados foram assignados a três *clusters*, indicando que existe uma subestruturação na raça relacionada ao distanciamento geográfico das propriedades. A heterozigosidade observada foi inferior à esperada na maioria dos loci e os valores de *Fst* variaram entre 0,03073 (ETH3) e 0,402 (INRA63) no *cluster* 1, entre -0,02799 (INRA32) e 0,39359 (INRA63) no *cluster* 2, entre -0,06055 (INRA32) e 0,28483 (TGLA53) no *cluster* 3. A frequência de *Brucella* spp., *Neospora caninum* e VLB foi significativa entre os *clusters*. As diferenças na ocorrência das doenças não foram suficientes para indicar qual subpopulação apresenta maior resistência.

Palavras-chave: caracterização racial, conservação genética, doenças infecciosas

GENETIC STRUCTURE OF CURRALEIRO PÉ-DURO CATTLE AND RELATION WITH SEROLOGICAL PROFILE AGAINST PATHOGENS OF ECONOMIC AND ZOONOTIC INTEREST

Abstract

Curraleiro Pé-Duro cattle, a Brazilian local breed, are animals that are more resistant to infectious and parasitic diseases. Strategies for the conservation of the breed and the genetic resistance to diseases should also consider the characteristics of the breed. The objective of this research is to analyze the diversity and population structure of Curraleiro Pé-Duro breed by microsatellite markers and to correlate the serological profile for causative agents of brucellosis, leptospirosis, neosporosis, leukosis, infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine viral diarrhoea (BVD). DNA samples of 608 bovines were amplified and genotyped using 28 microsatellite markers for breed characterization. The genotypes were assigned to three clusters, indicating a substructure population related to the geographic distance. The observed heterozygosity was lower than expected in most loci and *Fst* values ranged from 0,03073 (ETH3) to 0,402 (INRA63) on cluster 1, from -0,02799 (INRA32) to 0,39359 (INRA63) on cluster 2 and from -0,06055 (INRA32) to 0,28483 (TGLA53) on cluster 3. The *Brucella* spp., *Neospora caninum* and BLV frequencies were significant between clusters. The differences on occurrence of diseases were not sufficient to indicate which genetic subpopulation has higher resistance to infections.

Keywords: racial characterization, genetic conservation, infectious diseases

1. Introdução

As raças locais se tornaram alvo de interesse de organismos internacionais, como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), devido à capacidade de viver e reproduzir em condições climáticas extremas e a suas características de adaptação às condições locais, caracterizando-as como raças resilientes. Todas estas características tornam essas raças patrimônio genético que deve ser preservado, especialmente considerando a necessidade de produção de alimentos frente às mudanças climáticas globais¹.

No período da colonização foram introduzidos os primeiros bovinos no Brasil, oriundos da Península Ibérica. Esses animais se dispersaram pelo território brasileiro e sofreram seleção natural, adaptando-se às condições de cada um dos ecossistemas que povoaram, resultando em bovinos rústicos, com características de tolerância ao estresse por calor, hídrico e alimentar, alta prolificidade e resistência a doenças e parasitos².

No início do século 20 foram importadas raças comerciais mais produtivas, porém sem a adaptabilidade das raças locais brasileiras. A substituição por raças zebuínas, mais produtivas, diminuiu o número efetivo dos bovinos locais ao extremo de entrarem na lista das raças em perigo de extinção³. Esta diminuição ocorreu tanto pela troca dos animais quanto pelos cruzamentos absorventes⁴.

Para evitar a perda desse material genético, empresas e instituições de pesquisa iniciaram planos para a conservação de recursos genéticos animais com a criação do Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais, coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) com o objetivo de identificar as populações em risco, caracterizá-las fenotipicamente e geneticamente e avaliar seu potencial produtivo. As raças de diversas espécies estão sendo conservadas em seu *habitat* natural (núcleos de conservação *in situ*) e o material genético, sêmen e embriões, está sendo armazenado *ex situ*^{5, 6}. Pesquisadores de outras instituições como as universidades, também passaram a desenvolver projetos, inclusive com formação de redes de pesquisa, com várias espécies de raças locais, com o objetivo de caracterizar, conservar e utilizar esse importante material genético⁷.

O fenótipo é alterado de acordo com o surgimento de polimorfismos. Fatores como mutação, deriva genética, seleção natural e migração levam à alteração da frequência dos alelos dentro e entre gerações, gerando populações diferentes. Mudanças ambientais também podem estar associadas ao surgimento de novos fenótipos de modo que a influência das pressões seletivas do ambiente junto aos fatores genéticos elimina ou fixa fenótipos mais adaptados, moldando as populações⁸.

Raças localmente adaptadas podem compartilhar fenótipos similares, o que dificulta a alocação precisa dos animais às suas respectivas raças. As populações de uma raça que são separadas geograficamente podem se diferenciar geneticamente, a ponto de surgirem subdivisões dentro de uma mesma raça. O isolamento geográfico, o reduzido número de indivíduos e a adaptação a diferentes ambientes podem gerar deriva genética, alterando a frequência dos alelos acumulados ao longo das gerações; por isso a caracterização genética permite identificar os grupos que foram isolados no ambiente por longo tempo e que acabaram se tornando um grupo geneticamente distinto^{9, 10}.

Antes que uma espécie seja eliminada, a diversidade genética nos indivíduos é afetada. A genética geográfica é um modelo de estudo de diversidade genética que auxilia na compreensão do fluxo gênico e na adaptação das espécies dentro do espaço heterogêneo e fragmentado pela compreensão das distâncias geográficas e do modo como ocorre a transmissão de genes, fazendo possível detectar fatores ambientais que estimulam o processo de adaptação¹¹.

A caracterização genética é um critério utilizado na decisão sobre qual população deve ser conservada, sendo especialmente importante para otimizar a escolha das amostras quando os recursos são escassos, assegurando a variabilidade genética. A escolha das raças e indivíduos que devem participar do programa de conservação considera os interesses econômicos, a adaptabilidade e a presença de alelos únicos¹².

As características adaptativas dos recursos genéticos animais podem ser transmitidas a outras gerações e, portanto, os genótipos mais adaptados precisam ser identificados e manejados. O intuito de identificar os genótipos e de preservar raças locais é o possível uso futuro do material genético como forma de introdução de suas características únicas de adaptabilidade nos cruzamentos com raças comerciais, tornando-as mais eficientes, além de conservar e promover o uso potencial e diversificado das raças brasileiras, evitando a extinção, mantendo a produção em condições adversas de clima^{13, 14}.

Uma das características mais valiosas para o controle das doenças, visto que o uso de medicamentos e o controle de vetores são estratégias difíceis e os impactos ambientais e sobre a segurança alimentar decorrentes destas estratégias são ruins, é a exploração de raças locais tolerantes às infecções. Exemplos são os bovinos africanos da raça N'Dama do Oeste, tolerantes à tripanossomose, e os ovinos Red Maasai do Leste Africano, resistentes a vermes gastrointestinais. Somam-se ao problema a falta de recursos de pecuaristas de baixa renda para ter acesso aos tratamentos e serviços veterinários, como também a resistência dos patógenos frente ao uso inadequado de antimicrobianos. Com o cenário exposto, o manejo genético de

animais é uma alternativa para aumentar a resistência às doenças utilizando-se raças mais apropriadas para cada tipo de produção; melhorando os rebanhos pela escolha de animais com maior nível de resistência, além de cruzamentos entre raças para a incorporação dos genes de resistência em raças que não os possuem¹⁵.

Este estudo foi elaborado para analisar a diversidade e estrutura populacional de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro (CPD) por avaliação de marcadores microssatélites de caracterização racial e correlacionar perfil sorológico frente a patógenos que ocasionam enfermidades com impacto na cadeia produtiva da carne e do leite: brucelose, leptospirose, leucose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e neosporose.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem e sorologia

As amostras de sangue e os dados de perfil sorológico do rebanho que compõe o presente estudo são parte do banco de amostras e dados da Rede Pró Centro-Oeste “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro” (Rede Curraleiro e Pantaneiro). Foram usadas 1.100 amostras de sangue de bovinos Curraleiro Pé-Duro (CPD), machos e fêmeas de diferentes faixas etárias, colhidas no ano de 2011. A localização das propriedades participantes está demonstrada na Figura 1.

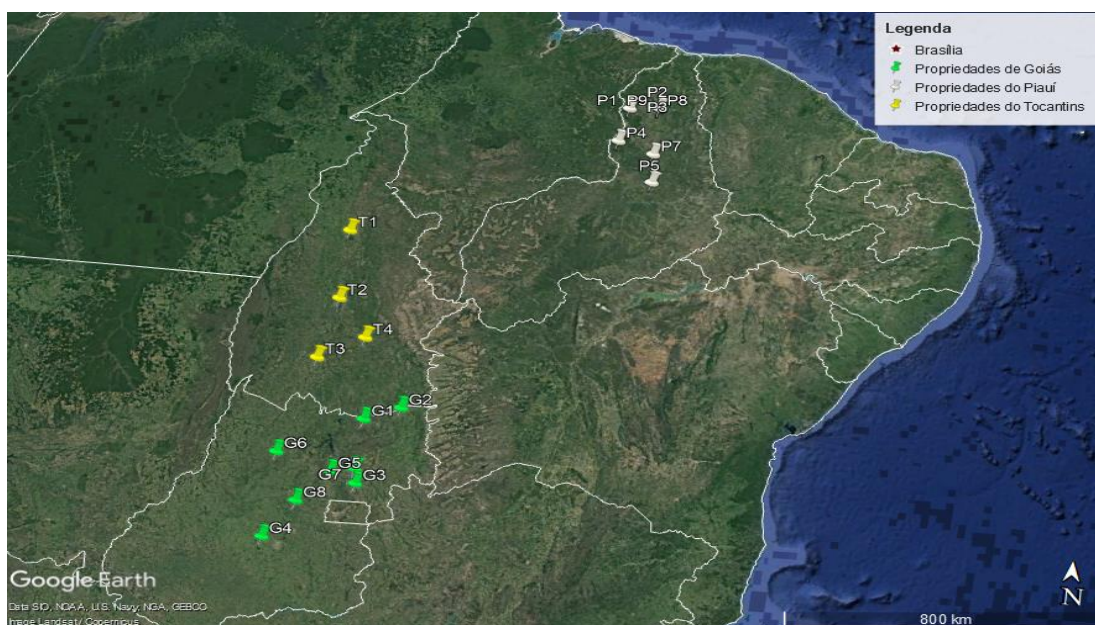


FIGURA 1 – Geolocalização das propriedades de bovinos Curraleiro Pé-Duro amostradas em 2011, no âmbito das atividades da Rede Curraleiro e Pantaneiro

Os dados do perfil epidemiológico foram determinados pelos resultados sorológicos (positivo/negativo/suspeito) e pelas repostas aos questionários epidemiológicos, aplicados no momento da colheita das amostras. Os testes sorológicos e o local onde foram realizados foram: prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT) para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus*, realizado no Laboratório Multiusuário de Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG (EVZ/UFG); ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para determinar anticorpos contra os vírus da leucose, rinotraqueite infecciosa (IBR) e diarreia viral bovina (BVD), realizado no Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG; soroaglutinação microscópica (SAM) para detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp., realizado no Laboratório de Leptospirose da EVZ/UFG; e imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no Laboratório de Protozoologia do Centro de Parasitologia Veterinária (CPV) da EVZ/UFG. As enfermidades e técnicas usadas para sua identificação estão registradas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Técnicas de diagnóstico sorológico para identificação de bovinos Curraleiro Pé-Duro suscetíveis ou resistentes às infecções bacterianas, virais e parasitária

Patógeno	Técnica	Reagente	Ponto de corte	Referência
<i>Brucella</i>	Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)	Reagente comercial TECPAR	Qualquer aglutinação foi considerada positiva	Brasil ¹⁶
<i>Leptospira</i>	Soroaglutinação microscópica (SAM)	Coleção de 19 antígenos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo (<i>australis</i> , <i>bratislava</i> , <i>autumnalis</i> , <i>butembo</i> , <i>castellonis</i> , <i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>hebdomadis</i> , <i>copenhageni</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> , <i>pyrogenes</i> , <i>hardjo</i> , <i>wolffi</i> , <i>shermani</i> , <i>tarassovi</i> , <i>andamana</i> , <i>patoc</i> e <i>sentot</i>).	1:100	OIE ¹⁷
Vírus da leucose bovina	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	Reagente comercial (IDEXX Laboratories, Inc)	Estabelecido pelo kit comercial	OIE ¹⁸
Herpesvírus bovino tipo 1	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	Reagente comercial (IDEXX Laboratories, Inc)	Estabelecido pelo kit comercial	OIE ¹⁹
Vírus da diarreia viral bovina	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	Reagente comercial (IDEXX Laboratories, Inc)	Estabelecido pelo kit comercial	OIE ²⁰
<i>Neospora caninum</i>	Imunofluorescência indireta (IFI)	Utilizou-se extrato solúvel de taquizoítos de <i>N. caninum</i> da cepa Nc-1	1:100	Álvarez-García ²¹

CN: média dos controles negativos; CP: média dos controles positivos

2.2. Análise genética

A avaliação molecular envolveu os passos de extração, amplificação, genotipagem e análise estatística. O DNA total foi extraído no Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás, a partir das amostras de sangue congelado.

O protocolo de extração do DNA foi adaptado de Miller²². Foram aliquotados 200 µL de sangue em microtubo tipo *ependorf*, adicionado 1000 µL de Tris-EDTA (TE), homogeneizado e incubado durante cinco minutos, após os quais as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido. Adicionaram-se 400 µL de solução de lise (Tris-HCL, EDTA, NaCl₂, SDS, água, mercaptoetanol e proteinase K), rompeu-se o *pellet* com a pipeta e as amostras foram incubadas a 56°C durante uma hora. Foram adicionados 150 µL de acetato sódico 3M (pH5,5) e o material foi homogeneizado, incubado por alguns minutos em frio e centrifugado 15 minutos a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram aliquotados em um novo tubo com 400 µL de isopropanol e as amostras foram invertidas e centrifugadas durante três minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 1.000 µL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas durante um minuto a 10.000 rpm, o etanol foi descartado e as amostras foram secadas por evaporação. Após secas, foi adicionado 200 µL de tampão TE. A concentração de DNA das amostras foi quantificada em espectrofotômetro NanoPhotometerTM e as amostras foram diluídas a uma concentração de 20 ng.µL⁻¹.

Os microssatélites STR (*short tandem repeat*) foram selecionados a partir da lista de marcadores recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e ISAG (*International Society for Animal Genetics*) para estudo de diversidade genética de bovinos. No Quadro 2 são apresentados os 28 microssatélites analisados com as sequências direta e reversa dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), o intervalo de tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases e a referência.

QUADRO 2 - Microssatélites utilizados na caracterização racial de Curraleiros Pé-Duro.

Micros.	BTA	Primer forward	Primer reverse	Intervalo (pb)	Ref.
BM1314	26	TTCTCTCTCTCTCTCCAAAC	ATCTCAAACGCCAGTGTGG	143-167	1
BM1818	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG	AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	248-278	1
BM1824	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	176-197	1
BM2113	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	CTTCTGAGAGAAGCAACACC	122-156	1
BM8125	17	CTCTATCTGTGGAAGGTGGG	GGGGGTAGACTTCAACATACG	109-123	1
CRSM60	10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGC A	AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	79-115	2
CSSM66	14	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	171-209	3
ETH10	5	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	207-231	4
ETH185	17	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC	GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	214-246	5
ETH225	9	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT	ACATGACAGCCAGCTGCTACT	131-159	5
ETH3	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG	ACTCTGCCTGTGGCCAAAGTAGG	103-133	4
HAUT24	22	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT	AATACACTTTAGGAGAAAAATA	104-158	6
HAUT27	27	TTTTATGTTTATTTTGTACTGG	AACTGCTGAAATCTCCATCTTA	120-158	6
HEL13	11	TAAGGACTTGAGATAAGGAG	CCATCTACCTCCATCTTAAC	178-200	7
HEL9	8	CCCATTGAGTCTTCAGAGGT	CACATCCATGTTCTCACCAC	141-173	7
ILSTS11	14	GCTTGCTACATGGAAAGTGC	CTAAATGCGAGAGCCCTACC	261-271	8
ILSTS6	7	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAACG	277-309	9
INRA23	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTT C	TAACCTACAGGGTGTTAGATGAATC	195-225	10
INRA32	11	AAACTGTATTCTCTAATAGCTAC	GCAAGACATATCTCCATTCCTTT	160-204	10
INRA35	16	ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG	TTGTGCTTTATGACACTATCCG	100-124	10
INRA37	10	GATCCTGCTTATATTTAACCAC	AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	112-148	10
INRA63	18	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC	AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	167-189	10
MM12	9	CAAGACAGGTGTTTCAATCT	ATCGACTCTGGGGATGATGT	101-145	11
SPS115	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCA G	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	234-258	2
TGLA122	21	CCCTCTCCAGGTAAATCAGC	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	136-184	3
TGLA227	18	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGC T	ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	75-105	12
TGLA53	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	143-191	12
TGLA126	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTT CT	TTGCTCTCTATTCTCTGAATATTCC	115-131	13

Micros.: nome; BTA: cromossomo de localização; *Primer forward e reverse*: sequência dos primers; bp: pares de bases; Ref.: referência bibliográfica. 1 (Bishop *et al.*, 1994); 2 (Moore *et al.*, 1994); 3 (Barendse *et al.*, 1994); 4 (Solinas Toldo *et al.*, 1993); 5 (Steffen *et al.*, 1993); 6 (Thieven *et al.*, 1997); 7 (Kaukinen & Varvio, 1993); 8 (Brezinsky *et al.*, 1993a); 9 (Brezinsky *et al.*, 1993b); 10 (Vaiman *et al.*, 1994); 11 (Mommens *et al.*, 1994); 12 (Kappes *et al.*, 1997)

Fonte: Adaptado de Quiroz²³ e FAO¹

O *mix* para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi preparado com 2 µL de DNA, 3 µL de *primer mix* e 5 µL de *mix* comercial (*Taq* PCR Master Mix Kit, QIAGEN) contendo tampão de amostra que minimiza as necessidades de otimização, *Taq* DNA polimerase e DNTP's. Os *primer mix* foram preparados com água miliQ e a concentração final da solução de trabalho de cada *primer* foi de 0,2 µM. Alguns *primers* tiveram que ser adicionados na concentração de 0,4 µM por não amplificarem bem. As PCRs foram realizadas em quatro reações multiplex e seus produtos visualizados em dois eletroferogramas. Na Figura 2 estão representadas as reações multiplex com os respectivos loci microssatélites e os fluorocromos.

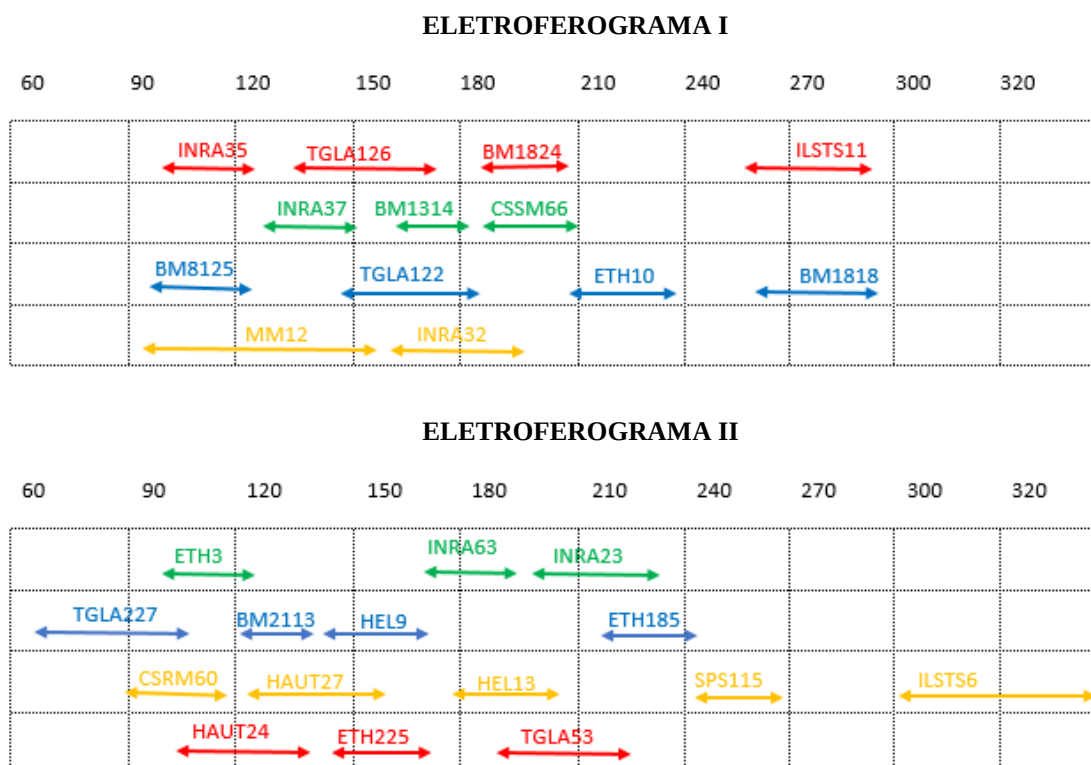


FIGURA 2 – Esquematização dos eletroferogramas I e II obtidos por eletroforese capilar com os marcadores, posições e fluorocromos FAM (azul), NED (amarelo), PET (vermelho) e VIC (verde)

A amplificação dos *primers* foi otimizada *in house* testando as temperaturas ótimas de amplificação dos fragmentos para reações multiplex. Para a padronização das reações foram testadas duas amostras positivas anteriormente genotipadas em reações de PCR multiplex com gradiente de temperaturas entre 55°C a 62°C. As amostras foram agrupadas por tamanho do fragmento amplificado e fluorocromo utilizado, de forma a não haver sobreposição de fragmentos. Os *primers* de cada eletroferograma foram divididos em duas PCR multiplex, uma com temperatura de anelamento de 55°C e outra 60°C, escolhidos pela melhor sinal de amplificação em cada reação.

A primeira e a segunda PCR multiplex do primeiro eletroferograma e a segunda multiplex do segundo eletroferograma (Gel1M1, Gel1M2 e Gel2M2) seguiram o protocolo de amplificação de um ciclo inicial de 95°C por cinco minutos, 34 ciclos de amplificação (95°C por 40 segundos, 55°C por 50 segundos e 72°C por um minuto) e extensão final de 72°C por 30 minutos, seguido de temperatura infinita de 12°C. A PCR dos *primers* do Gel2M1 foi realizada com ciclo inicial de 95°C por cinco minutos seguida de 34 ciclos (95°C por 30 segundos e 62°C por quatro minutos), extensão final de 60°C por 20 minutos e temperatura infinita de 12°C.

Os produtos da amplificação dos loci microssatélites foram genotipados em sistemas de eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems®) do Núcleo de Pesquisas Replicon/LaGene da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e com o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems®) na Universidade de Córdoba, Espanha. Os dados foram analisados no programa GeneMapper. O tamanho dos fragmentos amplificados foi definido pela comparação com o padrão Gene Scan LIZ 600® (Life Technologies) e duas amostras controles em cada eletroferograma. As amostras controles eram amostras previamente genotipadas pela empresa Animal Breeding Consulting, Espanha, e os genótipos eram conhecidos e padronizados.

Foi realizada a filtragem dos genótipos para retirar amostras que falharam na amplificação de metade ou mais dos marcadores, pois quanto mais falhas de genotipagem, mais erros de atribuição podem ocorrer. A propriedade P6 foi excluída por não ter amostras de DNA para as análises genéticas. Ao final do controle de qualidade restaram 608 amostras que foram avaliadas em conjunto, sem definição prévia de populações (Tabela 1).

TABELA 1 - Estado de colheita, propriedades amostradas, cidade, número de amostras de DNA processadas e número final de amostras analisadas após a filtragem dos dados genotípicos

Estado	Propriedade	Município	Amostras de DNA genotipadas e avaliadas
Tocantins	T1	1-Guarai	44
	T2	2-Porto Nacional	25
	T3	3-Sucupira	14
	T4	4-Chapada	10
		Natividade	
Piauí	P1	5-Teresina	82
	P2	6-Campo Maior	20
	P3	6-Campo Maior	19
	P4	7-Palmeiras	16
	P5	8-Oeiras	19
	P7	9-Elesbão Veloso	20
	P8	6-Campo Maior	5
	P9	6-Campo Maior	11
Goiás	G1	10-Cavalcante	73
	G2	11-Monte Alegre	21
	G3	12-Planaltina	39
	G4	13-Campestre	84
	G5	14-Mimoso de Goiás	53
	G6	15-Pilar de Goiás	28
	G8	17-Pirenópolis	25
TOTAL: 3	19	17	608

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram tratados a fim de eliminar amostras com baixa qualidade de genotipagem e marcadores monomórficos, restando 608 que apresentaram mais de 50% dos loci genotipados e foram selecionadas para as análises de associação.

Os dados de genotipagem foram inseridos no *software* Structure 2.3.4²⁴ e as amostras foram agrupadas de acordo com a similaridade de genótipos multilocos. O programa fez a determinação dos indivíduos aos *clusters* de maior similaridade, determinando o valor de K, ou seja, o número de populações em que as amostras se dividiam com base em estatística Bayesiana por meio do método de Cadeias Markov de Monte Carlo (MCMC)²⁴.

Para estimar a estrutura de populações no *software* Structure, foram conduzidas corridas utilizando conjunto de parâmetros de 10.000 gerações *burn-in* seguido de 500.000 iterações MCMC. Foram assumidas uma a 22 populações ($k=1$ a $k=22$) e cinco iterações para cada valor de k , no modelo de miscigenação (*admixture*)²⁵. Com auxílio do *software* Structure Harvester²⁶ os resultados das análises de determinação de *clusters* foram processados e foi determinado o valor real de K pelo método do ΔK proposto por Evanno e colaboradores²⁷. Pela análise gráfica foi possível observar o valor de K que melhor acomodava a diversidade alélica, que corresponde ao ponto de estabilização da curva.

Os indicadores de diversidade genética foram calculados no programa Microsatellite Toolkit for Excel. Foram obtidas as frequências alélicas, o número de alelos por locus, a riqueza alélica, as heterozigotidades observada e esperada e o conteúdo de informação polimórfica²⁸. Foram estimados os desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg com o *software* Genepop 4.0.5.3²⁹, aplicando-se o método de MCMC. No programa *Populations* 1.2.28³⁰ foram construídas matrizes de distância genética utilizando metodologia de Reynolds' e Nei Da³¹ e as respectivas árvores filogenéticas³⁰. A árvore de distâncias genéticas construída pelo método *Neighbour-Joining* foi representada graficamente com o *software* Mega 7.0.26³² a fim de observar associações entre as populações. A análise fatorial de correspondência (AFC) foi realizada no programa Genetix para determinar as divergências das populações de CPD.

Com o *software* Genetix³³ foi possível calcular os coeficientes F, conhecidos como índice de fixação de Wright (F), que inclui Fis (coeficiente de endogamia/ coeficiente de deficiência de heterozigosidade), Fit (endocruzamento ou índice de fixação para a população total) e Fst (índice de fixação na subpopulação ou estimativa de diferenciação genética entre subpopulações)³⁴. Foi usado o método de Weir e Cockerham's³⁵, estimando um intervalo de confiança de 95% com 1000 *bootstraps* por loco.

A divergência genética entre as populações foi avaliada com base na Análise de Variância Molecular (AMOVA)³⁶, obtida com auxílio do *software* Arlequin versão 3.5.2.2³⁷, utilizando as distâncias genéticas F_{ST} par a par como método de cálculo das distâncias genéticas intra grupos e entre grupos.

2.4. Associação entre marcadores moleculares raciais e doenças

Os marcadores de caracterização racial foram associados com a frequência de animais soropositivos contra infecções por patógenos causadores da brucelose, leptospirose, neosporose, leucose, rinotraqueite infecciosa (IBR) e diarreia viral bovina (BVD).

Foi realizado estudo populacional adotando-se cada *cluster* genético como uma população. As frequências dos alelos foram observadas e comparadas entre grupos de indivíduos doentes (positivos) e de indivíduos sadios (negativos) utilizando-se o teste exato de Fisher. A força de associação foi medida pelo risco relativo (*odds ratio*), que indica quão frequente é uma doença em um indivíduo portador de determinado marcador.

3. Resultados

Os bovinos CPD foram atribuídos a *clusters* com o intuito de observar subpopulações dentro da raça e os resultados da primeira análise demonstraram que o agrupamento mais adequado foi $K=3$. Na análise empregada foi estimada a proporção do genoma que cada indivíduo possui das populações parentais, admitindo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Na figura 3 podem ser observados gráficos nos quais cada indivíduo corresponde a uma linha vertical dividida em k segmentos genotípicos, conforme o número de *clusters* inferidos. Cada *cluster* foi representado por uma cor e indivíduos cujo genótipo é classificado em mais de um *cluster* possuem mais de uma cor, indicando ocorrência de *admixture*.

Na figura 4 é possível observar que o melhor agrupamento foi em três grupos, ponto a partir do qual não houve diferença significativa entre os demais valores de k assumidos.

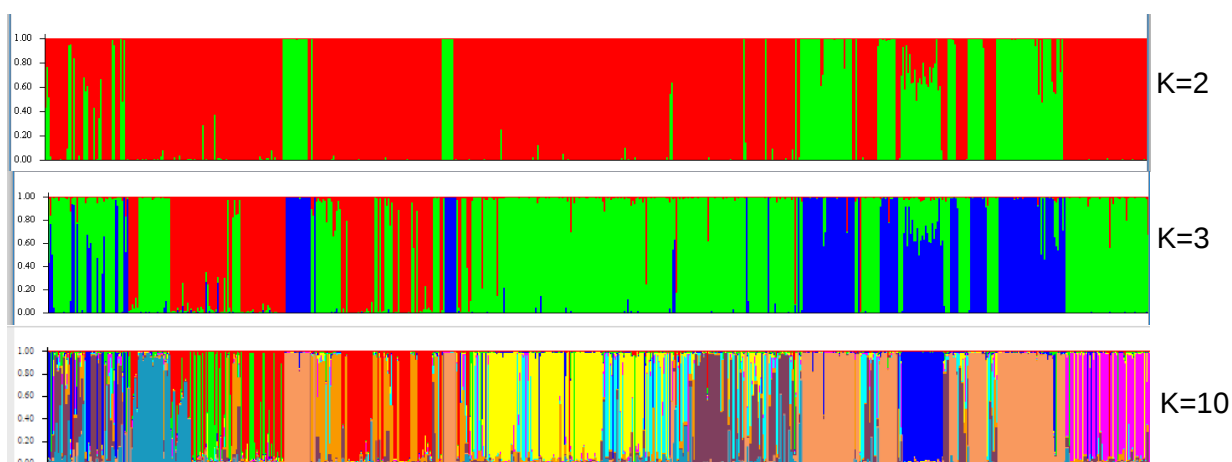


FIGURA 3 – Populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro detectadas pelo método de determinação de clusters de similaridade genética utilizando marcadores de caracterização racial

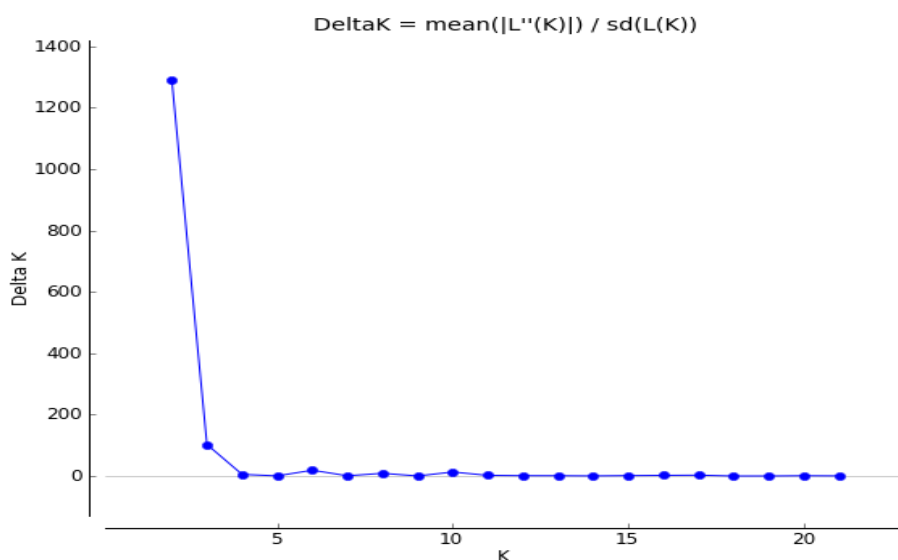


FIGURA 4 – Valores de Delta K de Evanno que indica agrupamento de populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro em três grupos ($K = 3$)

As populações e o número de indivíduos de cada população assignado aos *clusters* estão representados na Tabela 2. Populações do Piauí possuem a maior parte dos genótipos alocados no *cluster* 1, enquanto populações do Tocantins se agrupam majoritariamente no *cluster* 3.

As propriedades do estado de Goiás possuem genótipos agrupados em todos os *clusters*, indicando que não há uma clara diferenciação dos alelos presentes nos indivíduos deste estado com os demais.

TABELA 2 - Localidade dos bovinos assignados aos *clusters* 1, 2 e 3 de similaridade genética racial para a raça Curraleiro Pé-Duro

Estado	Propriedades rurais	Número de indivíduos			
		Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	
GO	G1	26,02% (19/73)	0% (0/73)	73,97% (54/73)	
	G2	71,43% (15/21)	0% (0/21)	28,57% (6/21)	
	G3	48,72% (19/39)	46,15% (18/39)	5,13% (2/39)	
	G4	20,24% (17/84)	60,71% (51/84)	19,05% (16/84)	
	G5	35,85% (19/53)	64,15% (34/53)	0% (0/53)	
	G6	32,14% (9/28)	42,86% (12/28)	25% (7/28)	
	G8	72% (18/25)	0% (0/25)	28% (7/25)	
	G9	72% (18/25)	0% (0/25)	28% (7/25)	
PI	P1	93,90% (77/82)	6,09% (5/82)	0% (0/82)	
	P2	100% (20/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	
	P3	94,74% (18/19)	5,26% (1/19)	0% (0/19)	
	P4	81,25% (13/16)	6,25% (1/16)	12,5% (2/16)	
	P5	100% (19/19)	0% (0/19)	0% (0/19)	
	P7	95% (19/20)	0% (0/20)	5% (1/20)	
	P8	100% (5/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	
	P9	95% (10/11)	0% (0/11)	9,10% (1/11)	
TO	T1	20,45% (9/44)	4,54% (2/44)	75% (33/44)	
	T2	56% (14/25)	0% (0/25)	44% (11/25)	
	T3	7,14% (1/14)	0% (0/14)	92,86% (13/14)	
	T4	0% (0/10)	0% (0/10)	100% (10/10)	
Total de indivíduos		321	124	163	

As distâncias genéticas entre as populações foram calculadas segundo Nei *et al.*, Da (1983) e foi construída a árvore filogenética utilizando método de *Neighbor-Joining* (Figura 5).

O agrupamento por distâncias genéticas apresentou pequenas diferenças em relação ao agrupamento pelo *software* Structure. Foi possível observar três agrupamentos separando as propriedades do Tocantins com as do Piauí e as propriedades de Goiás entre as propriedades dos outros estados.

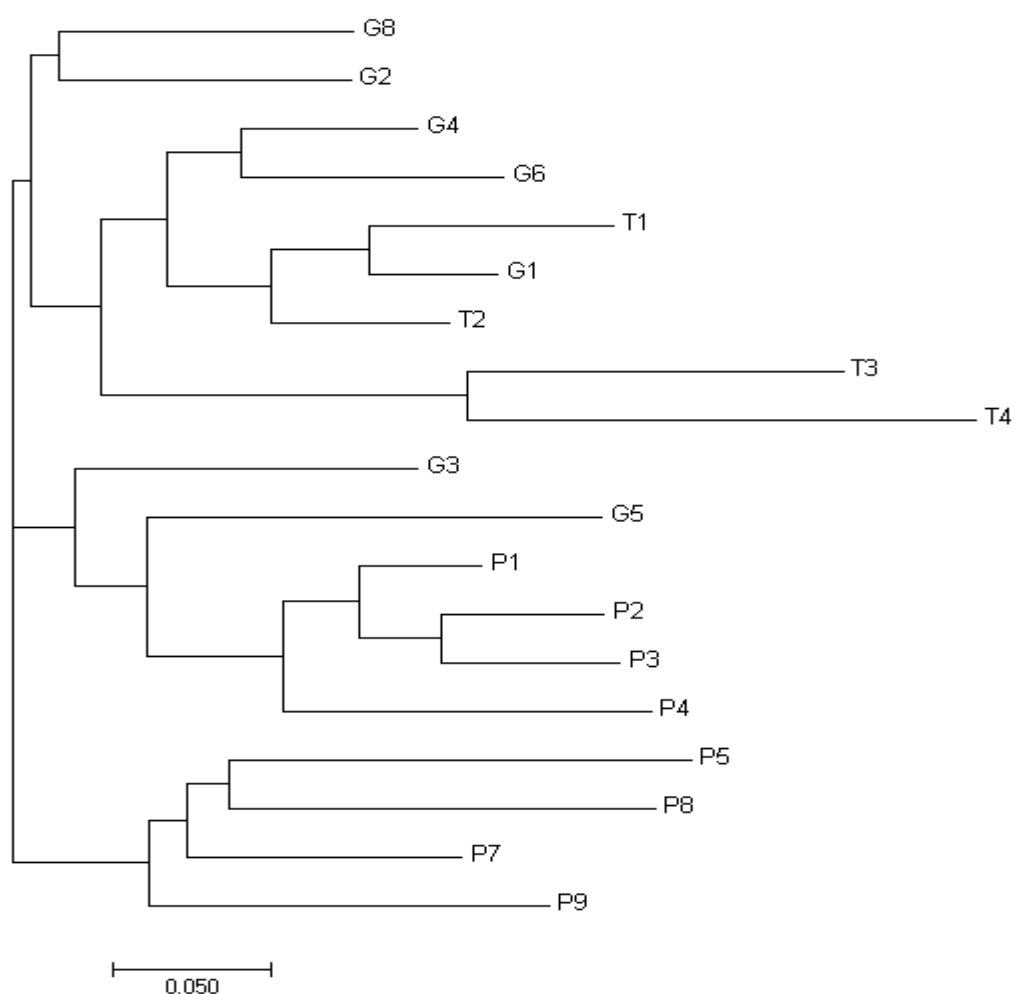


FIGURA 5 – Árvore filogenética das distâncias D_a de Nei construída pelo método *Neighbor Joining* para as propriedades de bovinos Curraleiro Pé-Duro

Os índices de diversidade genética, descritos na Tabela 3, foram mensurados pela estimativa dos níveis de heterozigosidade esperada e observada e número médio de alelos. A heterozigosidade esperada foi maior que a observada nos três *clusters*, que no entanto tiveram alta riqueza alélica.

TABELA 3 – Índices de diversidade genética entre os *clusters* de caracterização racial de bovinos Curraleiro Pé-Duro

População	AM	loci	He	Ho	NMA	SD NMA	total alelos
Cluster 1	321	28	0,7565	0,6398	10,54	3,45	295
Cluster 2	124	28	0,7315	0,5670	8,32	2,63	233
Cluster 3	163	28	0,7677	0,6330	10,82	2,48	303

AM - número de amostras; He - heterozigosidade esperada; Ho - heterozigosidade observada; NMA - número médio de alelos por loci; SD NMA - desvio padrão do número médio de alelos

Foi observada maior presença de alelos nos *clusters* raciais 2 e 3 (233 alelos em 124 amostras e 303 alelos em 163 amostras analisadas, respectivamente) que no 1 (295 alelos em 321 amostras analisadas). Os marcadores utilizados foram testados pelo EHW e todos os loci do *cluster* 3 estavam em equilíbrio ($p < 0,05$). Nos *clusters* 1 e 2 alguns marcadores estavam equilibrados, ou seja, não foi observada diminuição de heterozigotos em relação aos homozigotos nestes loci. A qualidade dos marcadores utilizados no estudo foi computada pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC)³⁸ (Tabela 4).

TABELA 4 – Heterozigosidades dos loci microssatélites para caracterização racial de bovinos Curraleiro Pé-Duro

Loci	Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3			
	EHW	Ho	He	PIC	EHW	Ho	He	PIC	EHW	Ho	He	PIC
BM1314	**	0,551	0,66	0,61	**	0,47	0,61	0,54	**	0,59	0,71	0,67
BM1818	0,062	0,72	0,719	0,67	**	0,388	0,563	0,471	**	0,635	0,719	0,685
BM1824	0,244	0,698	0,738	0,69	*	0,678	0,73	0,689	**	0,755	0,825	0,799
BM8125	0,586	0,769	0,765	0,73	**	0,804	0,744	0,706	**	0,861	0,812	0,792
CSSM66	0,773	0,79	0,83	0,8	**	0,652	0,777	0,739	**	0,727	0,855	0,838
ETH10	0,512	0,659	0,659	0,61	0,114	0,58	0,658	0,592	**	0,538	0,718	0,675
ILSTS11	**	0,581	0,612	0,54	**	0,604	0,724	0,679	**	0,57	0,786	0,75
INRA32	1	1	0,933	0,74	**	0,642	0,801	0,768	**	0,755	0,815	0,792
INRA35	**	0,369	0,473	0,41	**	0,51	0,681	0,624	**	0,287	0,65	0,602
INRA37	**	0,684	0,807	0,78	0,056	0,613	0,692	0,65	**	0,682	0,772	0,739
MM12	0,315	0,747	0,781	0,74	**	0,617	0,812	0,783	**	0,726	0,855	0,836
TGLA122	*	0,819	0,813	0,79	1	1	0,833	0,554	**	0,694	0,875	0,86
TGLA126	**	0,55	0,666	0,61	0,191	0,686	0,604	0,552	**	0,668	0,775	0,739
BM2113	**	0,575	0,881	0,86	**	0,351	0,772	0,737	**	0,5	0,784	0,761
CSRM60	**	0,689	0,723	0,69	**	0,639	0,761	0,722	**	0,702	0,822	0,798
ETH185	**	0,546	0,797	0,76	**	0,581	0,764	0,73	**	0,54	0,805	0,778
ETH225	**	0,543	0,806	0,77	**	0,405	0,821	0,792	**	0,695	0,824	0,799
ETH3	**	0,729	0,809	0,78	*	0,71	0,757	0,72	**	0,759	0,787	0,755
HAUT24	**	0,351	0,839	0,81	**	0,505	0,82	0,795	**	0,564	0,824	0,805
HAUT27	**	0,678	0,844	0,82	**	0,509	0,774	0,748	**	0,265	0,608	0,5824
HEL13	**	0,545	0,67	0,62	**	0,603	0,724	0,68	**	0,634	0,772	0,7402
HEL9	**	0,753	0,76	0,73	**	0,846	0,714	0,663	**	0,792	0,845	0,825
ILSTS6	**	0,481	0,77	0,74	**	0,453	0,794	0,762	**	0,549	0,804	0,773
INRA23	**	0,493	0,68	0,65	**	0,052	0,618	0,544	*	0,645	0,666	0,63
INRA63	**	0,671	0,67	0,61	0,066	0,333	0,866	0,671	**	0,919	0,529	0,417
SPS115	**	0,625	0,7	0,66	**	0,623	0,727	0,693	*	0,583	0,681	0,645
TGLA227	**	0,699	0,88	0,86	**	0,825	0,866	0,848	**	0,807	0,852	0,833
TGLA53	**	0,581	0,85	0,83	**	0,184	0,457	0,438	**	0,267	0,706	0,676

EHW – equilíbrio de Hardy-Weinberg. *Marcador em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$); Ho - heterozigosidade observada, He - heterozigosidade esperada; PIC – conteúdo de informação polimórfica

Valores de PIC acima de 0,5 são considerados muito informativos, de 0,25 a 0,5 medianamente informativos e abaixo de 0,25 pouco informativos³⁴. Todos os marcadores microsatélites avaliados foram altamente polimórficos e altamente informativos por apresentarem valores de PIC acima de 0,5, com poucos marcadores apresentando PIC acima de 0,4. Embora altamente informativos, a heterozigosidade observada foi inferior à esperada na maioria dos loci, sugerindo homozigotia aumentada.

Os coeficientes de endogamia, representados por Fis, Fit e Fst, foram calculados por marcador e por *cluster* e podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5 – Resultados de análises estatísticas F por *clusters* filogenéticos e por loci nas populações de bovinos Curraleiro Pé-Duro

Marcador	Cluster 1			Cluster 2			Cluster 3			Fis por marcador
	Fis	Fit	Fst	Fis	Fit	Fst	Fis	Fit	Fst	
BM1314	0,1927	0,2545	0,0766	0,1763	0,267	0,1101	0,1867	0,2092	0,0277	0,1608
BM1818	0,1478	0,2128	0,0762	0,0369	0,1405	0,1076	0,0247	0,0688	0,0452	0,1653
BM1824	0,0798	0,1132	0,0363	0,0652	0,0957	0,0327	0,0588	0,0806	0,0232	0,1651
BM2113	0,4081	0,4292	0,0355	0,3526	0,4059	0,0823	0,3723	0,4344	0,0989	0,1528
BM8125	-0,068	0,0258	0,0886	-0,032	0,0639	0,093	-0,035	-0,022	0,0133	0,1694
CSRM60	0,1523	0,2666	0,1348	0,0825	0,2072	0,1359	0,0792	0,102	0,0248	0,1639
CSSM66	0,1538	0,2697	0,1369	0,1044	0,1946	0,1007	0,0906	0,215	0,1367	0,1634
ETH10	0,2088	0,4085	0,2524	0,0872	0,3176	0,2525	0,024	0,0527	0,0294	0,1639
ETH185	0,2928	0,3974	0,1479	0,3202	0,4131	0,1367	0,2951	0,299	0,0055	0,1559
ETH225	0,2996	0,3741	0,1064	0,2632	0,336	0,0988	0,3792	0,384	0,0077	0,1554
ETH3	0,0467	0,076	0,0307	0,0782	0,088	0,0106	0,0891	0,1131	0,0264	0,1649
HAUT24	0,3446	0,4159	0,1088	0,474	0,5369	0,1196	0,5181	0,5716	0,111	0,1495
HAUT27	0,4509	0,5891	0,2517	0,3085	0,4217	0,1637	0,2429	0,3031	0,0795	0,1557
HEL13	0,1737	0,2809	0,1297	0,1827	0,3338	0,185	0,1784	0,1919	0,0165	0,1609
HEL9	-0,029	0,1061	0,1319	0,0358	0,1263	0,0939	-0,035	-0,011	0,0229	0,1679
ILSTS11	0,2338	0,3098	0,0992	0,1275	0,285	0,1805	0,0746	0,1206	0,0497	0,1624
ILSTS6	0,3512	0,4065	0,0853	0,344	0,4132	0,1054	0,4005	0,4321	0,0527	0,1537
INRA23	0,1234	0,4087	0,3255	0,1169	0,3801	0,2981	0,3941	0,4662	0,119	0,1612
INRA32	0,1272	0,1551	0,032	0,0688	0,0427	-0,027	0,1896	0,1406	-0,06	0,163
INRA35	0,4324	0,5632	0,2304	0,3519	0,5464	0,3001	0,2304	0,4219	0,2488	0,1569
INRA37	0,1161	0,1499	0,0382	0,1394	0,152	0,0146	0,1411	0,1636	0,0262	0,1626
INRA63	-0,704	-0,019	0,402	-0,461	0,1135	0,3936	0,0356	0,1509	0,1195	0,1786
MM12	0,1884	0,2997	0,1372	0,0827	0,1527	0,0764	0,0993	0,2599	0,1783	0,1634
SPS115	0,1441	0,3565	0,2481	0,1212	0,3498	0,2601	0,1205	0,1291	0,0098	0,1628
TGLA122	0,2031	0,2482	0,0566	0,0681	0,1626	0,1014	-0,009	0,1007	0,1087	0,1654
TGLA126	0,0328	0,1624	0,134	0,1618	0,2523	0,108	0,0962	0,1521	0,0618	0,1633
TGLA227	0,051	0,1135	0,0659	0,1525	0,2117	0,0699	0,1603	0,1682	0,0095	0,1629
TGLA53	0,6133	0,7663	0,3957	0,4127	0,5263	0,1935	0,3805	0,557	0,2848	0,1516

Os resultados obtidos indicaram valores semelhantes entre os *clusters* porém diferentes para cada marcador. O Fis (índice de fixação dentro de população) por marcador, considerando todos os animais independentemente de *clusters*, foi semelhante para todos os loci. Valores de Fis variaram entre -0,70401 (INRA63) e 0,6136 (TGLA53) no *cluster* 1, entre -0,46182 (INRA63) e 0,47398 (HAUT24) no *cluster* 2, entre -0,03575 (BM8125) e 0,51811 (HAUT24) no *cluster* 3. Os valores negativos de Fis em alguns locus indicam que a heterozigosidade observada foi maior que a esperada, não havendo nestes redução de heterozigotos em relação aos homozigotos.

Os valores de Fst variaram entre 0,03073 (ETH3) e 0,402 (INRA63) no *cluster* 1, entre -0,02799 (INRA32) e 0,39359 (INRA63) no *cluster* 2, entre -0,06055 (INRA32) e 0,28483 (TGLA53) no *cluster* 3, indicando níveis variados de diferenciação, desde marcadores com pouca diferenciação genética ($F_{st} < 0,05$) a marcadores com elevada diferenciação ($F_{st} > 0,25$). Os níveis de Fst próximos de zero indicam menor diferenciação genética. Nenhum loci se aproximou do valor um de Fst, o maior nível de diferenciação entre populações³⁹.

A análise fatorial de correspondência (Figura 6A) representou graficamente três grupos genéticos. A mesma análise foi feita considerando a separação por estado para observar como os *clusters* são formados (Figura 6B). O *cluster* 1 foi composto por rebanhos dos estados do Piauí, o *cluster* 2 por rebanhos de Goiás enquanto no *cluster* 3 reuniu rebanhos do Tocantins e de Goiás.

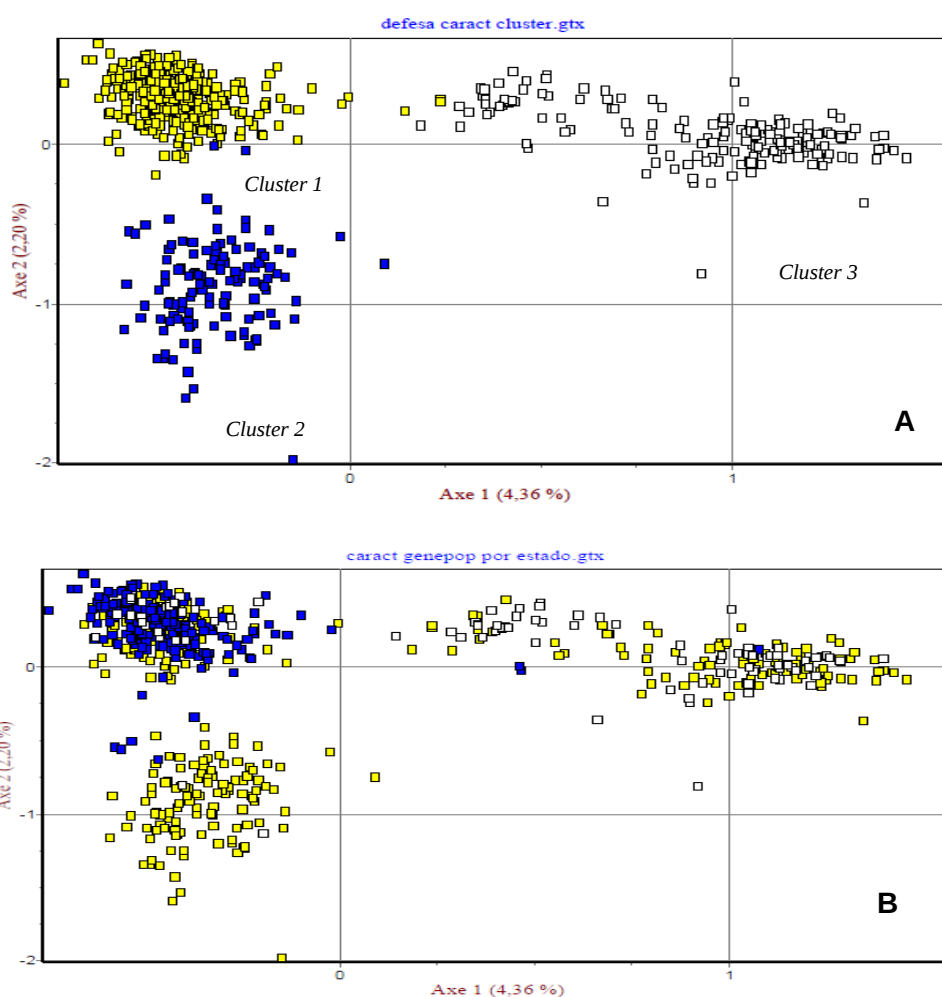


FIGURA 6 – Representação gráfica da análise fatorial de correspondência de bovinos Curraleiro Pé-Duro. A. Representação por *clusters* de similaridade genética (em amarelo *cluster* 1, em azul *cluster* 2 e em branco *cluster* 3). B. Representação por estado (em amarelo Goiás, em azul Piauí e em branco Tocantins)

As frequências das infecções nos três *clusters* genéticos foram comparadas com as frequências de doenças em *clusters* definidos por características ambientais, segundo pesquisa que utilizou as mesmas amostras⁴⁰. Na análise de qui-quadrado para observar associação entre os *clusters* genéticos e ambientais, foi observada diferença significativa ($p < 2.2e-16$) tendo-se encontrado 53,45% (325/608) concordantes. Foi percebido que as propriedades agrupadas segundo características ambientais se agrupam também conforme as características genéticas (Tabela 6).

TABELA 6 – Distribuição de frequências de soropositivos contra infecções segundo a classificação por *clusters* genéticos e ambientais

<i>Clusters</i>	BRU	LPT	NEO	LEU	IBR	BVD	n
<i>cluster1_genetico</i>	0,31% (1/321)	41,32% (131/317)	48,12% (154/320)	18,29% (58/317)	64,58% (206/319)	44,97% (143/318)	321
<i>cluster2_genetico</i>	2,41% (3/124)	45,08% (55/122)	39,34% (48/122)	9,84% (12/122)	66,67% (82/123)	42,5% (51/130)	124
<i>cluster3_genetico</i>	0% (0/163)	57,80% (85/161)	20% (32/160)	24,84% (39/157)	68,94% (111/161)	41,83% (64/153)	163
<i>cluster1_ambiente</i>	0% (0/285)	43,3% (123/284)	44,9% (128/285)	23,9% (68/284)	68,1% (194/285)	49,1% (140/285)	285
<i>cluster2_ambiente</i>	1,35% (1/74)	28,8% (21/73)	52,7% (39/74)	0,04% (3/73)	49,3% (36/73)	20,5% (15/73)	74
<i>cluster3_ambiente</i>	1,2% (3/249)	52,3% (127/243)	27,6% (67/243)	15,9% (38/239)	69,0% (169/245)	44,2% (103/233)	249

BRU: brucelose, LPT: leptospirose, NEO: neosporose, LEU: leucose, IBR: rinotraqueite infecciosa bovina, BVD: diarreia viral bovina, n: número de animais

Houve diferença significativa ($p < 0,001$, Kappa=0,247) entre os *clusters* genético e ambiental, com 53,45% das amostras em acordo (agrupadas no *cluster* 1, 2 ou 3 genético e ambiental). As porcentagens de indivíduos alocados em cada *cluster* nos grupos positivo, negativo e suspeita para cada infecção foram tabuladas (Tabela 7) considerando-se apenas os *clusters* genéticos.

TABELA 7 – Prevalência de anticorpos contra micro-organismos causadores de brucelose, leptospirose, neosporose, leucose, rinotraqueite e diarreia viral em bovinos Curraleiro Pé-Duro por *clusters* genéticos

Infecção	Resultado	<i>cluster 1</i>	<i>cluster 2</i>	<i>cluster 3</i>	P (Fisher)
BRU	positivo	0,31% (1/321)	2,42% (3/124)	0,0% (0/163)	0,0489
	negativo	99,68% (320/321)	97,58% (121/124)	100% (163/163)	
LPT	positivo	41,32% (131/317)	45,08% (55/122)	52,80% (85/161)	Ns
	negativo	58,67% (186/317)	54,92% (67/122)	47,20% (76/161)	
NEO	positivo	48,13% (154/320)	39,34% (48/122)	20,0% (32/160)	<0,001
	negativo	51,87% (166/320)	60,66% (74/122)	80,0% (128/160)	
LEU	positivo	18,30% (58/317)	9,84% (12/122)	24,84% (39/157)	0,00728
	negativo	81,39% (258/317)	90,16% (110/122)	75,16% (118/157)	
	suspeita	0,31% (1/317)	0,0% (0/122)	0,0% (0/157)	
IBR	positivo	64,58% (206/319)	66,67% (82/123)	68,94% (111/161)	Ns
	negativo	33,54% (107/319)	32,52% (40/123)	26,71% (43/161)	
	suspeita	1,88% (6/319)	0,81% (1/123)	4,35% (7/161)	
BVD	positivo	44,97% (143/318)	42,50% (51/120)	41,83% (64/153)	Ns
	negativo	49,37% (154/318)	50,00% (60/120)	48,36% (74/153)	
	suspeita	6,60% (21/318)	7,50% (9/120)	9,80% (15/153)	

BRU: *Brucella abortus*; LPT: *Leptospira* sp.; NEO: *Neospora caninum*; LEU: leucose enzoótica bovina; IBR: rinotraqueite infecciosa bovina; BVD: diarreia viral bovina; ns: não significativo ($p > 0,05$).

O *cluster* 1 agrupou o menor número de animais positivos contra *Leptospira* e vírus da IBR. O *cluster* 3 apresentou menor frequência de positivos contra a brucelose e neosporose e o *cluster* 2 menor frequência para leucose bovina. As prevalências por *cluster* foram semelhantes para todas as infecções.

A AMOVA considerou três grupos referentes aos estados de GO, PI e TO para estimar a quantidade da diversidade total devida à variação entre os estados e dentro de um mesmo estado (Tabela 8). A AMOVA forneceu estimativa global de Fit de 0,24491 ($P < 0,00001$, com 20.000 permutações), que significa que a variação total que se encontra entre as populações é de 24,49%. Desta, 5,91% correspondem à variação entre estados e 18,57% à variação entre populações de um mesmo estado.

TABELA 8 – Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de Curraleiro Pé-Duro de três estados brasileiros baseado em dados de microssatélites

Fonte de variação	Soma de quadrados	Componentes de variância	Variação (%)
Entre estados	360,02	0,69	5,92
Entre populações/ dentro dos estados	6233,39	2,16	18,57
Dentro de populações	4187,00	8,80	75,51
Total	10780,42	11,65	-

Os 19 rebanhos foram testados como grupos independentes pelo teste de AMOVA. A AMOVA indicou que 24,72% da variação total (Fit) foi entre rebanhos e 75,51% dentro de indivíduos. A variação entre os rebanhos foi menor que a variação entre indivíduos de um mesmo rebanho (Tabela 9).

TABELA 9 - Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de Curraleiro Pé-Duro de dezenove rebanhos baseado em dados de microssatélites

Fonte de variação	Soma de quadrados	Componentes de variância	Variação (%)
Entre grupos	1030,41	0,90	9,56
Entre indivíduos/ dentro dos grupos	4898,08	1,43	15,16
Dentro de indivíduos	3717,50	7,09	75,28
Total	9645,99	9,42	-

4. Discussão

A diferenciação da mesma raça em três *clusters* pode ser explicada pelo papel do ambiente na seleção. A separação física das populações de Goiás, Tocantins e Piauí ocasionou isolamento reprodutivo e a adaptação às condições ambientais locais pode ter exercido efeito sobre o surgimento de novos fenótipos⁸. Os *clusters* genéticos se assemelharam aos *clusters* definidos por características ambientais⁴⁰, corroborando a associação do genótipo e do ambiente na formação do fenótipo, que neste caso foi expresso pela ocorrência de anticorpos contra as enfermidades.

A heterozigosidade esperada foi superior à observada exceto para os loci BM8125 e INRA63 (*cluster* 1), sendo possível indicar aumento de acasalamentos consanguíneos e redução da variabilidade genética. A perda de diversidade em características raciais pode indicar também diminuição da performance dos indivíduos devido ao fenômeno de depressão endogâmica, no qual aumenta-se a frequência de genes com efeito negativo sobre características produtivas⁴¹.

Todos os loci foram polimórficos, com um total de 295 alelos no *cluster* 1, 233 alelos no *cluster* 2 e 303 alelos no *cluster* 3. Foram observados números médios de 10,54, 8,32 e 10,82 alelos por locus nos *clusters* 1, 2 e 3, respectivamente, valor inferior à média de 13 alelos por loci descritos na raça. Embora polimórficos, os loci estavam em desequilíbrio de HW, concordando com outro estudo da raça em que foi observado desvios em nove de dez loci analisados⁴².

O aumento do número de homozigotos, observado pelo desvio no EHW, pode ser explicado pelo alto nível de consanguinidade devido ao pequeno número efetivo de animais em idade reprodutiva e acasalamentos entre indivíduos aparentados. Outros fatores que também podem explicar o desvio no EHW são as subdivisões dentro da população, seleção natural, migração e alelos nulos²³.

Os valores de F_{st} foram menores que 0,15, indicando que as duas subpopulações compartilham alelos e, portanto, a diferenciação genética é de baixa a moderada. Pelo isolamento geográfico das populações dos estados do Piauí, Tocantins e Goiás, seria esperada maior diferenciação entre as populações dos estados e aumento do grau de endogamia dentro de cada estado, visto que as populações não se acasalam ao acaso^{34, 43}. Porém, estima-se que a troca de touros entre as propriedades para diminuir o efeito da endogamia faz com que as diferentes propriedades compartilhem alelos, reduzindo a diferenciação entre propriedades. A

troca ou compra de animais da raça é limitada pelo número de criatórios e a reposição do rebanho está condicionada à disponibilidade de reprodutores entre as propriedades estudadas.

O Fis variou entre 0,16441 (TGLA53) e 0,19427 (INRA63) e o Fit entre 0,27191 (TGLA53) e 0,29383 (BM8125). Os valores de Fis indicam pouca variabilidade. A perda de variabilidade genética em rebanhos de CPD foi relatada em consequência da consanguinidade devido a reposição de reprodutores com animais do próprio rebanho. A raça apresentou maiores índices F quando comparada a outras raças autóctones brasileiras^{44, 45}.

O número de animais positivos foi inferior ao de animais negativos, exceto para a infecção pelo vírus da IBR, em todos os *clusters*, e para a infecção por *Leptospira*, no *cluster* 3. A alta taxa de soropositivos para as infecções virais em CPD foi relatada por Juliano⁴⁶ e Amaral⁴⁷, concluindo que os vírus estão presentes de forma endêmica nas populações avaliadas⁴⁷.

É possível inferir que mudanças ambientais passadas tenham desencadeado eventos de diversificação fenotípica que fixaram ou eliminaram alelos⁸ em populações de diferentes regiões geográficas, influenciadas pela distância física, fazendo com que os três *clusters* genéticos expressem diferentes fenótipos de suscetibilidade/resistência a doenças.

Nos Curraleiros, os alelos mais vantajosos à adaptação às condições ambientais do Piauí e do Tocantins tiveram a frequência aumentada em cada ambiente e foram fixados nas populações, subdividindo a raça em três populações distintas. Nos resultados da AMOVA foi possível observar que a maior parte da variância genética total deveu-se à diferença entre alelos dentro de indivíduos (75,28%), resultados semelhantes aos descritos para a raça local brasileira Crioulo Lageano^{48, 49}.

Os rebanhos de CPD são divididos de forma semelhante em *clusters* de caracterização racial e em *clusters* geográficos devido ao isolamento dos rebanhos. Porém, como a variação de genótipos foi maior entre os indivíduos de um mesmo grupo que entre rebanhos ou estados, é possível encontrar indivíduos de uma mesma propriedade agrupados em diferentes *clusters*.

5. Conclusão

As dezenove propriedades de Curraleiro Pé-Duro se diferenciam em três *clusters* genéticos, sendo que os animais do Tocantins se distinguem geneticamente dos animais do Piauí. Os animais de Goiás possuem características raciais de todos os *clusters*.

Nos três grupos genéticos há diversidade e alto número de alelos, todavia o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de endogamia apontam a ocorrência de acasalamentos endogâmicos resultando em risco à população. As diferenças na detecção de anticorpos foi significativa para *Brucella* spp., *Neospora caninum* e VLB entre os *clusters*. A maior variação dos genótipos relacionados ao gene BoLA ocorre a nível de indivíduos, que possuem elevado número de alelos que conferem ao Curraleiro Pé-Duro fenótipos variados.

Conclui-se que as populações estejam em processo de diferenciação genética. Porém, essa diferenciação, melhor vista nos rebanhos do Piauí, não foi suficiente para indicar uma subpopulação genética com fenótipo de maior resistência ou suscetibilidade às infecções.

Referências

1. FAO. Molecular Genetic Characterization of Animal Genetic Resources. Animal Production and Health Guidelines. 2011. 100 p.
2. Fioravanti MCS, Sereno JRB, Neiva ACGR, Abud LJ, Lôbo JR, DiFrancescatônio D, et al. Reintrodução do gado Curraleiro na comunidade quilombola Kalunga de Cavalcante, Goiás, Brasil: Resultados parciais. II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais. 2008.
3. Mariante AS, Egito AA. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. Theriogenology. 2002;57(1):223-35.
4. Abreu GP, Sereno JRB, Lara MAC. Evaluación zootécnica del núcleo de conservación in situ del bovino Pantaneiro en el Pantanal Brasileño. Arch zootec. 2000;49(185-186):27-30.
5. Juliano RS, Fioravanti MCS, Sereno JRB, de Abreu UGP, Jayme VS, Silva AC, et al. Aspectos sanitários dos núcleos de conservação in situ de bovinos Pantaneiros. Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 103. 2011.
6. Albuquerque MSM, Egito AA, Mariante AS. Programa Brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. Arch Zootec. 2002;51(193):7.
7. Egito AA, Lara MAC, Albuquerque MSM, Martinez AM, Landi V, Juliano RS, et al. Estrutura populacional e diversidade genética de raças bovinas brasileiras localmente adaptadas. AICA. 2014;4:16-8.
8. Lofeu L, Kohlsdorf T. Mais que seleção: o papel do ambiente na origem e evolução da diversidade fenotípica. Genética na Escola. 2015;10(1).

9. Egito AA, Martínez Martínez A, Juliano RS, Landi V, Moura MI, Silva MC, et al. Estudo populacional de rebanhos de bovinos Pantaneiros visando a gestão e o manejo genético da raça. AICA. 2016;7:59-63.
10. Egito AA, Paiva SR, Albuquerque MSM, Mariante AS, Almeida LD, Castro SR, et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. BMC Genetics. 2007;8(1):83.
11. Manel S, Holderegger R. Ten years of landscape genetics. Trends Ecol Evol. 2013;28(10):614-21.
12. Mariante AdS, Albuquerque MdSM, Egito AA, McManus C, Lopes MA, Paiva SR. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. Livestock Science. 2009;120(3):204-12.
13. Egito A, A., Mariante AS, Albuquerque MSM. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. Arch Zootec. 2002;51(193):39-52.
14. McManus C, Canozzi ME, Bracellos J, Paiva SR. Pecuária e mudanças climáticas. Revista UFG. 2012;Ano XIII(13).
15. FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture– in brief. Rome, 2007. 39 p.
16. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose animal-PNCEBT. Brasília 2006.
17. OIE. Chapter 2.1.12 Leptospirosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2014. p. 1-15.
18. OIE. Enzootic bovine leukosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018.
19. OIE. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017.
20. OIE. Bovine viral diarrhoea. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015.
21. Alvarez-García G, Pereira-Bueno J, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Pattern of recognition of Neospora caninum tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. Vet Parasitol. 2002;107(1-2):15-27.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 1988;16(3):1215.
23. Quiroz J. Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas. [Thesis]. Universidad de Córdoba. 2007:155.
24. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000;155(2):945-59.

25. Haikukutu L. Genetic diversity of the bovine leukocyte antigen (BoLA) and its association with resistance to ticks and tick-borne diseases in selected beef cattle breeds in Namibia. 2018.
26. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4:359-61.
27. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14(8):2611-20.
28. Park SDE. The Excel microsatellite toolkit (version 3.1). In: Laboratory AG, editor. Dublin, Ireland: University College; 2001.
29. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995;86:248–9.
30. Langella O. Populations. 1999.
31. Nei M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol*. 1983;19(2):153-70.
32. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
33. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufast N, Bonhomme F. Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Montpellier, France. 2003.
34. McManus C, Paiva S, Corrêa PS, Seixas L, Melo CB. Estatísticas para descrever genética de populações. In: Embrapa, editor. 2011.
35. Weir BS, Cockerham CC. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution*. 1984;38(6):1358-70.
36. Excoffier L, Smouse P, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial – DNA restriction data. *Genetics*. 1992;13: 479-91.
37. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10:564-7.
38. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980;32(3):314.
39. Yeh FC. Population genetics. In: A. Y, Boshier D, Boyle T, editors. *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing & CABI Publishing; 2000. p. 21-37.
40. Lobo JR. Geografia de Paisagem e perfil sanitário de bovinos Curraleiro Pé-Duro criados nos biomas Cerrado e Caatinga. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2018.

41. Dario C, Bufano G. Efeito da endogamia sobre a produção de leite na raça ovina Altamurana. *Arch Zootec.* 2003;52:401-4.
42. Oliveira APF. Caracterização genética de uma população do gado crioulo Pé-duro do Piauí, através de marcadores microssatélites. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2008.
43. Joel Augusto M, Gabriela Quandt C, Ricardo Luis R, Ruben Delly V. Comparison among inbreeding coefficient estimation methods in a diploid population with two alleles. *Ciênc Agrotec.* 2010;34(1):43-54.
44. Egito AA. Diversidade genética, ancestrabilidade individual e miscigenação das raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para conservação. [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
45. Fioravanti MCS, Juliano RS, Costa GL, Abud LJ, Cardoso VS, Carpio MG, et al. Conservación del bovino Curraleiro: Cuantificación del censo y caracterización de los criadores. *Anim Genet Resour.* 2011;48:109-16.
46. Juliano RS. Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2006.
47. Amaral HRD. Frequência de anticorpos para BVDV, BoHV-1 e BLV em gado Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro no Brasil. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013
48. Carvalho GMC, Lima Neto AF, Azevedo D, do Nascimento HTS, Mariante AdS, Paiva SR, et al., editors. Estrutura genética de raças bovinas locais e exóticas criadas no Brasil e nos Estados Unidos: In: Congresso Brasileiro De Recursos Genéticos, 2., 2012, Belém, PA. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.
49. Spritze A, Egito AA, Mariante AS, McManus C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesq Agropec Bras.* 2003;38(10):1157-64.

CAPÍTULO 3 - MICROSATELLITES POLYMORPHISM OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX AND SEROLOGICAL PROFILE IN LOCAL BRAZILIAN CATTLE CURRALEIRO PÉ-DURO

Abstract

Microsatellites designed for regions of bovine lymphocyte antigen (BoLA) genes are used to understand the variability of immune responsiveness between individuals and populations against pathogens. The objective of this study is to characterize polymorphisms in 13 microsatellites present in genes of immune response and associate to *Brucella abortus*, *Leptospira* sp., *Neospora caninum*, leukosis, rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea infections in the Brazilian local cattle breed Curraleiro Pé-Duro. Genotypes of 812 animals of both sex and various ages, using microsatellite markers were analyzed by Fisher test and linear regression model to associate infections with alleles of BoLA gene and natural resistance-associated macrophage protein 1 (SLC11A1) gene. All microsatellites exhibited moderate to high levels of polymorphism. The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.2803 to 0.8742 and the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.4103 to 0.8317. Allele RM185*88 were present in all leukosis positive, RM185*90 in all neosporosis positive and leukosis negative, LA54*155 in all IBR positive and 312*295 in neosporosis negative animals. The result showed that 415*457, 1778*243, 312*292, 1687*223 and others alleles are likely to play an important role in the host immune response. No significance to environmental factors was observed on regression model.

Keywords: Bovine lymphocyte antigen, Curraleiro Pé-Duro, genetic resistance

POLIMORFISMOS DE MICROSATÉLITES NO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E PERFIL SOROLÓGICO NA RAÇA BOVINA BRASILEIRA CURRALEIRO PÉ-DURO

Resumo

Marcadores microssatélites relacionados a genes do antígeno linfocitário bovino (BoLA) auxiliam a compreensão da resposta imune entre indivíduos e populações. O objetivo deste estudo foi caracterizar polimorfismos em 13 microssatélites presentes em genes relacionados à ativação da resposta imune e testar a associação com *Brucella abortus*, *Leptospira* sp., *Neospora caninum* e com os vírus causadores da leucose, rinotraqueite infecciosa e diarreia viral bovina na raça bovina brasileira Curraleiro Pé-Duro. Os genótipos de 812 animais de ambos sexos e várias idades foram obtidos pela análise de microssatélites e foram relacionados por teste de Fisher e regressão linear às infecções que culminam na ativação de genes do complexo BoLA e da proteína natural associada a macrófago (SLC11A1). Todos os microssatélites apresentaram níveis moderados de polimorfismos, com heterozigosidade esperada (H_e) variando entre 0,2803 e 0,8742 e heterozigosidade observada variando entre 0,4103 e 0,8317. O alelo RM185*88 estava presente em todos os animais soropositivos contra o vírus da leucose (seis animais), RM185*90 em todos os soropositivos contra *Neospora caninum* e negativos contra leucose(16), LA54*155 em todos os positivos para IBR(5) e 312*295 em animais não reagentes à *N. caninum* (quatro). Foram encontrados 415*457, 1778*243, 312*292, 1687*223 e outros alelos associados a uma função importante na resposta imune do hospedeiro. Não se observou significância em relação a fatores ambientais no modelo de regressão.

Palavras-chave: Antígeno leucocitário bovino, Curraleiro Pé-Duro, resistência genética

1. Introduction

The host can develop mechanisms of resistance or tolerance to infectious diseases and ticks infestation to survive the infection. The mechanisms of resistance to diseases have different pathological and epidemiological effects than the mechanisms of the ability to tolerate infections. Host defense capacity is determined by resistance or tolerance. Resistance is the self defensive capacity to limit the pathogen burden and tolerance is the ability to regulate the immune response to limit the health impact of the infection¹. The resilience also can be studied when all animals present in an environment are infected but develop different performances².

One of the components of bovine immune system is the major histocompatibility complex (MHC), which in cattle is called bovine leukocyte antigen (BoLA), and is considered a complex with many genes that stimulates the response to intracellular and extracellular infections. The polymorphisms at BoLA gene are characterized by a large number of alleles that provide resistance or susceptibility to diseases by the diversity of the T-lymphocyte receptors³.

A resistance phenotype is costly and logistically difficult to measure. Thus, genomic studies are used to simplify the identification of resistant animals according to DNA-base selection, looking for quantitative trait loci (QTLs) or single nucleotide polymorphisms SNPs involved in the most efficient immune response².

The animal resistance is the ability of the host to be infected and control, in different ways, the pathogen life cycle inside the body^{2, 4}. Genomic studies are focused on the mechanisms of resistance when the disease has prevalence less than one, and on resilience, when all animals are infected⁵.

In order to define resistant animals from serological tests, it is important to know that is not possible to distinguish between uninfected animals those who animals have never been exposed to a pathogen from those who are truly resistant. The requirement for select resistant animals is to measure and to define resistance phenotypes².

Animal resistance is related to the infectious doses. Low infectious doses causes low mortality and low expression of the resistance. Besides natural infection can provide great data of resistance genetic variation, cases of incomplete exposure to pathogen, problems on diagnosis, and environmental interference can reduce heritability and the capacity to associate the disease with DNA polymorphisms, causing a decrease in the capacity to estimate the genetic effects².

Curraleiro Pé Duro (CPD) is a local cattle breed living in Brazilian savana and semi-arid regions, under high temperatures and lengthy drought⁶. The breed is popularly known by their traits of rusticity and resistance to plant intoxication⁷ and diseases. Some studies have shown that the resistance to infections is intrinsically related to CPD breed. CPD cattle has better immune responsiveness to *Mycobacterium bovis* challenge of BCG vaccine and lymphocyte profile, when comparing with Nelore breed, demonstrating their resistance to combat intracellular pathogens⁸⁻¹¹.

The phagocytosis index in ruminants could be a parameter for the capability of an animal to defend itself against external injury and several infections¹². CPD breed has shown good neutrophils phagocytic index and produce more oxygen radicals than other crossbred cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*)¹³.

The MHC genomic region are located at BTA 23 and containing nearly 154 genes within BoLA regions associated with variable responses to diseases¹⁴. The MHC is a component of the immune system and the molecules are classified in class I, class II and class III, with different genes and functions. Within class I there are 60 genes, class IIa and class IIb have 38 genes, and class III 56 genes^{15, 16}. The class II is subdivided in class IIa sub-region (with DR and DQ genes) and class IIb sub-region¹⁷. MHC is responsible to present extracellular antigens to T cells (CD4+ T lymphocytes), influencing cattle immune response¹⁸.

The BoLA complex represents a genomic target for management to improve animal health¹⁸. The BoLA is associated with natural resistance or susceptibility of the animals to infectious diseases¹⁹, vaccine response and immunological traits. In cattle, BoLA-DRB3 gene influence the epitope specificity of T cells to antigens¹⁷.

Many genomic regions can be studied to demonstrate the potential association between allelic expression and diseases resistance in cattle. The use of molecular markers improve the detection of alleles and candidate genes for susceptibility or resistance to diseases. Polymorphic markers in regions of the BoLA complex can be identified and characterized to obtain the patterns of genetic variation. The alleles and haplotypes may vary across cattle populations, living under various selection pressures¹⁵.

Alleles of the bovine MHC class II BoLA-DRB3.2 are correlated with immune system, like CD4 and CD8 cells. Variant alleles influence the immune response to diseases like bovine leukemia virus (BLV) infection profiles¹⁹.

Other gene related to bovine immune response is solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1). Bovine SLC11A1 gene is located on chromosome *Bos taurus* autosome two (BTA2) and the product of this gene is a protein with transmembrane domain and a

phosphorylation site which contribute to bactericide activity of macrophages^{20, 21}. The gene has important role in innate and adaptative immunity, preventing the transport of Fe^{2+} and Mn^{2+} by membrane of macrophages and provision of these cations for intracellular pathogens metabolism²².

SLC11A1 gene is a candidate locus for natural resistance to *Brucella abortus*²³, tuberculosis²⁴ and paratuberculosis²⁵ infections. Phagocytosis and replication of *B. abortus* inside macrophages has been linked to microsatellite in the 3'UTR of SLC11A1 gene^{21, 26}.

BoLA class II genes are very polymorphic, but allele frequency varies between breeds. In general, local cattle managed under poor conditions of food and sanity, well-adapted to environment, exhibit a high degree of resistance to tropical disease as a result of many years of natural selection¹⁷.

The conservation and characterization of Curraleiro Pé-Duro breed are the objectives of Pró Centro-Oeste and Rede Conbiand, Brazilian and international networks, respectively, for conservation and sustainable use of genetic resources. This study is linked to both investigation networks.

Microsatellites markers within the BoLA complex may play a role in host resistance to viral, bacterial and parasitic infection in bovine. The aim of this study was to investigate the alleles of microsatellites markers within the BoLA complex associated to host resistance to viral, bacterial and parasitic infection in bovine. Associating analysis with the serological phenotype were carried out in order to estimate the genetic of disease resistance of the local brazilian cattle breed Curraleiro Pé-Duro.

2. Material and methods

2.1. Sampling

A total of 1,028 blood and serum samples were obtained from animals of both sexes with different ages, collected in 2011 from 20 herds located on several districts of Goiás, Piauí and Tocantins, Brazil (Figure 1 and Table 1). The samples belong to the Pró Centro-Oeste Network for characterization and conservation of bovine Brazilian genetic resources.

Total genomic DNA was obtained from frozen whole blood using the *salting out* extraction method described by Miller²⁷. DNA was isolated at the Federal University of Goiás, Genetics and Biodiversity Laboratory. DNA samples were quantified in NanoDrop

spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA) and all samples were diluted to 20 ng/ μ L to be used in PCR reactions. The samples and controls were genotyped in GeneMapper software. Samples with poor quality DNA and samples with low call rates were discarded resulting in a final data set containing 812 individuals.

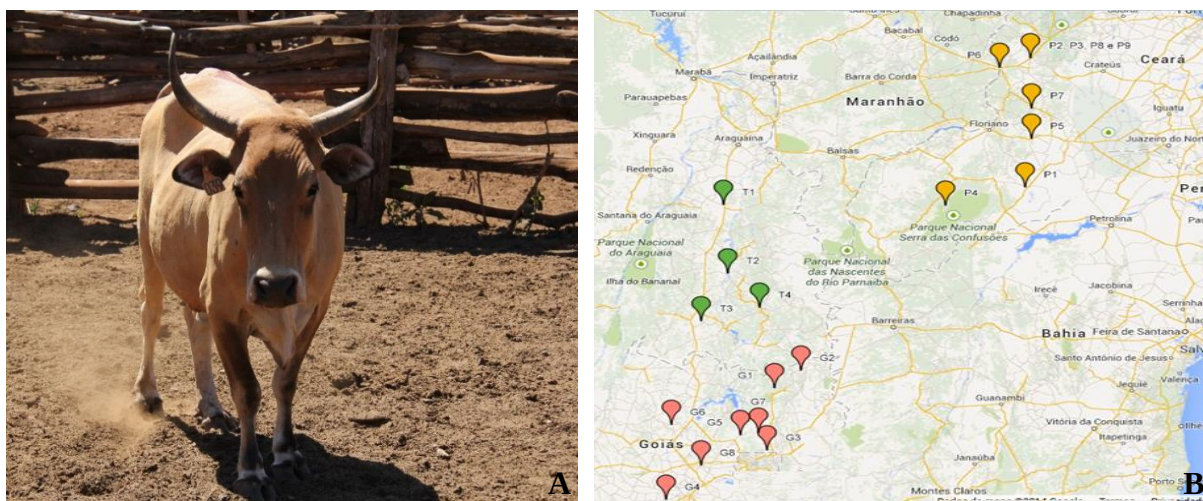


FIGURE 1 – A. Curaleiro Pé-Duro specimen showing phenotypic traits of the breed; B. Map of sampling sites for Curaleiro Pé-Duro breed herds in Brazil²⁸. Yellow: farms in Piauí; green: farms in Tocantins; red: farms in Goiás

TABLE 1 – Genotyping of Curaleiro Pé-Duro breed samples with microsatellite markers for BoLA gene, distributed by farm code, location and samples number analyzed

Farm	Location	State	SN	TS
G1	Cavalcante	GO	95	367
G2	Monte Alegre		19	
G3	Planaltina		47	
G4	Campestre		58	
G5	Mimoso de Goiás		42	
G6	Pilar de Goiás		19	
G7	Água Fria		55	
G8	Pirenópolis		32	
T1	Guaraí	TO	73	129
T2	Porto Nacional		30	
T3	Sucupira		17	
T4	Chapada da Natividade		9	
P1	São João do Piauí	PI	88	316
P2	Campo Maior		29	
P3	Campo MaiorI		29	
P4	Palmeiras		40	
P5	Oeiras		40	
P7	Elesbão Veloso		44	
P8	Campo Maior		15	
P9	Campo Maior		31	
TOTAL			812	812

SN: sample number after data filtering; TS: total sample number by state

2.2. Diseases diagnosis and epidemiological data

Serological results were obtained from epidemiological studies developed by researchers of Pró Centro-Oeste Network. Serum samples were tested against brucellosis and leptospirosis by the microagglutination test (MAT). Leptospirosis infection was tested against 19 serovars (Autumnalis, Hardjo, Andamana, Australis, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Gryppothyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Sentot, Tarassovi, Wolfi) and the positive cutoff was considered 1:100. Neosporosis infection was determined by indirect immunofluorescence using nc-1 of *Neospora caninum* and the cutoff was considered 1:100. Vírus detection of IBR, BVD and leucosis was determined by indirect ELISA using comercial kit (Idexx Laboratories), considering the cutoff determined by the manufacturer.

Epidemiological questionnaires of Pró Centro-Oeste Network database were used to obtain age, sex, herd size, quarantine, occurrence of abortion, leptospirosis and brucellosis vaccine, presence of rodents, herd management practices, flooded areas, slaughter on farm, and veterinary service. Risk factor analysis for all infections sero-positivities were conducted using Fisher's exact test and generalised linear models²⁹.

2.3. Environmental data

Environmental data was obtained from Lapig Maps, Google Earth, and Instituto de Meteorologia (INMET). Longitude, latitude, state, rain, evapotranspiration, precipitation, temperature, humidity, vegetation index, cellulose index, atmospheric pressure, global radiation, and wind direction average data from 2000 to 2011 were used in Fisher's exact test and generalised linear models for association with alleles and infections³⁰.

2.4. Selection of the microsatellites panel, PCR amplification and genotyping

A previously described panel of 13 microsatellites was amplified by primers labeled with different fluorochromes (FAM, NED, PET& VIC) at the 5'end (Table 2) as presented in the ISAG-FAO. The microsatellites used in this study have been characterized in previous studies of BoLA gene^{15, 18, 31} and included locus from BTA23 and SLC11A1 gene in BTA2. The alleles identified on GeneMapper were statistically analyzed for possible association with resistance to *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, bovine leukosis virus, bovine herpesvirus type 1 (of rinotracheitis infection), and bovine diarrhoea virus.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in the in the Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) of the Pontifical Catholic University of Goiás. The Multiplex PCR reactions

were performed with 2µL DNA (20ng/µL) and 8µL of PCR mix. The PCR mix were prepared with 5 µL buffer (*Taq* PCR Master Mix Kit - QIAGEN®), 3 µL primer mix (containing 0,2-0,4 µM of each primer). Cycling conditions were 95°C for 30s, 34 cycles of 95°C for 10s, 55°C for 20s, 72°C for 30 s, and a final extension period of 72°C for 10 min. Following amplification, PCR products were diluted in 80 µL of ultrapure water and 1 µL of this was added to 10 µL of formamide with an internal size standard (for each sample was used 10 µL formamide and 0,18uL of GenescanLIZ 600® - Life Technology and Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

TABLE 2 – Microsatellites for BoLa genes investigated in Curraleiro Pé-Duro breed for infectious diseases association

BTA	MHC Class	Microsatellite	Primer forward	Primer reverse	Interval	Ref.
23	IIa	LA54 (FAM)	GAGAGTTCACTGTGCAG	CGCGAATTCCCAGAGT GAGTGAAGTATCT	149-227	1
23	IIa	DRBP1 (FAM)	ATGGTGCAGCAGCAAGGTGA GCA	GGGACTCAGTCTCTCT ATCTCTTTG	110-140	2
23	IIa	171(FAM)	TTTCCCAGTCACGACGTTGAC TTCAGCCAACAGGTAATGCT	TGGAGAGGGITGTITTC AGA	343-363	2
23	III	1268 (FAM)	TTTCCCAGTCACGACGTTGCTG GAAAAGCCCCACTAAAGTA	GGCACAACCTAACACA CTCCAAA	242-280	2
23	I	312 (FAM)	TTTCCCAGTCACGACGTTGTG TTTCTCTCTCGACACTGA	ACCCCTGAACCTCTCTC CACT	450-484	2
23	I	415 (PET)	TTTCCCAGTCACGACGTTGTT GAGAGGAAGGCAACCAAC	TCCAGCCATTCTCTCTC CATC	437-487	2
23	I	1870 (PET)	TTTCCCAGTCACGACGTTGAA AACAGAGAACACCAGCATCC	ACAATGGCCTTTCTAG CCCTTC	158-186	2
2	-	SLC11A1 (PET)	GGAGGACCTCGGGATGAG	TTGGCTGCCTTCCAGA AC	279-288	4
23	II	RM185 (FAM)	TGGCCTGTCTATGCTTGCATC	GAGTTTCCTTTGCATG CCAGTC	80-108	5
23	III	AGER (VIC)	TTTCCCAGTCACGACGTTGAA AAGGGGAGACGTGGAAAG	CACCTGGGGAAAAAT CAACT	404-414	2
23	IIa	DRB3 (NED)	CGCTCCTGTGACAGATCTAT CC	CACCCCGCGCTCACC	163-200	2
23	I	1687 (PET)	TTTCCCAGTCACGACGTTGTC CTTTTCTGCCTCACCCCTA	AGGAGGGAAGATTG GTGCT	388-436	2
23	I	1778 (VIC)	TTTCCCAGTCACGACGTTGCT TTGAGATGAGGCCAGCAG	CCAACATCACTGGAA GACAGAA	246-282	2

BTA: *Bos taurus* autosome; Interval: allele range in base pairs; Ref.: reference of the microsatellites 1. Outteridge et al.³²; 2. Fritz¹⁵; 3. Pinedo et al.²⁵; 4. Vázquez-Flores et al.³³; 5. Ihara et al.³⁴

Diluted PCR products were added with formamide-GeneScan Liz600® and the mix were denatured for 5 minutes in 95°C and separated by capillary electrophoresis in an automatic sequencer ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For every run, two reference samples were used to correct variations in allele size assignment.

The alleles identified were analyzed for possible association with serological profile against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, bovine leukosis virus, bovine herpesvirus type 1, and bovine diarrhoea virus resistance.

2.5. Statistical analysis

GeneMapper software was used to allele size assignment. The results were tabulated on Excel and the Microsatellite Toolkit for Excel complement was used to transform data to textfile format and to obtain number of alleles by direct counting with 95% confidence interval (CI), allele frequencies, expected and observed heterozygosity, and polymorphic information content (PIC).

Potential deviations from Hardy-Weinberg exact test were estimated with Genepop software. Reynolds' and Nei's genetic distance matrix and the phylogenetic trees were estimated using the Populations³⁵ software. Mega software version 7.0.26 was used to build phylogenetic trees.

Genetix software³⁶ was used to calculate allele number, heterozygosity, FIS, FIT and Fst. The Weir and Cockerman's method of Wright F-statistic^{37, 38} was used to evaluate within breed variability. Populations structures were determined on Structure software³⁹ using a Bayesian clustering method. All samples were tested with a length burn-in period of 100,000 generations and 500,000 iterations after burn-in. A set from K= 1 to K= 10 were analyzed assuming admixture with five iterations for each K.

Effects of the alleles on serological status (positive/negative/suspected) were also evaluated by multivariate regression analysis and generalized linear models (GLM) procedures at 5% level of significance using the software R⁴⁰. The diseases were the dependent variable and molecular, epidemiological, and environmental data were the explanatory variables.

The alleles were classified on absent/absent (*/*), present/absent or absent/present (present/*) and present/present. Significant differences between genotypes */*, present/* and present/present frequencies were tested for all microsatellite alleles by analysis of Fisher test, considering $p < 0.05$.

The alleles located on BTA23 were tested on Phase software to obtain haplotypes. Two microsatellites data were excluded of sampling, namely SLC11A1 because is located on BTA2, and LA54, that had so much alleles and interfer on software analysis.

All alleles were included on multivariable logistic regression as well as epidemiological data (age, sex, herd size, presence of veterinary assistance, other breeds, quarantine, flooded area, abortion, vaccination, rodents) and environmental data (average of 10

years of longitude, latitude rain, evapotranspiration, precipitation, temperature, humidity, atmospheric pressure data). The final model included genotypes class, alleles and haplotypes as explanatory variable of interest controlling for age, sex, breed, epidemiological and environmental variables.

3. Results

Serological investigations considered antibody frequency by breed, farms and state are shown in Table 3. The antibody frequencies had difference between populations. The lower frequencies for *Brucella* infection was expected due to a national program of vaccination, diagnostic, and sacrifice of positive animals. *Leptospira sp.*, *Neospora caninum*, leukosis, IBR, and BVD frequencies showed heterogeneity regarding the immunological profile of the animals. In some farms the frequencies was above the average frequency for the region.

TABLE 3 – Antibody frequencies against infectious diseases in Curraleiro Pé-Duro (CPD) breed from Brazil

State	Farm	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Neospora</i>	Leukosis	IBR	BVD
TO	T1	0%	85%	28%	36%	62%	46%
TO	T2	0%	10%	5%	40%	93%	70%
TO	T3	0%	16%	5%	5%	58%	21%
TO	T4	0%	28%	6%	89%	78%	50%
PI	P1	0%	39%	56%	1%	55%	46%
PI	P2	0%	33%	93%	7%	83%	53%
PI	P3	0%	86%	97%	32%	66%	38%
PI	P4	0%	50%	8%	18%	95%	28%
PI	P5	0%	27%	6%	59%	67%	41%
PI	P7	0%	4%	22%	8%	61%	33%
PI	P8	0%	80%	20%	40%	53%	7%
PI	P9	0%	94%	75%	36%	61%	78%
GO	G1	0%	50%	11%	20%	56%	36%
GO	G2	0%	60%	18%	0%	52%	23%
GO	G3	0%	33%	52%	42%	56%	13%
GO	G4	0%	28%	6%	89%	78%	50%
GO	G5	1%	12%	65%	10%	49%	17%
GO	G6	6%	40%	47%	21%	79%	30%
GO	G7	0%	28%	6%	89%	78%	50%
GO	G8	2%	61%	31%	19%	71%	23%

Pathogens investigated: *Brucella abortus*, *Leptospira sp.*, *Neospora spp.*, Leucosis virus, Bovine Herpesvirus type 1 (causing infectious bovine rinotracheitis – IBR) and BVDV (bovine viral diarrhoea virus).

A Bayesian cluster analysis on Structure software indicated that the genotypes are better clustered in two clusters, considering the delta K value of Evano's method, but the results showed differences when phylogenetic tree were made using different methods (Nei and Reynolds). It is possible to see a particularly cluster when k=10 (marked with yellow color on Figure 2), suggesting that more clusters can be tested. Figure 2 show the animals grouped in clusters according the proportion of animal genome (represented by color and size). Animals of the same color are grouped together.

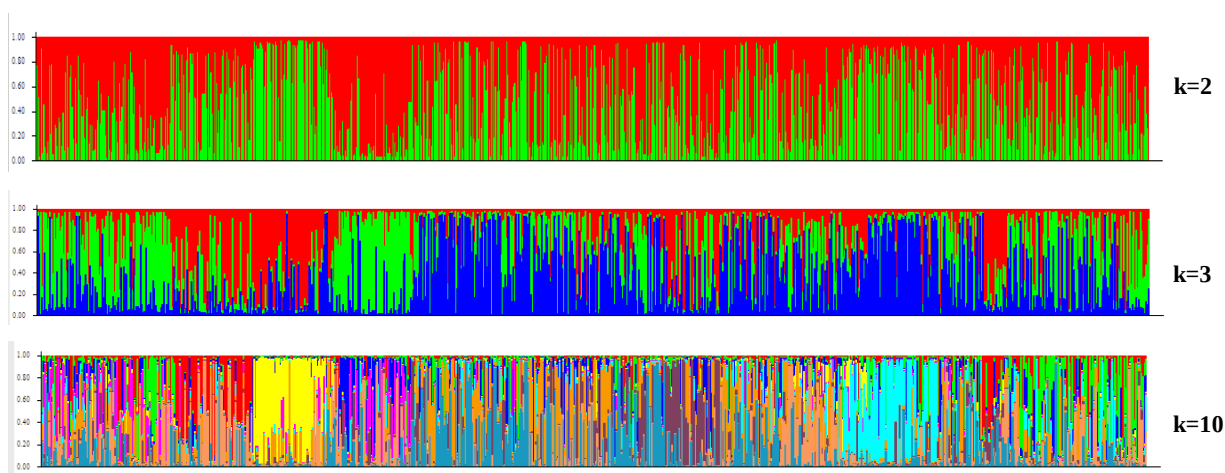


FIGURE 2 – Bayesian clustering assignment of Curraleiro Pé-Duro breed representing the clusters according the genome proportion of alleles on markers linked to BoLA gene, and the better k=2

The antibody frequencies had no significant difference between the clusters. The results showed that cluster 1 and 2 has similar frequencies for all infections (Table 4).

The cluster analysis did not show resistance or susceptibility profiles. It was observed that alleles were grouped in 949 possible combinations and the samples allocated in 932 haplotypes blocks, using 11 microsatellites. No significant association was observed between the haplotypes and pathogens.

TABLE 4 – Prevalence of infections in Curraleiro Pé-Duro breed clustered by microsatellites of immune response

Pathogen	Prevalence cluster 1	Prevalence cluster 1
<i>Brucella abortus</i>	0,5% (2/397)	0,96% (4/415)
<i>Leptospira spp.</i>	39,80% (158/397)	48,16% (197/409)
<i>Neospora caninum</i>	31,06% (123/396)	37,22% (153/411)
Leukosis virus	45,29% (178/393)	21,48% (87/405)
Herpesvirus type 1	67,34% (266/395)	64,79% (265/409)
Diarrhoea virus infection	43,95% (171/389)	40,63% (167/411)

The analyze of population diversity revealed significant deviations of the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$) in all of the loci analyzed, excluding *DBRP1* (Table 5). Piauí populations are mostly in equilibrium and Goiás populations has more markers in disequilibrium. The 1778 marker is in disequilibrium in more herds.

TABLE 5 – Hardy-Weinberg test for microsatellite loci in the Curraleiro Pé-Duro populations

Prop	Microsatellite markers												
	171	312	415	1268	1687	1778	1870	AGER	DBR3	DBRP1	LA54	RM185	SLC11A1
G1	**	-	-	**	-	**	*	-	*	-	**	*	-
G2	-	**	-	-	-	**	**	**	*	-	-	-	-
G3	**	-	**	-	-	**	**	-	-	-	-	-	*
G4	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	-	-	*
G5	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	**	-	-
G6	-	*	**	*	-	**	-	-	-	-	-	-	-
G7	*	-	**	-	*	**	**	**	-	-	*	**	**
G8	-	-	-	-	**	**	*	-	-	-	-	-	*
P1	-	-	-	-	-	-	**	-	-	-	**	**	-
P2	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	*	-	*	**	-	-	-	-	*	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	*	-	**	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-	*
P8	-	*	-	-	**	**	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-	-	-	*
T1	**	-	**	-	-	**	**	-	-	-	-	*	**
T2	-	-	-	-	-	*	**	-	-	-	-	-	-
T3	-	*	**	-	-	-	*	**	-	-	**	*	**
T4	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	*	-	-

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

The allele number, expected and observed heterozygosity were tested for each farm (Table 6). The number of alleles ranged from four to nine alleles per locus. H_e and H_o ranged from 0.5642 to 0.7088 and H_o 0.4870 to 0.7521, respectively.

All herds showed high number of alleles. Although H_e and H_o indicates that microsatellites were highly informative, the observed heterozygosity (H_o) was lower than the expected heterozygosity (H_e) in 15 herds, suggesting excess of homozygotes.

TABLE 6 – Analysis of heterozygosity and allele number of microsatellite for BoLA and SLC11A1 gene by herd of Curraleiro Pé-Duro breed

Population	Nº	He	He SD	Ho	Ho SD	Alleles	Alleles SD
G1	95	0.6815	0.0509	0.6112	0.0140	9.38	5.28
G2	19	0.6045	0.0794	0.4870	0.0370	5.38	2.50
G3	47	0.6847	0.0454	0.6771	0.0192	6.85	2.41
G4	58	0.5907	0.0434	0.5780	0.0193	5.69	2.29
G5	42	0.5642	0.0765	0.5866	0.0213	5.23	1.74
G6	19	0.6789	0.0446	0.6722	0.0308	5.46	1.90
G7	55	0.7088	0.0522	0.5685	0.0189	7.69	3.22
G8	32	0.6559	0.0641	0.6080	0.0263	7.23	3.47
P1	88	0.6452	0.0548	0.6254	0.0143	7.69	3.40
P2	29	0.6720	0.0555	0.6785	0.0242	7.08	3.35
P3	29	0.7033	0.0498	0.7045	0.0238	6.38	2.57
P4	40	0.6448	0.0548	0.6626	0.0209	6.15	2.67
P5	40	0.6719	0.0565	0.6425	0.0211	6.46	2.50
P7	44	0.6636	0.0586	0.6189	0.0203	7.92	4.01
P8	15	0.7234	0.0523	0.6150	0.0378	6.15	2.67
P9	31	0.6419	0.0645	0.6138	0.0249	7.46	3.41
T1	73	0.6162	0.0458	0.5278	0.0166	7.77	2.98
T2	30	0.6880	0.0586	0.6526	0.0243	7.23	3.52
T3	17	0.6291	0.0605	0.4948	0.0354	5.46	2.33
T4	9	0.6687	0.0482	0.7521	0.0399	4.38	1.94

He: Unbiased heterozygosity; Ho: observed heterozygosity; SD: standard deviation

The global F statistics (FIT, FST, and FIS) (Table 7) were performed to show genetic variability within and between groups of the breed, and to estimate excess of homozygosity on each locus.

TABLE 7 – Microsatellites and endogamic coefficients of Curraleiro Pé-Duro breed

Microsatellite	FIS	FIT	FST
171	0.0624	0.1772	0.1224
312	0.0716	0.1868	0.1241
415	0.0542	0.1389	0.0895
1268	0.0702	0.1849	0.1233
1687	0.0672	0.1820	0.1230
1778	0.0435	0.1513	0.1127
1870	0.0566	0.1730	0.1234
AGER	0.0657	0.1799	0.1223
DBR3	0.0722	0.1866	0.1233
DBRP1	0.0727	0.1881	0.1245
LA54	0.0554	0.1710	0.1224
RM185	0.0640	0.1788	0.1227
SLC11A1	0.0576	0.1738	0.1233

FST was revealed the moderate genetic diversity for all loci. Similarity of allele frequencies between populations could mean the capacity of immune response was similar in all herds. Heterozygous deficiency was observed and could lead to the decrease in the ability to resist infections.

All microsatellites (Table 8) exhibited moderate to high levels of polymorphism, except the 415 locus. The markers had higher H_e than H_o . The lowest H_e , H_o and PIC values were found in 415 marker while the higher values were found on DRB3 marker. The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.2803 (415) to 0.8742 (DRB3) and the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.4103 to 0.8317 on the same locus. The result contrast with Haikukutu¹⁴, that found H_o 0.244 and H_e 0.428 in the DRB3 marker. PIC values varied between 0.2631 (415) and 0.8617 (DRB3).

Some of the alleles were significant to univariate analysis (showed on Table 7) were present in 100% of animals positive or negative for one of the infections. Although some alleles were not significant to logistic regression analysis, the allele RM185*88 were present in all leukosis positive and neosporosis negative (6 animals), RM185*90 in all neosporosis positive and leukosis negative (16 animals), LA54*155 in all IBR positive (5 animals) and 312*295 in neosporosis negative (4 animals).

All microsatellites and ordinary alleles were tested against each disease by univariate analysis and logistic regression. The alleles and risk factors evolved on positive or negative results for each infection is reported in Table 9.

The genotypes heterozygous (*/*allele) and homozygous (*/* and allele/allele) for each allele were tested against infections. The most frequent alleles in infected animals and in susceptible animals were different between diseases (Supplementary Material).

The most associations between markers and infections were positive on odds ratio, indicating alleles more present in infected animals. The only environmental data important on multivariate analysis was cellulose. Cellulose was a factor with ranging of 0,162965 and 0,291898 and no biological context explain the association with *Neospora caninum*.

TABLE 8 – Results of univariate analysis for association of diseases and microsatellite alleles on BoLA gene in Curraleiro Pé-Duro breed

Microsatellite	He	Ho	PIC	Allele	Disease	P-value
AGER	0.6974	0.6304	0.6446	310, 312, 314, 316, 320	Neosporosis	<0.05
				310	Leukosis	<0.05
				310, 312, 314, 316, 320	IBR	<0.05
DBRP1	0.8159	0.797	0.7941	115, 131	Leukosis	<0.05
DRB3	0.8742	0.8317	0.8617	162, 164, 168, 174, 176, 178,	Neosporosis	<0.01
				182, 184, 186, 188, 196		
				178, 188, 190, 192	BVD	<0.05
LA54	0.8266	0.6729	0.8133	159, 177, 193	Leptospirosis	<0.01
				193	Leukosis	<0.05
				155, 191, 199	IBR	<0.05
1687	0.8327	0.7529	0.8203	239	Brucellosis	<0.05
				213, 221, 223, 235, 237, 239,	Leptospirosis	<0.05
				241, 245, 249, 253		
				221, 223, 231, 241, 245	Neosporosis	<0.001
				211, 213, 215, 217, 221, 223,	Leukosis	<0.01
				231, 237, 239, 243, 245, 253		
				211	IBR	<0.05
				217, 231	BVD	<0.05
				324, 326	Brucellosis	<0.01
				326, 328, 340	Neosporosis	<0.001
171	0.6049	0.5007	0.5524	322, 324, 326	Leukosis	<0.001
				324	IBR	<0.01
				328, 338	BVD	<0.05
1778	0.8378	0.4697	0.82	239, 241	Brucellosis	<0.05
				237, 239, 241, 243, 245, 247,	Leptospirosis	<0.05
				249, 253, 261, 273		
				241, 245, 247, 263, 273	Neosporosis	<0.001
				241, 271	Leukosis	<0.05
				231, 239, 263	IBR	<0.05
				261, 273	BVD	<0.05
1870	0.6789	0.5532	0.6486	151, 153	Brucellosis	<0.05
				145, 147, 149, 153, 155, 161	Leptospirosis	<0.001
				141, 151, 153, 157, 161	Neosporosis	<0.05
				145, 153	Leukosis	<0.05
				145	BVD	<0.05
312	0.7934	0.7611	0.7646	292	Leptospirosis	<0.01
				292	Neosporosis	<0.05
				292, 295, 311	BVD	<0.05
415	0.2803	0.1272	0.2631	455	Brucellosis	<0.05
				453, 455, 457	Leptospirosis	<0.05
				457	Neosporosis	<0.001
				453, 455, 461	Leukosis	<0.05
				461	IBR	<0.05
				457	BVD	<0.001
RM185	0.8573	0.7317	0.8411	88, 90, 96, 98, 104, 106, 108,	Leptospirosis	<0.05
				90, 94, 98, 102, 104, 106	Neosporosis	<0.05
				88, 90, 100	Leukosis	<0.05
				100, 102, 104, 106	BVD	<0.01
				88, 90, 92, 94, 96, 98	BVD	<0.05
SLC11A1	0.4917	0.4103	0.4597	279, 281, 283, 285, 287	Leptospirosis	<0.01
				279	Neosporosis	<0.01
				291	IBR	<0.05
1268	0.7836	0.7426	0.7566			

He: expected heterozygous; Ho: observed heterozygous; PIC: polymorphic information content; p-value of chi square test

TABLE 9 - Multivariate analysis of the individual animal odds of sorology for infections and alleles among brazilian Curraleiro Pé-Duro breed

Pathogen	Marker*allele	Positive (%)	Negative (%)	odds	CI	p
<i>Brucella</i>	171*326	0.23% (2/866)	99.76% (864/866)	0.15	0.03-0.75	<0.05
<i>Leptospira</i>	>24 months	47.53% (674/1418)	51.48% (730/1418)	3.43	2.24-5.23	<0.01
	LA54*177	19.35% (6/31)	80.64% (25/31)	3.42	0.13-0.86	<0.05
	1687*237	43.96% (240/546)	54.58% (298/546)	7.63	0.6-0.97	<0.05
	1687*241	32.98% (62/188)	66.49% (125/188)	4.82	0.34-0.68	<0.01
	1687*249	31.37% (16/51)	68.63% (35/51)	4.97	0.25-0.93	<0.05
	1778*243	88.89% (16/18)	11.11% (2/18)	8.12	1.81-3.63	<0.01
	1778*245	34.86% (38/109)	65.14% (71/109)	6.07	0.39-0.93	<0.05
	1778*253	27.59% (8/29)	72.41% (21/29)	3.86	0.16-0.91	<0.05
	1870*145	19.23% (5/26)	80.77% (21/26)	2.61	0.09-0.71	<0.01
	1870*149	22.22% (10/45)	77.78% (35/45)	3.95	0.18-0.83	<0.05
	1870*155	36.36% (40/110)	63.64% (70/110)	5.81	0.37-0.9	<0.05
	312*292	83.33% (10/12)	16.67% (2/12)	5.87	1.23-2.79	<0.05
	415*457	22.47% (20/89)	77.53% (69/89)	4.57	0.26-0.78	<0.01
<i>Neospora</i>	>24 months	35.47% (498/1406)	64.58% (908/1406)	2.88	1.77-4.69	<0.01
	12-24 months	52.17% (24/46)	47.83% (22/46)	3.8	1.65-8.72	<0.01
	<i>Brucella</i> vaccine	35.34% (164/464)	64.66% (300/464)	0.51	0.38-0.68	<0.01
	DRB3*162	46.88% (90/192)	53.13% (102/192)	2.08	1.39-3.11	<0.01
	DRB3*168	28.74% (73/254)	71.26% (181/254)	1.65	1.13-2.4	<0.01
	DRB3*176	38.87% (145/373)	61.13% (228/373)	1.61	1.17-2.22	<0.01
	DRB3*178	39.20% (49/125)	60.80% (76/125)	1.96	1.22-3.13	<0.01
	1687*221	67.74% (21/31)	32.26% (10/31)	9	3.52-2.29	<0.01
	1687*223	5.71% (2/35)	94.29% (33/35)	0.07	0.01-3.18	<0.01
	1687*231	50% (18/36)	50% (18/36)	3.05	1.43-6.48	<0.01
	171*328	66.25% (53/80)	33.75% (27/80)	4.5	2.57-7.88	<0.01
	1778*255	47.62% (20/42)	52.38% (22/42)	2.82	1.32-6.01	<0.01
	1870*141	50% (7/14)	50% (7/14)	1.03	3.12-3.37	<0.01
	1870*151	35.61% (271/761)	64.39% (490/761)	2.07	1.48-2.88	<0.01
	1870*153	35.86% (90/251)	64.14% (161/251)	2.53	1.66-3.82	<0.01
	1870*161	54.35% (100/184)	45.65% (84/184)	2.69	1.72-4.2	<0.01
	RM185*104	45.23% (109/241)	54.77% (132/241)	1.89	1.35-2.63	<0.01
	RM185*106	48.12% (64/133)	51.88% (69/133)	2.02	1.29-3.15	<0.01
	RM185*94	46.51% (60/129)	53.49% (69/129)	2.03	1.31-3.12	<0.01
<i>Leukosis</i>	>24 months	22.43% (318/1418)	75.04% (1064/1418)	1.93	1.18-3.14	<0.05
	AGER*310	36.51% (46/126)	62.69% (79/126)	1.66	1.07-2.56	<0.05
	DBRP1*115	15.83% (22/139)	82.01% (114/139)	0.49	0.28-0.84	<0.01
	LA54*193	57.58% (19/33)	36.36% (12/33)	4.88	2.26-10.52	<0.01
	1687*223	54.29% (19/35)	42.86% (15/35)	2.61	1.19-5.7	<0.05
	1687*231	44.44% (16/36)	55.56% (20/36)	3.79	1.78-8.04	<0.01
	1687*253	55.56% (5/9)	44.44% (4/9)	5.51	1.4-21.57	<0.01
	171*322	26.34% (54/205)	72.20% (148/205)	1.48	1.01-2.17	<0.05
	1870*153	15.14% (38/251)	82.07% (206/251)	0.53	0.36-0.78	<0.01
	415*453	25% (30/120)	72.50% (87/120)	2.23	1.29-3.84	<0.01
	415*455	23.28% (268/1151)	74.72% (860/1151)	1.85	1.3-2.63	<0.01
	415*461	75% (6/8)	25% (2/8)	1.89	3.45-103.1	<0.01
<i>IBR</i>	>24 months	27.64% (392/1418)	68.97% (978/1418)	3.76	2.67-5.29	<0.01
	12-24 months	56.52% (26/46)	43.48% (20/46)	1.98	1.01-3.86	<0.05
	1687*211	82.22% (37/45)	15.56% (7/45)	2.5	1.09-5.77	<0.05
	171*324	72.70% (269/370)	22.43% (83/370)	1.67	1.26-2.21	<0.01
	1778*239	76.87% (113/147)	21.09% (31/147)	1.72	1.13-2.62	<0.05
<i>BVD</i>	>24 months	45.70% (648/1418)	44.43% (630/1418)	4.61	3.07-6.92	<0.01
	DRB3*178	58.59% (75/128)	29.69% (38/128)	2.25	1.5-3.4	<0.01
	DRB3*188	66.67% (20/30)	30% (9/30)	2.26	1.05-5.1	<0.05
	1687*231	11.11% (4/36)	80.56% (29/36)	0.25	0.1-0.58	<0.01
	1870*145	23.08% (6/26)	73.08% (19/26)	0.37	0.15-0.91	<0.05
	415*457	20.22% (18/89)	71.91% (64/89)	0.45	0.27-0.74	<0.01

CI: confidence interval of 95%, p: p-value. Risk factors where included on column of Marker*allele.

4. Discussion

The results showed genetic and nongenetic variables with significant association of immune responses to infectious disease agents. These results can be used on cattle management for genetic and productive improvement. The development of cattle resistant to diseases can increase the productivity, decrease the costs of the production system, decrease antibiotic and chemical usage, improve animal welfare, industry and public concerns, and reduce potential zoonosis².

Here we reported 161 alleles on MHC genes. From those, 42 alleles of 1687, 171, 1778, 1870, 415, AGER, DRBP1, DRB3, LA54, and RM185 markers are likely to play an important role in the host immune response, when compared by regression analysis. Alleles of 1687 marker were significant to all infections, except *Brucella* sp. one. Alleles of SLC11A1, 312, and 1268 markers have no significance with diseases although a difference was observed in the univariate analysis. The microsatellite alleles of DRBP1, DRB3, RM185 loci are related to immune response and are reported in animals naturally infested with ticks⁴¹.

Allelic richness was found for all microsatellites tested. Although the lower observed heterozygosity than expected, the allelic richness was high and it means that although these breeds had low number of individuals, there are statistically significant differences between individuals and it was a good indicator of genetic diversity.

The analyses performed by AMOVA revealed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$) for most of the loci. Piauí populations was the only population with no loci in disequilibrium. Similar results reported significant deviations of the HWE ($P < 0.01$) due to the lack of heterozygous in most of the analyzed loci on the CPD and other Brazilian Creole breeds (Caracu, Crioulo Lageano, Curraleiro, Mocho Nacional, and Pantaneiro)^{42, 43}.

The equilibrium deviation may suggest excess of homozygous genotypes or the presence of null alleles, due to inbreeding, subdivision, and geographic isolation. The three effects are reported on CPD populations that are adapted to its local region with some degree of isolation causing loss of genetic variation and inbreeding⁴².

The variability of alleles on BoLA loci in CPD breed is similar to the parental breeds. Parental Portuguese breeds Alentejana, Arouquesa, Barrosa and Mirandesa⁴⁴ also exhibited higher variability, similar values of expected and observed heterozygosity, with a trend of lower observed homozygosity in BoLA microsatellites loci⁴⁵.

PIC, H_e and H_o ranged from 0.2631 to 0.8617, from 0.2803 to 0.8742, and from 0.4103 to 0.8317, respectively. Observed heterozygosity in CPD populations are lower and PIC values are similar compared to Bali cattle, a important breed of Indonesia. The higher diversity on Bali cattle can be due breeding programs for conservation and improve genetic potential⁴⁶. CPD cattle do not have a conservation program oriented to the breed.

The high diversity of alleles was reported on Latin American Creole cattle that had 36 alleles previously reported and three novel alleles¹⁷. Similarly, Curraleiro Pé-Duro has small population sizes with high degree of gene diversity, although with lower observed heterozygosity than expected. Among all observed alleles we report no exclusive alleles because CPD from our study was not compared to other Brazilian cattle breeds.

The haplotypes had no significance with infections ($p > 0,05$). The univariate logistic regression results were in agreement with the reported by Estonba *et al.*⁴⁷, where one microsatellite allele of the SLC11A1 gene had significantly higher frequency in the seronegative group.

When the association between the alleles and the phenotypes were tested by univariate analysis, 81 alleles differ significantly ($P \leq 0.05$) in case-control animals. When classified on homozygous or heterozygous, we found statistically significance with infection, with more animals heterozygous positive than homozygous positive.

Alleles RM185*88, RM185*90, and LA54*155 were associated to all leukosis positive animals and 312*295, RM185*90 to neosporosis negative. RM185 marker is BoLA class I microsatellite that encode surface molecules important to induce and regulate immune response⁴¹. LA54 primer corresponded to a sequence on intron 2 of DRB3 gene, which is functionally the most important gene on cattle expressed at a high level in peripheral blood lymphocytes. This marker has been explored as a possible marker of the expressed polymorphism in the exon region³¹.

Other alleles were significant to infections according to a linear regression model. The 415*457 (allele 457 of 415 marker) was present in 77,53% of negative leptospirosis and 71,91% of negative to BVD, indicating a possible loci for resistance. The 1778*243 and 312*292 were present in 88,89% and 83,33% *Leptospira* positive animals, respectively, while 1687*223 was present in 94,29% of *Neospora* negative. Other loci were present in most positive animals, such as 1870*145 present in 80,77% of *Leptospira* and 73,08% of BVD positive.

The infectious status os an animal can be modified by several factors. Some data not observed in this study can modify the susceptibility to infections, like nutritional status, environmental factors, pregnancy and productivity level⁴¹.

Extended research proved the significant role of the SLC11A1 gene in disease susceptibility^{23, 48}. Studies found potential connection between polymorphisms in SLC11A1 in seronegative group for paratuberculosis²⁵, lower incidence of tuberculosis²⁴ and resistance against *Brucella abortus* infection in cattle²⁶.

The statistical analysis resulted in significant differences in allelic frequencies between seropositive and seronegative samples and microsatellite alleles. The major frequency in */* genotype (allele absent) is explained by the larger number of alleles for each loci. Animal will have low probability for a particular allele, so it is expected more animals with absence than presence of that allele. More frequent alleles were 171*326, 1870*151, 312*289, SLC*281, AGER*312, LA54*183, 415*455.

Epidemiological and environmental factors were not significant at logistic regression. The Curraleiro Pé-Duro populations presented a probable heterozygote deficit by moderate genetic differentiation (F_{st} between 0,0895 and 0,1245). This study showed that Curraleiro Pé-Duro presented many haplotypes conferring many phenotypes, but the endogamy can decrease the variability of this breed.

5. Conclusion

In the current study, we identified microsatellite alleles associated with infection and susceptibility phenotypes. Microsatellite genotypes and loci in bovine MHC region were described in high number of positive or negative animals, suggesting their usefulness as markers for susceptibility/resistance to leptospirosis, neosporosis, leukosis, rhinotracheitis and bovine diarrhoea virus infections in CPD breed. Alleles in 1687 marker are related to all infections, except *Brucella* sp. infection.

The CPD cattle has higher allelic richness and alleles associated to diseases resistance. However, the deficit of heterozygosity should be avoided with programs of genetic conservation to select animals with superior disease resistance and maintain the genetic variability of populations.

References

1. Schneider DS, Ayres JS. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(11):889-95.
2. Bishop SC, Woolliams JA. Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science*. 2014;166:190-8.

3. Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool.* 2005;2:16.
4. Bishop SC, Stear MJ. Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. *Veterinary parasitology.* 2003;115(2):147-66.
5. Bermingham ML, Bishop SC, Woolliams JA, Pong-Wong R, Allen AR, McBride SH, et al. Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity (Edinb).* 2014;112(5):543-51.
6. Mariante AS, Egito AA. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology.* 2002;57(1):223-35.
7. Serodio JJ. Resistência das raças bovinas Nelore, Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro a intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii*. [Dissertation] Goiânia:Universidade Federal de Goiás; 2013.
8. Lobo JR. Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros curraleiro e nelore vacinados com *Mycobacterium bovis*-BCG. [Dissertation] Goiânia:Universidade Federal de Goiás; 2009.
9. Moraes JM, Brito LAB, Moura VMBDD, Ribeiro CS, Guimarães VY, Andrade DF, et al. Immunophenotyping and quantitative evaluation of circulating lymphocytes of cattle of the Curraleiro breed. *Pesq Vet Bras.* 2009;29(4):339-44.
10. Juliano RS. Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro. [Thesis]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2006.
11. Maggioli MF, Lobo JR, Fioravanti MCS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Cellular immune response of Curraleiro Pé-Duro and Nellore calves following *Mycobacterium bovis*-BCG vaccination. *Pesq Vet Bras.* 2013;33:1403-8.
12. Galapero J, Fernández S, Pérez CJ, García-Sánchez A, García-Sánchez L, Gómez L. Valuation of immune response by using phagocytosis index and parameters associated as markers of animal stress in fattening lambs. *Small Ruminant Research.* 2015;133:58-61.
13. Juliano R, Clorinda S Fioravanti M, R B Silva A, Nayane Souza S, F Oliveira H, C P Couto S, et al. Curraleiro Pé Duro cattle breed (*Bos Taurus*) differ in phagocytic neutrophil function related to crossbreed cattle (*Bos taurus X Bos indicus*). *AICA.* 7;2016. 24-30 p.
14. Haikukutu L. Genetic diversity of the bovine leukocyte antigen (BoLA) and its association with resistance to ticks and tick-borne diseases in selected beef cattle breeds in Namibia: University of Namibia; 2018.
15. Fritz KL. Analysis of haplotype structure in the bovine Major Histocompatibility Complex. [Thesis]. Texas A&M University; 2009.
16. Consortium BGSaA. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science.* 2009;324:522-8.

17. Giovambattista G, Takeshima SN, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LA, Saito H, et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene*. 2013;519(1):150-8.
18. Untalan P, Pruett JH, Steelman CD. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Vet Parasitol*. 2007(145):190-5.
19. Nikbakht Brujeni G, Ghorbanpour R, Esmailnejad A. Association of BoLA-DRB3.2 Alleles with BLV Infection Profiles (Persistent Lymphocytosis/Lymphosarcoma) and Lymphocyte Subsets in Iranian Holstein Cattle. *Biochem Genet*. 2016;54(2):194-207.
20. Feng JW, Li YJ, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams L, et al. Bovine Natural Resistance Associated Macrophage protein (NRAMP1) Gene. 1996;956-64 p.
21. Paixão TA, Martinez R, Santos RL. Polymorphisms of the coding region of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012;64:1081-4.
22. Paixao TA, Poester FP, Carvalho Neta AV, Borges AM, Lage AP, Santos RL. NRAMP1 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infect Immun*. 2007;75(5):2493-9.
23. Martinez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobon J, Gallego J, et al. Bovine SLC11A1 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *J Anim Breed Genet*. 2008;125(4):271-9.
24. Kadarmideen HN, Ali AA, Thomson PC, Müller B, Zinsstag J. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Anim Genet*. 2011;42(6):656-8.
25. Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, et al. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med*. 2009;91(2-4):189-96.
26. Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, McMurray DN, Templeton JW, Garry Adams L. Stable transfection of the Bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 Cells: Effect on *Brucella abortus* survival. *Infect Immun*. 2001;69(5):3110-9.
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
28. Freitas TMS. Estratégias de manejo sanitário nos núcleos de conservação *in situ* de bovinos Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro. [Dissertation]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.
29. Asakura S, Makingi G, Kazwala R, Makita K. Herd-level risk factors associated with *Brucella* sero-positivity in cattle, and perception and behaviours on the disease control among agro-pastoralists in Tanzania. *Acta Trop*. 2018;187:99-107.
30. Lobo JR. Geografia de Paisagem e perfil sanitário de bovinos Curraleiro Pé-Duro criados nos biomas Cerrado e Caatinga. [Thesis]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2018.

31. Ellegren H, Andersson L, Davies CJ. Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the BoLA-DKB3 gene: implications for micro-satellite stability and PCR-based DRB3 typing. *Anim Genetics*. 1993;54(4):269-75.
32. Outteridge PM, Andersson L, Douch PG, Green RS, Gwakisa PS, Hohenhaus MA, et al. The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol*. 1996;74(4):330-6.
33. Vázquez-Flores F, Alonso R, Villegas-Sepúlveda N, Arriaga C, Pereira-Suárez AL, Mancilla R, et al. A microsatellite study of bovine solute carrier family 11 a1 (Slc11a1) gene diversity in Mexico in relation to bovine tuberculosis. *Genet Mol Biol*. 2006;29:503-7.
34. Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res*. 2004;14(10a):1987-98.
35. Langella O. *Populations*. 1999.
36. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufast N, Bonhomme F. *Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la genetique des populations*. Montpellier, France. 2003.
37. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the analysis of Population Structure. *Evolution*. 1984;38(6):1358-70.
38. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*. 1951;15(4):323-54.
39. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-59.
40. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria. 2011.
41. Acosta-Rodríguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, García-Vazquez Z, Gorodezky C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet Parasitol*. 2005;127(3-4):313-21.
42. Oliveira APF, Carvalho JH, Miretti MM, Lara MAC, Contel EPB. Genetic diversity of the Brazilian Creole cattle Pé-Duro assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. *R Bras Zootec*. 2012;41(11):2316-22.
43. Serrano GM, Egito AA, McManus C, Mariante AS. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesq Agropec Bras*. 2004;39(6):543-9.
44. Mariante AdS, Cavalcante N. *Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil*. 2000. 228 p.
45. Bastos-Silveira C, Luis C, Ginja C, Gama LT, Oom MM. Genetic variation in BoLA microsatellite loci in Portuguese cattle breeds. *Anim Genet*. 2009;40(1):101-5.
46. Puja K, Sulabda N, Wandia N. Microsatellite Polymorphisms and its Relationship with Calving Interval and Gestation Period in Bali Cattle. *Adv Anim Vet Sci*. 2018;6(5):197-200.

47. Estonba A, Iriondo M, Oyanguren O, Garrido JM, Geijo MV, Sevilla I, Juste RA. Bovine 3'-UTR (GT11) variant of the NRAMP1 gene under-represented among paratuberculosis seropositive cattle. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. 2005.
48. Paixão TA, Poester FP, Carvalho Neta AV, Borges ÁM, Lage AP, Santos RL. NRAMP1 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Not Associated with Natural Resistance to *Brucella abortus* in Cattle. *Infect Immun*. 2007;75(5):2493-9.

CAPÍTULO 4 - ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA ENTRE MARCADORES SNPs E ENFERMIDADES EM BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO

Resumo

A susceptibilidade a enfermidades tem caráter hereditário e pode ser transmitida entre populações. Polimorfismos de base única (SNPs) em genes relacionados ao complexo antígeno leucocitário bovino (BoLA) são associados a enfermidades parasitárias, bacterianas e virais em bovinos de diversas raças. Este estudo investigou SNPs na região promotora do gene BoLA em 940 amostras de bovinos Curraleiro Pé-Duro e associou-os com a ocorrência de anticorpos nos testes de brucelose, leptospirose, neosporose, leucose, IBR e BVD. Amostras de DNA foram avaliadas pelo método KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*) para identificação dos polimorfismos. A fase gamética e os haplótipos SNPs foram determinados com auxílio do *software* PHASE 2.1.1. Os haplótipos foram associados a resultados sorológicos contra *Brucella* sp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, leucose, rinotraqueite infecciosa e diarreia viral bovina por meio da análise univariada, seguida de regressão logística. O haplótipo 2 do BTA17 está presente em 70% dos animais positivos à infecção por *Neospora caninum*. Haplótipos nos BTA6 e BTA15 são mais frequentes em animais soronegativos. Os haplótipos relacionados ao gene da interleucina 10 foram associados a animais negativos a todas as infecções. Animais da raça Curraleiro Pé-Duro apresentam polimorfismos relacionados à capacidade de resistência a infecções por agentes bacterianos, virais e por *Neospora caninum*.

Palavras-chave: BoLA, polimorfismo, resistência a doenças

GENOMIC ASSOCIATION STUDY BETWEEN SNPs AND DISEASES IN CURRALEIRO PÉ-DURO CATTLE

Abstract

The susceptibility to diseases is an hereditary factor and can be transmitted between populations. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of bovine leukocyte antigen (BoLA) complex are associated with bacterial, viral and parasitic infections in cattle. The present study analyzed polymorphisms in the promoter region of the BoLA gene in 940 samples of Curraleiro Pé-Duro cattle breed. DNA samples were evaluated by the KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*) method for SNPs identification. The gametic phase and haplotype blocks were determined using the *software* PHASE 2.1.1. The haplotypes were associated with serological response for *Brucella* sp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, leukosis, infectious rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea tests. Genotype–phenotype association was performed using univariate analysis, followed by logistic regression at 5% significance level. Haplotype 2 on BTA17 is present in 70% of positive animals for *Neospora caninum* infection. Haplotypes in BTA6 and BTA15 are more frequent in seronegative animals. Haplotypes related to the interleukin 10 gene were significant associated with negative animals to all infections. Curraleiro Pé-Duro cattle breed have polymorphisms related to the resistance against bacterial, viral and *Neospora caninum* infections.

Keywords: BoLA, polymorphism, resistance to disease

1. Introdução

O Curraleiro Pé-Duro (CPD) é uma raça bovina local brasileira detentora de valor histórico, cultural e ecológico. São originários dos bovinos trazidos da Península Ibérica no período colonial, que povoaram as diferentes regiões do Brasil. Esses animais foram introduzidos na região Nordeste e seguiram margeando o Rio São Francisco, alcançando os campos e cerrados de Minas Gerais e Goiás. O rebanho de CPD está distribuído nos estados do Pará, Bahia, Maranhão, Piauí, Tocantins, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal¹⁻³ e o pequeno efetivo populacional coloca em risco de extinção este patrimônio². Como a raça não foi submetida a programa de seleção, ainda conserva as características de rusticidade e maior resistência às doenças endêmicas regionais⁴.

A raça possui alto nível de linfócitos T circulantes, que diminui com o avançar da idade, juntamente com os níveis de leucócitos e linfócitos B. A maior proporção de linfócitos T:B observada nos bovinos Curraleiros Pé-Duro está relacionada à resistência às hemoparasitoses⁵ e a torna mais resistente à infecção por *Mycobacterium bovis* e outras infecções⁴. O risco de enfermidades aos animais depende de fatores próprios do hospedeiro, patógeno e ambiente, que em conjunto geram respostas à infecção muito variáveis^{6,7}. A variação na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro depende da interação deste com o patógeno, que envolve complexos mecanismos os quais são muitas vezes insuficientes para gerar uma resposta adequada para ser detectada nos testes diagnósticos^{8,6}.

Mensurar fenótipos de resistência é difícil e de alto custo. Portanto, a seleção assistida por marcadores pode ser uma ferramenta mais barata e simples para identificar animais resistentes baseado nas variações em genes, loci de caracteres quantitativos (QTL) e SNPs (*single nucleotide polymorphism*) envolvidos na resposta imune⁹. As alterações de um único nucleotídeo, ou mutações pontuais do DNA denominadas SNP, podem muitas vezes ser suficientes para desencadear uma enfermidade de ordem hereditária ou tornar o indivíduo suscetível/resistente a determinada infecção ou parasitismo. O modo como o indivíduo responde a uma infecção depende em grande parte de sua constituição genética. Os fatores genéticos associados à suscetibilidade possuem valores de herdabilidade moderados para a infecção^{10,11}. Considerando o grande número de genes que cada indivíduo possui, tornam-se importantes as pesquisas que buscam identificar variações genéticas associadas a doenças¹², em especial a presença de SNPs que estão disseminados no genoma e em regiões de genes candidatos cujos efeitos ainda não são muito bem definidos¹⁰.

As variações genéticas que alteram o modo de resposta a infecções podem ocorrer em regiões codificantes e não codificantes dos genes. Quando a alteração ocorre em uma região codificante, há mudanças na região de reconhecimento dos antígenos pelas células de defesa e anticorpos. Por outro lado, quando as alterações ocorrem em regiões não codificantes, há alteração na funcionalidade de proteínas e na transcrição dos genes¹²

Existem vários genes envolvidos na duração, transmissão e magnitude da resposta imunológica, entre eles os genes codificadores de citocinas, um grupo de proteínas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias. Variações alélicas nos genes e nos receptores de citocinas modificam a resposta fenotípica à infecção¹³. Estudos apontam que a resistência a determinados patógenos é uma característica herdável¹⁴ e algumas enfermidades são associadas a polimorfismos em genes candidatos, como SLC11A1 (*Solute Carrier Family 11 Member 1*), gene que codifica uma proteína transmembrana transportadora de íons ferro, e TLR1 (*Toll like receptor 1*), gene que codifica proteínas de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e regulam a produção de citocinas^{6, 15, 16}.

A variação genética da resistência ou suscetibilidade pode ser significativa entre indivíduos, sugerindo que a seleção para a melhoria da resistência é possível. Entretanto, limitações como a baixa herdabilidade da característica a ser selecionada pode ser manifestada apenas na vida adulta frente a uma exposição a patógenos ou fatores de estresse ambiental. Mesmo com as limitações, as bases de dados de fenótipos e genótipos relacionados à saúde devem ser constantemente implementadas para aumentar o conhecimento a respeito das infecções¹⁷.

A resistência é uma característica determinada por muitos genes, entre eles os que codificam as moléculas de regulação do sistema imune. O complexo principal de histocompatibilidade bovino, chamado de antígeno leucocitário bovino (BoLA), é um complexo com mais de 100 genes envolvidos na resposta imunológica, com alta variabilidade determinada pelo grande número de alelos. No complexo estão inseridos genes apresentadores de antígenos, genes do sistema complemento que atuam no ataque ao antígeno e genes relacionados ao fator de necrose tumoral (TNF). A forma variável como os animais respondem a uma infecção depende das mutações nos genes que modificam o nível de transcrição e também dos polimorfismos nos sítios de reconhecimento de antígenos¹².

A resposta imune não depende exclusivamente dos genes relacionados ao MHC mas sim do produto de vários genes. Entre os genes que não estão ligados ao MHC, mas que possuem relação com a resistência/suscetibilidade a enfermidades estão o gene que codifica a

proteína 1 (*NRAMP 1*)¹⁸, conhecido também como *SLC11A1*, genes de imunoglobulinas, genes do receptor de células T¹⁹.

O tipo de patógeno envolvido na infecção determina o tipo de resposta imune. Os receptores tipo *Toll* (*Toll-like receptor – TLR*), presentes em células fagocíticas, são ativados por produtos microbianos e emitem sinais intracelulares para induzir a ativação da produção de citocinas. Tais receptores podem ser ativados por produtos microbianos, induzindo a diversas respostas. O receptor *TLR2* é ativado por moléculas da parede celular de bactérias Gram positivas, *TLR4* por lipopolissacarídeos da membrana das bactérias, *TLR5* por flagelina e *TLR9* por DNA bacteriano^{20, 21}.

A resposta imune frente à infecção por *Brucella abortus*, bactéria Gram negativa intracelular facultativa, depende da ativação da resposta imune celular pela ativação de células T CD4 que secretam citocinas com função de estimular a atividade bactericida de macrófagos e citotóxica de linfócitos T CD8, que destroem as células infectadas. A infecção por *B. abortus* estimula a produção de interleucina 12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos e esta interleucina estimula células *natural killer* a secretar interferon gama que possui a função de lise das células infectadas. Os linfócitos T se diferenciam em células efetoras e células de memória, que secretam as citocinas conforme o tipo de estimulação^{20, 22}.

Proteínas da superfície externa de *Leptospira*, entre elas a adesina Lsa21, modulam a resposta imune mediada por *TLRs*, induzindo forte atividade *TLR2* e *TLR4* e a produção de citocinas pró-inflamatórias²³. A infecção por *Neospora caninum* desencadeia uma resposta celular mediada por células pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e também ocorre a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), associada à atividade fagocitária²⁴.

Os vírus da leucose bovina (VLB), o herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) causador da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) e o vírus da diarreia viral bovina (BVD – *bovine diarrhoea virus*) podem induzir uma infecção persistente ou crônica. Muitos vírus que acometem bovinos induzem a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina produzida por macrófagos que ativa o sistema imunológico modulando a produção de outras citocinas e contribui para a patologia e sinais da infecção. A infecção por BVDV *in vitro*, na presença de outro patógeno, diminui a produção de TNF- α , contribuindo para a imunossupressão comumente observada em animais persistentemente infectados. Em adição, há diminuição da quimiotaxia e liberação de um inibidor da atividade da interleucina 1, que aumentam a sobrevivência do vírus no hospedeiro²⁵.

Este estudo foi desenvolvido para estimar a existência de variação genética, usando marcadores tipo SNP, relacionada à produção de citocinas e ao risco de enfermidades infecciosas em animais da raça Curraleiro Pé-Duro. Os polimorfismos foram confrontados com variáveis epidemiológicas com intuito de observar fatores fenotípicos e genotípicos associados às infecções.

2. Material e métodos

As amostras foram obtidas do banco de dados da Rede Pró-Centro Oeste, uma rede inter-regional e interdisciplinar de pesquisa e transferência de conhecimento no Brasil que mantém 1.182 amostras de sangue, soro e DNA além de dados epidemiológicos de rebanhos bovinos Curraleiro Pé-Duro (CPD) dos estados de Goiás, Tocantins e Piauí. Alíquotas das amostras de sangue de animais de ambos os sexos e de todas as idades, constantes no banco de amostras da Rede na Universidad de Córdoba, Espanha, foram submetidas à extração do DNA pelo método *Salting-Out*²⁶ com algumas modificações.

Fez-se a incubação de 200 µL de sangue conservado com anticoagulante EDTA em 1000 µL de Tris-EDTA (TE) pH 8, seguida de homogeneização e incubação durante cinco minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 RPM durante cinco minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. Novamente foi adicionada solução TE e realizada homogeneização, centrifugação e descarte do sobrenadante. As células foram lisadas com 400 µL de solução de lise celular (Tris-HCl 200 mM pH 8,5; EDTA 25 mM pH 8,5; NaCl₂ 250 mM; SDS 0,5%; água; 0,4% de mercaptoetanol e 0,4% de proteinase K). O *pellet* foi rompido com auxílio da pipeta e as amostras foram incubadas a 56°C por uma hora. Depois da lise, as proteínas foram separadas por adição de 150 µL de acetato sódico 3M (pH 5,5), agitação, incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação a 14.000 RPM durante 15 minutos. O sobrenadante limpo foi transferido para tubo contendo 400 µL de isopropanol. As amostras foram invertidas repetidas vezes com cuidado para a observação do DNA e centrifugadas três minutos a 10.000 RPM. O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 1.000 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 10.000 RPM durante um minuto. O etanol foi retirado e as amostras de DNA foram secas. O DNA seco foi eluído com 200 µL TE.

Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoPhotometerTM e padronizado a 20 ng/µL. As amostras foram separadas e 940 amostras, correspondendo a 10 placas com dois controles em cada uma, foram enviadas ao laboratório LGC Genomics

(www.lgcgenomics.com), no Reino Unido, onde foram processadas pela técnica de KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*).

Os SNPs (Quadro 1) utilizados estavam presentes nas regiões de codificação dos genes das integrinas, *toll like* receptores, *nod like* receptores, interleucinas e interferon gama, relacionados a infestações por carrapatos em bovinos²⁷, mastite subclínica²⁸ e leucose bovina²⁹. Os *primers* foram desenhados a partir de sequências de DNA disponíveis no banco de dados *online* do Ensembl para a espécie bovina (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index).

QUADRO 1 – Relação dos marcadores SNPs testados em amostras de Curraleiro Pé-Duro

dSNPs Accession	Localização do gene	Posição	M	IUPAC	BTA	MAF
rs41594962	Integrina subunidade alpha 11	15137028	C/T	Y	10	0,320
rs42395522	Interleucina 10 receptor subunidade alpha	29101724	A/G	R	15	0,494
rs8193069	Toll Like Receptor 4	108838685	C/T	Y	8	0,196
rs42395525	Interleucina 10 receptor subunidade alpha	29102009	C/T	Y	15	0,347
rs17872126	Bos taurus proline rich 3 (PRR3), mRNA	28223274	C/T	Y	23	0,396
rs55617272	Toll Like Receptor 3	15240722	G/A	R	27	0,104
rs55617351	Toll Like Receptor 8	141005664	T/C	Y	X	0,333
rs42395524	Interleucina 10 receptor subunidade alpha	29101838	T/T	Y	15	monomórfico
rs42395526	Interleucina 10 receptor subunidade alpha	29102042	G/A	R	15	0,494
rs42852439	Toll Like Receptor 3	15241437	T/G	K	27	0,372
rs43710288	Nod Like Receptor 2	19210671	A/T	W	18	0,168
rs29026690	Lymphocyte antigen 6 family member G6F	27421348	C/T	Y	23	0,077
rs207532826	Toll Like Receptor 8	141004386	T/T	K	X	monomórfico
rs43616884	Fem-1 homolog B	15094573	G/A	R	10	0,309
rs110491977	Toll Like Receptor 2	3952585	C/T	Y	17	0,021
rs55617286	Toll Like Receptor 10	59672820	C/G	S	6	0,150
rs43702941	Toll Like Receptor 6	59706074	C/T	Y	6	0,319
rs55617325	Toll Like Receptor 10	59672512	T/A	K	6	0,285
rs108954324	Interferon Gamma	45830291	G/T	K	5	0,080
rs43710290	Nod Like Receptor 2	19212600	C/T	Y	18	0,060
rs29025980	fem-1 homolog B	15082638	G/A	R	10	0,222
rs43706433	Toll Like Receptor	3952556	C/T	R	17	0,365
rs55617437	Toll Like Receptor 10	59673169	C/T	Y	6	0,209
rs108949553	Integrina subunidade alpha 11	15153881	G/A	R	10	0,334

dSnps Accession: número de referência da base de dados ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>); Name: nome do gene; M: tipo de SNPs; IUPAC: SNPs com nomenclatura IUPAC; BTA: *Bos taurus* autosome; MAF: menor frequência alélica

Fonte: Adaptado de Vásquez et al.³⁰ e Porto Neto et al.³¹

O ensaio de genotipagem KASP é um método simples e econômico, que utiliza a PCR de competição para um alelo específico combinado com um sistema de detecção de fluorescência para identificação e mensuração de variações genéticas do nucleotídeo, a fim de detectar alterações do tipo SNP, deleção ou inserção. A genotipagem KASP consiste em dois *primers* específicos de cada alelo e de um sistema de detecção FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).

Os *primers* específicos são amplificados mediante um ou dois *primers reverse* comuns, e os *primer forward* específicos contêm na sua extremidade 5' uma cauda complementar a uma sonda marcada por FAM (azul) ou HEX (verde) que permite, uma vez terminada a amplificação, a visualização do resultado em um leitor de microplaca por fluorescência. Em resumo, é realizada uma PCR em que são adicionadas duas sequências marcadas com fluoróforos, um fluoróforo vermelho (HEX) marca a sequência que amplifica um alelo (por exemplo, adenina) e um fluoróforo azul (FAM) marca outro alelo que não faz ligação com o primeiro (por exemplo, citosina). A amplificação ocorre por competição e a sequência amplificada emite maior fluorescência pela separação entre o *quencher* e a molécula fluorescente³².

Com auxílio do *software* KBioscience's os dados de comprimento de onda emitidos por FAM e HEX foram plotados em um gráfico de eixos x e y, respectivamente, e valores de ROX foram utilizados como referência para normalização dos dados, eliminando problemas relacionados à variação do volume de líquido de cada amostra. É possível separar genótipos homozigotos de heterozigotos de acordo com a cor marcada e a posição no gráfico. Genótipos homozigotos para o alelo marcado com HEX aparecem marcados de vermelho, enquanto os homozigotos para o alelo marcado com FAM aparecem em azul e os heterozigotos em verde³².

O ensaio de genotipagem foi validado e a genotipagem foi realizada utilizando o *software* KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics). Os dados obtidos foram filtrados para eliminar indivíduos e marcadores com baixa qualidade de genotipagem assim como marcadores monomórficos, segundo o parâmetro de menor frequência alélica (MAF <0,05).

A análise da qualidade dos SNPs identificou SNPs monomórficos e foram adotados os parâmetros de eficiência de genotipagem (*call rate*) < 85% para a exclusão de indivíduos e marcadores ou frequência do menor alelo (MAF) menor que 1% para a exclusão de SNPs, a fim de preservar amostras com a melhor qualidade de genotipagem³³.

Os SNPs foram associados a frequência de anticorpos contra *Brucella abortus*, *Leptospira* sp., *Neospora caninum*, vírus da leucose bovina, herpesvírus bovino tipo 1 (causador da rinotraqueíte infecciosa bovina) e contra o vírus da diarreia viral bovina. As

análises sorológicas foram realizadas nos anos de 2011 a 2013 e fazem parte do banco de dados da Rede Pró-Centro Oeste.

Determinados os genótipos, a fase gamética dos indivíduos foi determinada com auxílio do *software* PHASE 2.1.1 para determinar os haplótipos. Os SNPs foram agrupados por cromossomo no qual estavam presentes para definir o efeito da combinação de SNPs sobre o fenótipo. Para cada cromossomo analisado o algoritmo foi aplicado cinco vezes e foram usadas 100 iterações, um intervalo de amostragem e 100 *burn-in* através da cadeia de Markov^{34, 35}.

Os fenótipos foram definidos de acordo com a reação positiva ou negativa aos testes sorológicos⁶. A análise de associação com os fenótipos foi por meio da análise univariada, seguida de regressão logística que teve como variável resposta o estado sanitário (positivo ou negativo para a infecção) e as variáveis polimorfismo.

Foram associados os haplótipos em cada cromossomo com a resposta sorológica. Cromossomos que possuíam apenas um SNP não formam haplótipos, portanto nestes a presença ou ausência do polimorfismo foi considerada. Cada indivíduo possui um par de haplótipos, portanto as variáveis de resposta sorológica foram duplicadas para que cada haplótipo fosse computado uma vez.

A análise multivariada foi empregada para identificar marcadores com maior efeito sobre as características fenotípicas. Com o valor dos *odds ratio* foi possível observar alelos relacionados à suscetibilidade. Os dados foram analisados no programa estatístico R (R Core Team) usando os pacotes Epitools para análise univariada e Epicalc e Car para regressão. Foram considerados significativos os dados com nível de significância de 5% aos testes de qui-quadrado e Fisher¹⁰.

As variáveis epidemiológicas testadas foram: tamanho do rebanho, criação de outras raças, aquisição de animais, realização de quarentena, uso de pastagens em comum ou aluguel de pastagens, presença de área alagada, abate na propriedade, ocorrência de abortos, vacinação, tipo de manejo, presença de roedores e assistência veterinária. As variáveis significativas foram aplicadas ao modelo linear generalizado multivariado (GLM), utilizando a regressão logística binária. Para isso, foi aplicada a função glm no *software* R³⁶.

3. Resultados

Na etapa de controle de qualidade foram retirados das análises dois SNPs monomórficos, rs207532826 e rs42395524. Pelo critério de *call rate* foram excluídas 238

amostras que apresentavam mais que 15% de falhas, restando apenas 702 das 940 amostras iniciais. O controle de qualidade dos SNPs evita que marcadores recentemente fixados e amostras com pouco conteúdo informativo gerem resultados falsos nos testes de associação.

As frequências das reações soropositivas foram: 0,85% (6/702) para *B. abortus*, 42,07% (292/694) para *Leptospira* spp., 36,87% (257/697) para *N. caninum*, 21,07% (146/693) para VLB, 64,65% (450/696) para BoHV-1 e 40,38% (279/691) para BVD. Foram calculadas as frequências de cada infecção por propriedade, considerando apenas as amostras usadas na avaliação dos SNPs (Tabela 1).

TABELA 1 – Frequência das infecções nas amostras avaliadas por marcadores SNPs dos rebanhos de bovinos Curraleiro Pé-Duro

Propriedade	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Neospora</i>	VLB	IBR	BVD	Total
G1	0% (0)	50,7% (36)	15,49% (11)	19,72% (14)	50,7% (36)	35,21% (25)	71
G2	0% (0)	56% (14)	8% (2)	0% (0)	40% (10)	32% (8)	25
G3	0% (0)	29,55% (13)	52,27% (23)	43,18% (19)	52,27% (23)	11,36% (5)	44
G4	1,52% (1)	56,06% (37)	10,61% (7)	3,03% (2)	81,82% (54)	75,76% (50)	66
G5	1,56% (1)	10,94% (7)	70,31% (45)	7,81% (5)	46,88% (30)	14,06% (9)	64
G6	10,53% (2)	47,37% (9)	68,42% (13)	21,05% (4)	84,21% (16)	26,32% (5)	19
G8	2,99% (2)	59,7% (40)	32,84% (22)	20,9% (14)	70,15% (47)	22,39% (15)	67
P1	0% (0)	27,27% (24)	62,5% (55)	2,27% (2)	56,82% (50)	51,14% (45)	88
P2	0% (0)	41,18% (7)	88,24% (15)	5,88% (1)	82,35% (14)	52,94% (9)	17
P3	0% (0)	83,33% (15)	100% (18)	33,33% (6)	66,67% (12)	50% (9)	18
P4	0% (0)	50,00% (9)	5,56% (1)	16,67% (3)	94,44% (17)	16,67% (3)	18
P5	0% (0)	23,68% (9)	7,89% (3)	65,79% (25)	78,95% (30)	42,11% (16)	38
P7	0% (0)	4,08% (2)	22,45% (11)	8,16% (4)	63,27% (31)	30,61% (15)	49
P8	0% (0)	100% (5)	40% (2)	0% (0)	60% (3)	0% (0)	5
P9	0% (0)	100% (13)	84,62% (11)	30,77% (4)	61,54% (8)	76,92% (10)	13
T1	0% (0)	80,7% (46)	28,07% (16)	40,35% (23)	61,4% (35)	50,88% (29)	57
T2	0% (0)	11,11% (3)	3,7% (1)	40,74% (11)	96,3% (26)	74,07% (20)	27
T3	0% (0)	16,67% (1)	16,67% (1)	0% (0)	16,67% (1)	0% (0)	6
T4	0% (0)	20% (2)	0% (0)	90% (9)	70% (7)	60% (6)	10

Prop.: propriedade, Total: número de amostras avaliadas para infecção e para marcadores tipo SNP presentes em regiões relacionadas à resposta imune bovina, por fazenda; VLB: vírus da leucose bovina; IBR: vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina; BVD: vírus da diarreia viral bovina

As frequências das infecções foram testadas para cada polimorfismo por análise univariada e as diferenças significativas observadas foram tabuladas na Tabela 2. As análises identificaram SNPs com associação à infecção nos dez cromossomos pesquisados.

Para avaliar se os SNPs estão em desequilíbrio de ligação, os marcadores foram agrupados por cromossomo e foram formados haplótipos. O SNP rs42395526 foi significativo em todas as infecções. Os haplótipos e os respectivos genótipos podem ser observados no Quadro 2.

QUADRO 2 – Haplótipos e SNPs relacionados à resposta imune em bovinos Curraleiro Pé-Duro

BTA	Polimorfismo	Posição	Haplótipo ou SNP	Genótipo ou alelo	Nucleotídeos
5	rs108954324	45830291	1 2	1 0	T G
6	rs55617325 rs55617286 rs55617437 rs43702941	59672512 59672820 59673169 59706074	1 2 3 4 5 6 7	0110 0100 0101 0001 1100 1101 1001	CGAC CGTC CGTT CCTT TGTC TGTT TCTT
8	rs8193069	108838685	1 2	0 1	C T
10	rs29025980 rs43616884 rs41594962 rs108949553	15082638 15094573 15137028 15153881	1 2 3 4 5 6 7	0101 0001 0000 0010 1111 1000 1010	GTGA GCGA GCGG GCAG ATAA ACGG ACAG
15	rs42395522 rs42395525 rs42395526	29101724 29102009 29102042	1 2 3 4 5	110 111 100 010 000	GTG GTA GCG ATG ACG
17	rs43706433 rs110491977	3952556 3952585	1 2 3	00 01 10	CC CT TC
18	rs43710288 rs43710290	19210671 19212600	1 2 3	10 00 01	TC AC AT
23	rs29026690 rs17872126	27421348 28223274	1 2 3 4	00 01 10 11	CC CT TC TT
27	rs55617272 rs42852439	15240722 15241437	1 2 3	00 10 11	TG GG GA
X	rs55617351	141005664	1 2	1 0	C T

TABELA 2 – Resultados da análise univariada de Fisher para SNPs associados a infecções em bovinos Curraleiro Pé-Duro

Patógeno	SNP	BTA	Posição	Pr(>Chisq)
<i>Brucella</i>	rs8193069	15	108838685	0,007
	rs42395526	15	29102042	0,002
<i>Leptospira</i>	rs43706433	17	3952556	0,000
	rs43702941	6	59706074	0,000
	rs55617325	6	59672512	0,002
	rs55617437	6	59673169	0,006
	rs42395525	23	29102009	0,001
	rs43710290	15	19212600	0,008
	rs42395526	15	29102042	0,002
<i>Neospora</i>	rs110491977	17	3952585	0,009
	rs43702941	6	59706074	0,037
	rs42395522	15	29101724	0,002
	rs55617351	X	141005664	0,000
	rs42852439	27	15241437	0,014
	rs55617272	27	15240722	0,000
	rs43710288	18	19210671	0,009
	rs108954324	5	45830291	0,022
	rs43710290	18	19212600	0,024
	rs29025980	10	15082638	0,000
	rs42395525	15	29102009	0,023
	rs42395526	15	29102042	0,000
	rs43616884	10	15094573	0,006
VLB	rs43702941	6	59706074	0,031
	rs42395526	15	29102042	0,010
BoHV-1	rs43710288	18	19210671	0,039
	rs42395525	15	29102009	0,029
	rs42395526	15	29102042	0,027
BVDV	rs110491977	17	3952585	0,013
	rs43706433	17	3952556	0,000
	rs8193069	8	108838685	0,020
	rs43702941	6	59706074	0,001
	rs55617272	27	15240722	0,015
	rs41594962	10	15137028	0,000
	rs43710290	18	19212600	0,047
	rs29025980	10	15082638	0,043
	rs17872126	23	28223274	0,042
	rs42395526	15	29102042	0,005

BTA: *Bos taurus* autosome

Cada indivíduo foi classificado em dois haplótipos, um de origem materna e outro de origem paterna. Os haplótipos foram tabulados de acordo com a presença ou ausência e as informações sorológicas de cada indivíduo foram duplicadas para que cada haplótipo do indivíduo fosse comparado à variável resposta, com isso a amostragem de 1404 animais corresponde aos dois alelos ou haplótipos dos 702 animais amostrados.

Foram identificados haplótipos relacionados a todas as infecções pela análise de qui-quadrado, considerando $p < 0,05$ (Tabela 3).

TABELA 3 – Resultados significativos ao teste de qui-quadrado para haplótipos SNPs e infecções em Curraleiro Pé-Duro

Patógeno	BTA	Haplótipo	p
<i>Brucella</i>	8	1 e 2	<0,01
	15	2	<0,05
	27	3	<0,05
<i>Leptospira</i>	5	1 e 2	<0,05
	6	1 e 5	<0,05
	8	1 e 2	<0,05
	10	5	<0,05
	15	2	<0,05
	17	1 e 3	<0,01
<i>Neospora</i>	6	6	<0,05
	10	2 e 7	<0,05
	15	1, 2 e 5	<0,01
	17	1 e 2	<0,01
	18	1 e 3	<0,05
	27	1 e 3	<0,01
	X	1 e 2	<0,01
<i>Leucose</i>	6	4 e 5	<0,05
	15	1 e 2	<0,01
	27	2 e 3	<0,05
IBR	15	2 e 3	<0,01
	18	1	<0,05
BVD	6	5	<0,01
	15	2	<0,01
	17	1 e 3	<0,01
	18	1	<0,05
	23	2	<0,05
	27	2	<0,05

As variáveis significativas ao teste de qui-quadrado foram testadas por regressão logística. Variáveis não significativas foram excluídas do modelo e os resultados finais da regressão estão expressos na Tabela 4.

TABELA 4 – Modelo final da regressão logística de haplótipos SNPs e enfermidades infecciosas em bovinos Curraleiro Pé-Duro

Patógeno	BTA	H p	Negativo (n)	Positivo (n)	Suspeito (n)	p	Odds	IC95%
Brucella	8	1	99,56% (1132/1137)	0,43% (5/1137)	0%(0/0)	0,009	0,202	0,06-0,67
	15	2	98,03% (349/356)	1,96% (7/356)	0%(0/0)	0,015	4	1,30-13,4
Leptospira	6	1	49,87% (200/401)	48,37% (194/401)	0%(0/0)	<0,01	1,588	1,25-2,01
	10	5	31,57% (6/19)	68,42% (13/19)	0%(0/0)	0,012	3,298	1,24-8,77
	15	2	62,64% (223/356)	36,79% (131/356)	0%(0/0)	<0,01	0,717	0,55-0,92
Neospora	6	6	82,85% (29/35)	17,14% (6/35)	0%(0/0)	<0,01	0,325	0,13-0,80
	10	2	3,33% (1/30)	56,66% (17/30)	0%(0/0)	0,013	2,605	1,21-5,56
	10	7	54,82% (159/290)	44,82% (130/290)	0%(0/0)	<0,01	1,486	1,12-1,98
	15	1	75,00% (96/128)	24,21% (31/128)	0%(0/0)	<0,01	0,424	0,27-0,66
	15	5	66,85% (476/712)	32,16% (229/712)	0%(0/0)	<0,01	0,528	0,41-0,67
	17	2	30,00% (9/30)	70,00% (21/30)	0%(0/0)	<0,01	3,842	1,68-8,76
	18	3	75,90% (63/83)	22,89% (19/83)	0%(0/0)	0,021	0,54	0,31-0,93
	18	1	55,08% (130/236)	44,06% (104/236)	0%(0/0)	<0,01	1,529	1,12-2,07
	27	1	66,62% (587/881)	32,34% (285/881)	0%(0/0)	<0,01	0,64	0,49-0,85
	27	3	48,63% (71/146)	51,36% (75/146)	0%(0/0)	0,018	1,61	1,08-2,41
	6	5	72,31% (222/307)	26,05% (80/307)	0,3%(1)	0,020	1,43	1,06-1,92
	15	1	67,18% (86/128)	32,81% (42/128)	0%(0)	0,038	1,546	1,03-2,31
VLB	15	2	81,46% (290/356)	15,16% (54/356)	0,2%(1)	<0,01	0,616	0,44-0,86
	27	3	85,61% (125/146)	13,69% (20/146)	0%(0)	0,015	0,56	0,34-0,92
BVDV	6	5	58,30% (179/307)	31,92% (98/307)	7,2%(22)	<0,01	0,669	0,51-0,87
	15	2	57,58% (205/356)	33,14% (118/356)	8,1%(29)	0,013	0,731	0,57-0,93
	23	2	63,63% (56/88)	26,13% (23/88)	10,2%(9)	0,030	0,611	0,38-0,96
	27	2	45,35% (171/377)	45,09% (170/377)	8,7%(33)	0,015	1,347	1,05-1,71
BoHV-1	15	2	38,48% (137/356)	60,39% (215/356)	0,8%(3)	0,028	0,744	0,57-0,96

BTA: *Bos taurus* autossome; Odds: odds ratio; IC: intervalo de confiança de 95%; Hp: haplótipo ou SNP; BoHV-1: herpesvirus bovino tipo 1, causador da rinotraqueite infecciosa bovina; BVDV: vírus da diarreia viral bovina; VLB: vírus da leucose bovina

Foi possível identificar potenciais loci de genes candidatos para a resistência bovina a doenças infecciosas nos dez cromossomos pesquisados. Os haplótipos do cromossomo BTA15 foram significativos contra todas as infecções. Dos 5 haplótipos descritos, os haplótipos um e dois (c15_h1 e c15_h2) foram mais frequentes em animais soronegativos. Os haplótipos um, cinco e seis no BTA6 foram mais frequentes em animais negativos contra leptospirose, neosporose, diarreia viral e leucose.

A regressão logística foi empregada para observar se a variável resposta (presença/ausência de anticorpos) possuía relação com os haplótipos de cada cromossomo e com as variáveis epidemiológicas. Não houve relação significativa entre os haplótipos e as infecções quando inseridas as variáveis epidemiológicas no modelo, sendo portanto os fatores de risco não significativamente associados com o tipo de haplótipo presente.

Foram encontrados blocos de haplótipos contendo dois, três e quatro SNPs que foram significativamente ($p < 0,05$) associados à positividade ou negatividade para a infecção. Os haplótipos foram, em geral, mais frequentes nos animais soronegativos. Portanto, associados à ausência de infecção. Embora não significativo e presente em apenas três animais, o haplótipo seis do cromossomo 10 esteve presente em todos os animais negativos contra *Brucella abortus*, *Leptospira* sp., *Neospora caninum* e contra o vírus da diarreia viral bovina.

Os haplótipos ou alelos mais comuns em animais negativos à *Neospora* sp. foram c6_h6, c10_h7, c15_h1, c15_h5, c18_h1, c18_h3 e c27_h1 e os mais comuns em animais positivos foram c10_h2, c17_h2 e c27_h3. Os haplótipos significativos ao vírus da leucose bovina (c6_h5, c15_h1, c27_h3, c15_h2) foram associados a indivíduos negativos.

Embora não estatisticamente significativos, alguns haplótipos estiveram presentes apenas em animais soronegativos ao teste contra *Brucella abortus*. Foram identificados no BTA5 os haplótipos/polimorfismos um (c5_h1), no BTA6 o haplótipo três (c6_h3), no BTA10 os haplótipos dois, quatro, cinco e seis (c10_h2, c10_h4, c10_h5, c10_h6); no BTA15 os haplótipos um, três e quatro (c15_h1, c15_h3 e c15_h4), no BTA17 o haplótipo dois (c17_h2) e no BTA23 os haplótipos dois e quatro (c23_h2, c23_h4).

4. Discussão

As altas frequências de *Leptospira* sp., *Neospora caninum*, IBR e BVD nos rebanhos CPD decorrem das doenças serem endêmicas. Portanto, a maior parte dos animais é exposta em alguma fase da vida, produzindo anticorpos.

Polimorfismos no BTA6 foram mais frequentes em animais negativos contra leptospirose, neosporose, diarreia viral e leucose, sugerindo que este cromossomo possui genes candidatos para a resistência a infecções. O BTA6 contém informações para codificar os receptores *toll like 10* (TLR10), células que atuam na resposta inata pelo reconhecimento de patógenos pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e evitando a invasão dos tecidos. Estes genes são expressos em células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e em famílias capazes de reconhecer bactérias, protozoários e fungos^{37, 38}.

Os patógenos investigados são transmitidos por via sexual e são importantes causadores de perdas reprodutivas em bovinos. Em humanos, as proteínas expressas pelos TLR10 são encontradas nos tecidos placentários e têm a função de proteger o feto. O TLR10 tem a função de ser co-receptor de TLR2, um agonista do peptídeoglicano de bactérias gram-

positivas e que age induzindo a apoptose celular e redução da secreção de quimiocinas³⁹. Animais que expressam corretamente TLR10 possuem maior capacidade de combater infecções e reduzem a transmissão dos patógenos.

O BTA15 foi associado a todas as infecções. Os SNPs selecionados no BTA15 estão presentes no gene da Interleucina 10 receptor subunidade alfa. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina produzida por células T CD4+, células B e macrófagos⁴⁰. A IL-10 tem potencial imunoregulatório de inibir as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados⁴¹ e diminuir a inflamação durante infecções, evitando o aparecimento de lesões deletérias. Contudo, também pode promover a persistência de patógenos ao interferir na resposta imune, como a persistência de *Leptospira* spp. nos rins dos animais reservatórios⁴².

A associação entre haplótipos no BTA15 e os animais soronegativos pode ser devido ao efeito regulatório da IL-10. Na infecção por *Leptospira* spp., a IL-10 aumenta a expressão nos primeiros dias pós-infecção em ratos resistentes, enquanto os níveis de citocinas pró-inflamatórias reduzem⁴³. O papel imunoprotetor da IL-10 durante a leptospirose é atenuar os efeitos deletérios causados pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 beta (IL-1 β), a qual está relacionada à falência dos órgãos nos hospedeiros infectados. Em contrapartida, exerce efeito inibitório no *clearance* bacteriano, fazendo com que as bactérias permaneçam nos rins e sejam eliminadas pelo hospedeiro⁴⁴.

O cromossomo X foi associado à neosporose ao teste do qui-quadrado porém não foi associado a nenhum patógeno na análise de regressão. Neste cromossomo são encontrados genes codificadores de TLR8. Os TLR8 reconhecem a invasão de vírus e induzem a resposta imune inata, portanto muitas vezes estão associados à diarreia viral bovina e à parainfluenza tipo 3, provocada pelo mesmo herpesvirus bovino tipo 1, causador da rinotraqueite infecciosa, além de outras doenças virais. Como essas doenças são disseminadas, é provável que os animais estejam expostos por muito tempo e, por pressão evolutiva, a interação patógeno-ambiente de populações ancestrais podem ter gerado padrões de variação dentro dos genes TLR3 e TLR8 que são vistas como assinaturas de seleção³⁷.

O SNP rs29026690, neste trabalho associado ao vírus da diarreia viral bovina, foi descrito em um estudo de associação ampla do genoma ao aumento da carga pró-viral do vírus da leucose bovina em rebanhos Negro Japonês (*odds ratio* 2,745), dentro de um loco de características quantitativas independentes (QTL - *quantitative trait loci*) no cromossomo 23. No mesmo estudo identificaram associação menor da doença com o SNP rs17872126 (*odds ratio* 0,414)²⁹.

Na análise dos haplótipos associados às infecções foram identificadas diferenças significativas nos cromossomos 5, 6, 8, 10, 15, 17, 18, 27, X. Haplótipos do BTA15 e BTA27 tiveram alta taxa de animais soronegativos, podendo indicar um possível genótipo de resistência ao vírus da leucose bovina. Por outro lado, 70% dos animais positivos à infecção por *Neospora caninum* possuíam o haplótipo 2 do BTA17.

O rebanho e a raça dos animais foram variáveis significativas em um estudo de associação da infecção por paratuberculose e SNPs na região do gene IFNG bovino, que codifica interferons gama com importante função na resposta inata do hospedeiro. Neste estudo, os alelos e haplótipos foram significativos apenas quando não associados a outras variáveis explicativas. A não associação entre os haplótipos e as características epidemiológicas na resposta a uma infecção, observado neste estudo, não infere a falta de associação. As conclusões obtidas por estudos epidemiológicos de caso-controle são limitadas e diferenças na suscetibilidade dos animais devem considerar diversos fatores, entre eles os erros de classificação dos indivíduos nas categorias caso (positivo) e controle (negativo)¹⁰, como ocorre em alguns testes sorológicos.

Mesmo que outros estudos mostrem possibilidade de resultados significativos entre marcadores e características, a forma com que isto ocorre nas populações pode não ser replicável. Se o mesmo loco de características quantitativas está segregando em diferentes populações, mesmo assim os resultados serão diferentes porque as frequências alélicas para cada marcador e as mutações também são diferentes. A resistência genética pode apresentar vários fenótipos, como indivíduos expostos mas que não desenvolvem infecção, expostos que se tornam portadores assintomáticos, e indivíduos que desenvolvem os sinais clínicos da doença, mas conseguem se curar^{6, 45}.

Os alelos que conferem resistência em uma raça precisam ser validados em outras raças. Foi observado que os alelos associados a menor carga de infestação por carrapatos não exercem a mesma função em diferentes populações. Os marcadores genéticos ou haplótipos não mostram efeitos precisos entre diferentes raças³¹, indicando que encontrar um marcador associado a uma característica de resistência ou de suscetibilidade que seja útil em diferentes populações e raças é muito difícil para qualquer estudo de associação, seja voltado à infestação de carrapatos ou para infecção por vírus, bactérias, parasitos ou fungos.

Animais de raças locais apresentam provada capacidade de resistência a infecções, entretanto, a seleção para características de resistência ainda está em fase inicial. Animais da raça CPD podem ser desafiados imunologicamente para a observação do tipo e magnitude da resposta imune em animais portadores dos haplótipos identificados como marcadores de

resistência. Os animais portadores dos alelos de resistência devem ser inseridos em programas de melhoramento animal e ter seu material genético no banco de germoplasma.

Sabe-se que as características de produção têm sido amplamente pesquisadas devido ao retorno econômico direto. Porém, os investimentos na sanidade e desenvolvimento da biotecnologia tornam viável o controle de enfermidades via marcadores moleculares como forma de suporte às estratégias sanitárias já empregadas.

5. Conclusão

Existem marcadores tipo SNP relacionados ao risco de enfermidades infecciosas em animais da raça Curraleiro Pé-Duro. Os polimorfismos formaram blocos de haplótipos para cada cromossomo e os cromossomos 5, 6, 8, 10, 15, 17, 18, 27, X foram associados a enfermidades. O haplótipo 2 do BTA17 está presente em 70% dos animais positivos à infecção por *Neospora caninum* enquanto haplótipos nos BTA6 e BTA15, relacionados a interleucina 10 e *toll like receptor* 10, são mais frequentes em animais soronegativos.

Todas as propriedades testadas apresentaram animais positivos para três ou mais patógenos, indicando a ampla exposição. A presença de haplótipos em alto número de animais negativos, em áreas endêmicas, pode indicar resistência genética às enfermidades nos animais da raça Curraleiro Pé-Duro.

Referências

1. Egito AAd, Fioravanti MCS, Grattapaglia D, Ramos AF, Albuquerque MdSM, Mariante AdS. Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça curraleira de diferentes regiões do Brasil. 2011.
2. Fioravanti MCS, Juliano RS, Costa GL, Abud LJ, Cardoso VS, Carpio MG, et al. Conservación del bovino Curraleiro: Cuantificación del censo y caracterización de los criadores. Anim Genet Resources. 2011;48:109-16.
3. Carvalho GMC, Almeida M, Azevêdo D, Araujo Neto R, Leal TM, Monteiro F, et al. Caracterização fenotípica do gado Pé-Duro do Nordeste do Brasil. Bol pesqui desenvolv. Embrapa Meio-Norte. 2010;93.
4. Maggioli MF, Lobo JR, Fioravanti MCS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Cellular immune response of Curraleiro Pé-duro and Nellore calves following *Mycobacterium bovis*-BCG vaccination. Pesq Vet Bras. 2013;33:1403-8.

5. Moraes JM, Brito LAB, Moura VMBDD, Ribeiro CS, Guimarães VY, Andrade DF, et al. Immunophenotyping and quantitative evaluation of circulating lymphocytes of cattle of the Curraleiro breed. *Pesq Vet Bras.* 2009;29(4):339-44.
6. Bermingham ML, Bishop SC, Woolliams JA, Pong-Wong R, Allen AR, McBride SH, et al. Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity (Edinb).* 2014;112(5):543-51.
7. Thoen C, LoBue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.* 2006;112(2):339-45.
8. de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 2006;81(2):190-210.
9. Bishop SC, Woolliams JA. Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science.* 2014;166:190-8.
10. Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, et al. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med.* 2009;91(2-4):189-96.
11. Gonda MG, Chang YM, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW. Genetic variation of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection in US Holsteins. *Journal of Dairy Science.* 2006;89(5):1804-12.
12. Díaz S, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. *Analecta Veterinaria.* 2005;25.
13. Grosse WM, Kappes SM, Laegreid WW, Keele JW, Chitko-McKown CG, Heaton MP. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mamm Genome.* 1999;10(11):1062-9.
14. Brotherstone S, White IM, Coffey M, Downs SH, Mitchell AP, Clifton-Hadley RS, et al. Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J Dairy Sci.* 2010;93(3):1234-42.
15. Kadarmideen HN, Ali AA, Thomson PC, Müller B, Zinsstag J. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Anim Genet.* 2011;42(6):656-8.
16. Sun L, Song Y, Riaz H, Yang H, Hua G, Guo A, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;147(3-4):195-201.
17. Berry DP, Bermingham ML, Good M, More SJ. Genetics of animal health and disease in cattle. *Irish Veterinary Journal.* 2011;64(1):5.
18. Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.* 1996;6(10):956-64.

19. Lewin HA, Bernoco D. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim Genet*. 1986;17(3):197-207.
20. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Archivos de medicina veterinaria*. 2006;38:7-18.
21. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun*. 2002;70(3):1033-41.
22. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*. 2001;3(1):43-8.
23. Faisal SM, Varma VP, Subathra M, Azam S, Sunkara AK, Akif M, et al. Leptospira surface adhesin (Lsa21) induces Toll like receptor 2 and 4 mediated inflammatory responses in macrophages. *Scientific Reports*. 2016;6:39530.
24. Nishi SM, Viero LM, Soares RM, Maiorka PC, Gennari SM. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2009;18:8-14.
25. Adler H, Jungi TW, Pfister H, Strasser M, Sileghem M, Peterhans E. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol*. 1996;70(4):2650.
26. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
27. Neto LRP, Bunch RJ, Harrison BE, Prayaga KC, Barendse W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. *BMC genetics*. 2010;11(1):55.
28. Pighetti GM, Elliott AA. Gene Polymorphisms: The Keys for Marker Assisted Selection and Unraveling Core Regulatory Pathways for Mastitis Resistance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2011;16(4):421-32.
29. Takeshima SN, Sasaki S, Meripet P, Sugimoto Y, Aida Y. Single nucleotide polymorphisms in the bovine MHC region of Japanese Black cattle are associated with bovine leukemia virus proviral load. *Retrovirology*. 2017;14(1):24.
30. Vázquez P, Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, et al. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle. *Vet Med Int*. 2014;321327. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/321327>.
31. Porto Neto LR, Bunch RJ, Harrison BE, Prayaga KC, Barendse W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle.(Research article)(Report). *BMC Genetics*. 2010;11:55.
32. Robinson P, Holme DJ. KASP version 4.0 SNP Genotyping Manual. 2011. p. 8.

33. Cesconeto RJ, Joost S, McManus CM, Paiva SR, Cobuci JA, Braccini J. Landscape genomic approach to detect selection signatures in locally adapted Brazilian swine genetic groups. *Ecol Evol*. 2017;7(22):9544-56.
34. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89.
35. Stephens M, Scheet P. Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *Am J Hum Genet*. 2005;76(3):449-62.
36. Development Core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2011.
37. Fisher CA, Bhattarai EK, Osterstock JB, Dowd SE, Seabury PM, Vikram M, et al. Evolution of the bovine TLR gene family and member associations with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *PloS One*. 2011;6(11):e27744.
38. Jann OC, King A, Corrales NL, Anderson SI, Jensen K, Ait-ali T, et al. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC Genomics*. 2009;10(1):216.
39. Mulla MJ, Myrtolli K, Tadesse S, Stanwood NL, Garipey A, Guller S, et al. Cutting-edge report: TLR10 plays a role in mediating bacterial peptidoglycan-induced trophoblast apoptosis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(5):449-53.
40. Brown WC, Woods VM, Chitko-McKown CG, Hash SM, Rice-Ficht AC. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect Immun*. 1994;62(11):4697-708.
41. Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, et al. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):260-65
42. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol*. 2012;3:30.
43. Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: Comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun*. 2011;79(11):4480-92.
44. Matsui M, Roche L, Soupé-Gilbert M-E, Hasan M, Monchy D, Goarant C. High level of IL-10 expression in the blood of animal models possibly relates to resistance against leptospirosis. *Cytokine*. 2017;96:144-51.
45. Allen AR, Minozzi G, Glass EJ, Skuce RA, McDowell SW, Woolliams JA, et al. Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. *Proc Biol Sci*. 2010;277(1695):2737-45.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos sobre a raça Curraleiro Pé-Duro demonstram a sua variabilidade genética, capacidade de resistência às enfermidades, às plantas tóxicas e potencial uso no cruzamento com outras raças. Percebe-se o valor da raça e a seriedade com que deve ser tratada sua conservação.

Nos capítulos referentes às análises de caracterização racial, identificação de microssatélites relacionados à resposta imune e no capítulo dos SNPs de resposta imune foram identificados padrões semelhantes que indicam variabilidade na raça juntamente a um aumento de homozigotos. Inicialmente foi demonstrado que os animais se dividem em três *clusters* genéticos que possuem clara distinção entre os animais do Piauí e Tocantins, sugerindo que as populações estão se diferenciando.

Os *clusters* genéticos de características raciais se assemelham, em termos de prevalência de animais soropositivos, a *clusters* baseados em características ambientais. Mesmo distintas, a variação é maior dentro dos rebanhos, sugerindo que em um mesmo rebanho animais podem ter diferentes genótipos, que compartilham com outras populações. A troca de animais entre rebanhos pode explicar o compartilhamento de alelos.

A análise de marcadores na região do gene BoLA não permitiu diferenciar claramente os animais em haplótipos e relacioná-los a ocorrência das infecções devido ao elevado número de alelos por marcador. Portanto, pela análise de haplótipos não foi possível inferir associação e doenças, porém à análise de agrupamento foi possível novamente dividir a população em dois *clusters*. Ao comparar os resultados com a presença de haplótipos de SNPs foi observada a associação infecção-marcadores. Porém, cada patógeno estabelece uma associação com um marcador específico, que está relacionado ao tipo de infecção produzida. A presença de animais positivos foi relacionada ao fenótipo suscetível. No entanto, não foi possível diferenciar pelos métodos empregados um fenótipo “resistente”.

A análise dos marcadores de caracterização racial indicou que os agrupamentos ambientais diferenciaram a raça geneticamente. Assim, o isolamento geográfico também indicou um isolamento reprodutivo, fazendo com que nos diferentes ambientes as frequências alélicas tenham separado a raça em três grupos distintos sendo que os rebanhos de Goiás e alguns do Tocantins estariam na faixa de transição de *clusters*, enquanto os rebanhos do Piauí são os que mais se distinguem.

Foram identificados SNPs ligados ao loci SLC11A1 e ao gene BoLA relacionados às infecções. Polimorfismos no BTA15 foram associados a todas as infecções e no BTA6 foram relacionados ao maior número de soronegativos.

A conservação das raças e identificação de marcadores genéticos relacionados à resposta imune são apenas algumas das diversas possibilidades que a biologia molecular proporciona ao vasto horizonte do conhecimento dos fatores que envolvem a interação hospedeiro-patógeno-ambiente. O paradoxo entre a conservação da riqueza alélica e o melhoramento genético das espécies, que seleciona os alelos de interesse, faz com que a pecuária passe por adaptações para suprir as necessidades presentes e futuras. Reconhecer o valor dos recursos genéticos é fundamental para a própria sobrevivência da atividade.

Preocupados com a conservação da biodiversidade dos animais domésticos de raças locais, pesquisadores da Espanha, Portugal, América Latina e outros países se uniram para criar a Rede Conbiand – *Asociación sobre la conservación de la biodiversidad de los animales domésticos locales para el desarrollo rural sostenible*. A Rede trabalha em projetos de colaboração nacional e entre países para propagar a legitimidade das raças locais de animais domésticos e promover a conservação, com pesquisas nas áreas de genética, zootecnia, sistemas de vida, desenvolvimento rural e produtos derivados dos recursos genéticos.

A genética de conservação usa a informação da diversidade alélica para identificar áreas ou espécies ameaçadas e implementar as políticas de conservação. Os projetos de conservação da biodiversidade de espécies domésticas são o BioBovis, BioPig, BioGoat, BioHorse, BioOvis, BioTurkey, BioChicken, BioDonkey, BioCuy que formam um banco de dados de conservação de espécies do mundo inteiro. Juntamente a esses, soma-se o TRASIBER (Traspatio Iberoamericano), voltado aos recursos animais na produção agropecuária familiar de pequena escala, e o MAMORESE, projeto que visa demonstrar a importância de selecionar animais domésticos com superior resistência inata a doenças. O presente estudo é o primeiro inserido no projeto MAMORESE e os resultados aqui obtidos fundamentarão estudos futuros para a seleção de marcadores de resistência e desafio imunológico da raça CPD com tais marcadores de resistência para validação dos mesmos.

Os resultados genéticos da raça Curraleiro Pé-Duro servem de apoio para estudos em outras raças e auxiliam na seleção de animais mais resistentes, reduzindo o uso de medicamentos, minimizando o custo de produção, melhorando a saúde dos consumidores dos produtos de origem animal e reduzindo o prejuízo ambiental decorrente dos resíduos antimicrobianos.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Brucella* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
DBRP1-115	*/*	50,00 (3/6)	84,2 (677/804)	0,016
	115/*	33,33 (2/6)	14,93 (120/804)	
	115/115	16,67 (1/6)	0,87 (7/804)	
1687-213	*/*	66,67 (4/6)	93,53 (752/804)	0,012
	213/*	16,67 (1/6)	6,09 (49/804)	
	213/213	16,67 (1/6)	0,37 (3/804)	
171-326	*/*	66,67 (4/6)	26,87 (216/804)	0,00487
	326/*	16,67 (1/6)	39,05 (314/804)	
	326/326	16,67 (1/6)	34,08 (274/804)	
1870-145	*/*	66,67 (4/6)	97,29 (782/804)	0,01174
	145/*	33,33 (2/6)	2,49 (20/804)	
	145/145	0 (0/6)	0,25 (2/804)	
312-309	*/*	83,33 (5/6)	95,9 (771/804)	0,02302
	309/*	0 (0/6)	3,86 (31/804)	
	309/309	16,67 (1/6)	0,25 (2/804)	

Table S2 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leptospira* sp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
AGER-316	*/*	67,80 (240/354)	61,73 (279/452)	0,00
	316/*	29,66 (105/354)	30,53 (138/452)	
	316/316	2,54 (9/354)	7,74 (35/452)	
DRB3-178	*/*	81,07 (287/354)	88,5 (400/452)	0,01
	178/*	17,80 (63/354)	11,06 (50/452)	
	178/178	1,13 (4/354)	0,44 (2/452)	
DRB3-182	*/*	84,18 (298/354)	90,71 (410/452)	0,00
	182/*	14,41 (51/354)	9,29 (42/452)	
	182/182	1,41 (5/354)	0 (0/452)	
LA54-165	*/*	95,76 (339/354)	98,45 (445/452)	0,03
	165/*	4,24 (15/354)	1,55 (7/452)	
	165/165	0 (0/354)	0 (0/452)	
LA54-171	*/*	85,03 (301/354)	94,91 (429/452)	0,00
	171/*	12,15 (43/354)	4,87 (22/452)	
	171/171	2,82 (10/354)	0,22 (1/452)	
LA54-177	*/*	98,59 (349/354)	94,91 (429/452)	0,01
	177/*	1,13 (4/354)	4,65 (21/452)	
	177/177	0,28 (1/354)	0,44 (2/452)	
LA54-195	*/*	98,02 (347/354)	98,89 (447/452)	0,03
	195/*	1,98 (7/354)	0,44 (2/452)	
	195/195	0 (0/354)	0,66 (3/452)	
LA54-197	*/*	87,85 (311/354)	92,7 (419/452)	0,05
	197/*	11,58 (41/354)	6,64 (30/452)	
	197/197	0,56 (2/354)	0,66 (3/452)	
1268-249	*/*	37,29 (132/354)	46,46 (210/452)	0,01
	249/*	49,72 (176/354)	39,6 (179/452)	
	249/249	12,99 (46/354)	13,94 (63/452)	

Table S2 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leptospira* sp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
1268-251	*/*	82,49 (292/354)	87,61 (396/452)	0,04
	251/*	15,54 (55/354)	11,95 (54/452)	
	251/251	1,98 (7/354)	0,44 (2/452)	
1687-217	*/*	89,55 (317/354)	94,69 (428/452)	0,01
	217/*	9,89 (35/354)	4,87 (22/452)	
	217/217	0,56 (2/354)	0,44 (2/452)	
1687-241	*/*	83,05 (294/354)	74,78 (338/452)	0,01
	241/*	16,38 (58/354)	22,79 (103/452)	
	241/241	0,56 (2/354)	2,43 (11/452)	
1687-243	*/*	96,05 (340/354)	99,12 (448/452)	0,01
	243/*	36,95 (14/354)	0,88 (4/452)	
	243/243	0 (0/354)	0 (0/452)	
171-322	*/*	74,01 (262/354)	80,31 (363/452)	0,05
	322/*	23,73 (84/354)	16,81 (76/452)	
	322/322	2,26 (8/354)	2,88 (13/452)	
171-324	*/*	57,06 (202/354)	67,04 (303/452)	0,01
	324/*	34,18 (121/354)	25,44 (115/452)	
	324/324	8,76 (31/354)	7,52 (34/452)	
171-326	*/*	30,51 (108/354)	24,56 (111/452)	0,00
	326/*	42,94 (152/354)	35,62 (161/452)	
	326/326	26,55 (94/354)	39,82 (180/452)	
1778-241	*/*	85,03 (301/354)	79,65 (360/452)	0,02
	241/*	7,34 (26/354)	13,5 (61/452)	
	241/241	7,63 (27/354)	6,86 (31/452)	
1778-243	*/*	96,33 (341/354)	99,56 (450/452)	0,00
	243/*	2,82 (10/354)	0,44 (2/452)	
	243/243	0,85 (3/354)	0 (0/452)	

Table S2 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leptospira* sp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
1778-245	*/*	91,81 (325/354)	86,73 (392/452)	0,03
	245/*	5,65 (20/354)	10,84 (49/452)	
	245/245	2,54 (9/354)	2,43 (11/452)	
1870-145	*/*	98,87 (350/354)	95,58 (432/452)	0,00
	145/*	0,85 (3/354)	4,2 (19/452)	
	145/145	0,28 (1/354)	0,22 (1/452)	
1870-149	*/*	97,74 (346/354)	93,58 (423/452)	0,02
	149/*	1,98 (7/354)	5,09 (23/452)	
	149/149	0,28 (1/354)	1,33 (6/452)	
1870-151	*/*	30,79 (109/354)	38,5 (174/452)	0,02
	151/*	34,75 (123/354)	35,4 (160/452)	
	151/151	34,46 (122/354)	26,11 (118/452)	
1870-161	*/*	82,77 (293/354)	75,44 (341/452)	0,03
	161/*	16,38 (58/354)	22,79 (103/452)	
	161/161	0,85 (3/354)	1,77 (8/452)	
312-287	*/*	96,05 (340/354)	93,81 (424/452)	0,001
	287/*	2,54 (9/354)	6,19 (28/452)	
	287/287	1,41 (5/354)	0 (0/452)	
312-289	*/*	48,59 (172/354)	53,54 (242/452)	0,002
	289/*	44,35 (157/354)	34,07 (154/452)	
	289/289	7,06 (25/354)	12,39 (56/452)	
312-292	*/*	97,46 (345/354)	99,56 (450/452)	0,01
	292/*	2,54 (9/354)	0,44 (2/452)	
	292/292	0 (0/354)	0 (0/452)	
312-311	*/*	88,14 (312/354)	81,42 (368/452)	0,025
	311/*	10,3 (38/354)	17,48 (79/452)	
	311/311	1,13 (4/354)	1,11 (5/452)	

Table S2 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leptospira* sp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
415-457	*/*	96,89 (343/354)	92,26 (417/452)	0,002
	457/*	0,56 (2/354)	0,22 (1/452)	
	457/457	2,54 (9/354)	7,52 (34/452)	
SLC-281	*/*	20,34 (72/354)	13,94 (63/452)	0,050
	281/*	32,2 (114/354)	36,28 (164/452)	
	281/281	47,46 (168/354)	49,78 (225/452)	
SLC-285	*/*	87,29 (309/354)	86,73 (392/452)	0,010
	285/*	9,89 (35/354)	12,83 (58/452)	
	285/285	2,82 (10/354)	0,44 (2/452)	

Table S3 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Neospora* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
AGER-312	*/*	28,99 (80/276)	38,11 (202/530)	0,03
	312/*	49,64 (137/276)	43,96 (233/530)	
	312/312	21,38 (59/276)	17,92 (95/530)	
AGER-314	*/*	61,59 (170/276)	52,83 (280/530)	0,00
	314/*	32,61 (90/276)	33,96 (180/530)	
	314/314	5,8 (16/276)	13,21 (70/530)	
AGER-316	*/*	59,78 (165/276)	66,98 (355/530)	0,05
	316/*	35,51 (98/276)	27,17 (144/530)	
	316/316	4,71 (13/276)	5,85 (31/530)	
AGER-318	*/*	98,91 (273/276)	95,66 (507/530)	0,01
	318/*	1,09 (3/276)	4,34 (23/530)	
	318/318	0 (0/276)	0 (0/530)	
DBRP1-123	*/*	88,77 (245/276)	77,55 (411/530)	0,00
	123/*	10,51 (29/276)	20,19 (107/530)	
	123/123	0,72 (2/276)	2,26 (12/530)	
DBRP1-129	*/*	89,13 (246/276)	94,53 (501/530)	0,01
	129/*	10,51 (29/276)	4,91 (26/530)	
	129/129	0,36 (1/276)	0,57 (3/530)	
DRB3-162	*/*	79,66 (196/276)	77,65 (437/530)	0,00
	162/*	18,36 (70/276)	19,69 (84/530)	
	162/162	1,98 (10/276)	2,65 (9/530)	
DRB3-176	*/*	51,45 (142/276)	61,7 (327/530)	0,01
	176/*	44,93 (124/276)	33,58 (178/530)	
	176/176	3,62 (10/276)	4,72 (25/530)	
DRB3-180	*/*	97,46 (269/276)	90,57 (480/530)	0,00
	180/*	2,54 (7/276)	8,49 (45/530)	
	180/180	0 (0/276)	0,94 (5/530)	

Table S3 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Neospora* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
LA54-165	*/*	98,91 (273/276)	96,23 (510/530)	0,04
	165/*	1,09 (3/276)	3,77 (20/530)	
	165/165	0 (0/276)	0 (0/530)	
LA54-183	*/*	34,06 (94/276)	51,32 (272/530)	<0,01
	183/*	42,75 (118/276)	34,34 (182/530)	
	183/183	23,19 (64/276)	14,34 (76/530)	
LA54-185	*/*	99,28 (274/276)	94,72 (502/530)	0,00
	185/*	0,72 (2/276)	3,58 (19/530)	
	185/185	0 (0/276)	1,7 (9/530)	
LA54-193	*/*	98,91 (273/276)	95,47 (506/530)	0,03
	193/*	1,09 (3/276)	3,4 (18/530)	
	193/193	0 (0/276)	1,13 (6/530)	
LA54-203	*/*	98,55 (272/276)	95,28 (505/530)	0,02
	203/*	1,45 (4/276)	4,72 (25/530)	
	203/203	0 (0/276)	0 (0/530)	
1268-243	*/*	89,86 (248/276)	94,91 (503/530)	0,01
	243/*	10,14 (28/276)	4,91 (26/530)	
	243/243	0 (0/276)	0,19 (1/530)	
1687-215	*/*	96,01 (265/276)	90,75 (481/530)	0,01
	215/*	3,99 (11/276)	9,06 (48/530)	
	215/215	0 (0/276)	0,19 (1/530)	
1687-221	*/*	93,48 (258/276)	98,49 (522/530)	0,00
	221/*	5,43 (15/276)	1,13 (6/530)	
	221/221	1,09 (3/276)	0,38 (2/530)	
1687-223	*/*	99,28 (274/276)	94,34 (500/530)	0,00
	223/*	0,72 (2/276)	5,09 (27/530)	
	223/223	0 (0/276)	0,57 (3/530)	
1687-237	*/*	52,9 (146/276)	44,72 (237/530)	0,03
	237/*	36,23 (100/276)	38,68 (205/530)	
	237/237	10,87 (30/276)	16,6 (88/530)	

Table S3 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Neospora* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
1687-241	*/*	67,03 (185/276)	84,15 (446/530)	<0,01
	241/*	32,61 (90/276)	13,58 (72/530)	
	241/241	0,36 (1/276)	2,26 (12/530)	
171-324	*/*	67,75 (187/276)	60 (318/530)	0,02
	324/*	27,54 (76/276)	30,19 (160/530)	
	324/324	4,71 (13/276)	9,81 (52/530)	
171-328	*/*	86,59 (239/276)	95,85 (508/530)	<0,01
	328/*	7,61 (21/276)	3,21 (17/530)	
	328/328	5,8 (16/276)	0,94 (5/530)	
1778-237	*/*	72,46 (200/276)	60,75 (322/530)	0,00
	237/*	16,3 (45/276)	20,38 (108/530)	
	237/237	11,23 (31/276)	18,87 (100/530)	
1778-241	*/*	75 (207/276)	85,47 (453/530)	0,00
	241/*	14,19 (40/276)	8,87 (47/530)	
	241/241	10,51 (29/276)	5,66 (30/530)	
1778-245	*/*	85,87 (237/276)	90,57 (480/530)	0,03
	245/*	9,78 (27/276)	7,92 (42/530)	
	245/245	4,35 (12/276)	1,51 (8/530)	
1778-247	*/*	98,55 (272/276)	94,72 (502/530)	0,02
	247/*	1,45 (4/276)	4,72 (25/530)	
	247/247	0 (0/276)	0,57 (3/530)	
1778-273	*/*	79,71 (220/276)	86,04 (502/530)	0,01
	273/*	7,97 (22/276)	7,92 (25/530)	
	273/273	12,32 (34/276)	6,04 (3/530)	
1870-145	*/*	99,28 (274/276)	95,85 (508/530)	0,01
	145/*	0,72 (2/276)	3,77 (20/530)	
	145/145	0 (0/276)	0,38 (2/530)	
1870-149	*/*	97,83 (270/276)	94,15 (499/530)	0,04
	149/*	2,17 (6/276)	4,53 (24/530)	
	149/149	0 (0/276)	1,32 (7/530)	

Table S3 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Neospora* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
1870-151	*/*	29,71 (82/276)	37,92 (201/530)	0,00
	151/*	42,75 (118/276)	31,13 (165/530)	
	151/151	27,54 (76/276)	30,94 (164/530)	
1870-161	*/*	65,58 (181/276)	85,28 (452/530)	<0,01
	161/*	32,61 (90/276)	13,58 (72/530)	
	161/161	1,81 (5/276)	1,13 (6/530)	
312-292	*/*	99,64 (268/276)	99,43 (527/530)	0,01
	292/*	0,36 (8/276)	0,57 (3/530)	
	292/292	0 (0/276)	- (0/530)	
312-309	*/*	98,55 (272/276)	94,34 (500/530)	0,01
	309/*	1,45 (4/276)	5,09 (27/530)	
	309/309	0 (0/276)	0,57 (3/530)	
415-455	*/*	28,62 (79/276)	21,32 (113/530)	0,04
	455/*	11,59 (32/276)	10 (53/530)	
	455/455	59,78 (165/276)	68,68 (364/530)	
415-457	*/*	89,13 (246/276)	96,98 (514/530)	<0,01
	457/*	0,36 (1/276)	0,38 (2/530)	
	457/457	10,51 (29/276)	2,64 (14/530)	
RM185-90	*/*	94,2 (260/276)	100 (530/530)	<0,01
	90/*	4,71 (13/276)	0 (0/530)	
	90/90	1,09 (3/276)	0 (0/530)	
RM185-92	*/*	75,72 (209/276)	55,09 (292/530)	<0,01
	92/*	18,84 (52/276)	34,53 (183/530)	
	92/92	5,43 (15/276)	10,38 (55/530)	
RM185-94	*/*	82,97 (229/276)	88,68 (470/530)	0,02
	94/*	12,32 (34/276)	9,62 (51/530)	
	94/94	4,71 (13/276)	1,7 (9/530)	
RM185-104	*/*	68,12 (188/276)	76,6 (406/530)	0,05
	104/*	24,28 (67/276)	21,89 (116/530)	
	104/104	7,61 (21/276)	1,51 (8/530)	

Table S3 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Neospora* spp. infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
RM185-106	*/*	78,62 (217/276)	88,11 (467/530)	0,00
	106/*	19,57 (54/276)	10,94 (58/530)	
	106/106	1,81 (5/276)	0,94 (5/530)	
SLC-279	*/*	67,39 (186/276)	77,92 (413/530)	0,01
	279/*	27,9 (77/276)	18,87 (100/530)	
	279/279	4,71 (13/276)	3,21 (17/530)	
SLC-283	*/*	96,38 (266/276)	91,7 (486/530)	0,04
	283/*	2,9 (8/276)	6,42 (34/530)	
	283/283	0,72 (2/276)	1,89 (10/530)	

Table S4 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leukosis* infection among Curraleiro Pé-Duro breed

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
AGER-310	*/*	77,84 (137/176)	87,9 (545/620)	0,00
	310/*	18,18 (32/176)	11,45 (71/620)	
	310/310	3,98 (7/176)	0,65 (4/620)	
DBRP1-135	*/*	89,77 (158/176)	96,77 (600/620)	<0,01
	135/*	9,09 (16/176)	3,06 (19/620)	
	135/135	1,14 (2/176)	0,16 (1/620)	
DRB3-180	*/*	89,20 (157/176)	94,35 (585/620)	0,00
	180/*	9,66 (17/176)	5,16 (32/620)	
	180/180	1,14 (2/176)	0,48 (3/620)	
DRB3-188	*/*	91,48 (91,48/0)	97,74 (97,74/0)	0,00
	188/*	7,95 (7,95/0)	2,26 (2,26/0)	
	188/188	0,57 (0,57/0)	0 (0/0)	
LA54-171	*/*	84,09 (148/176)	92,26 (572/620)	0,02
	171/*	13,64 (24/176)	6,61 (41/620)	
	171/171	2,27 (4/176)	1,13 (7/620)	
LA54-193	*/*	91,48 (161/176)	98,39 (610/620)	<0,01
	193/*	6,25 (11/176)	1,29 (8/620)	
	193/193	2,27 (4/176)	0,32 (2/620)	
LA54-203	*/*	98,3 (173/176)	96,29 (597/620)	0,05
	203/*	1,7 (3/176)	3,71 (23/620)	
	203/203	0 (0/176)	0 (0/620)	

Table S4 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for *Leukosis* infection among Curraleiro Pé-Duro breed (continued)

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
1268-244	*/*	87,5 (154/176)	95,97 (595/620)	0,00
	244/*	10,23 (18/176)	3,87 (24/620)	
	244/244	2,27 (4/176)	0,16 (1/620)	
1687-223	*/*	90,34 (159/176)	97,74 (606/620)	<0,01
	223/*	8,52 (15/176)	2,1 (13/620)	
	223/223	1,14 (2/176)	0,16 (1/620)	
1687-235	*/*	99,43 (175/176)	99,35 (616/620)	0,03
	235/*	0,57 (1/176)	0,65 (4/620)	
	235/235	0 (0/176)	0 (0/620)	
1687-241	*/*	84,66 (149/176)	76,61 (475/620)	0,01
	241/*	13,64 (24/176)	21,94 (136/620)	
	241/241	1,7 (3/176)	1,45 (9/620)	
1778-241	*/*	88,07 (155/176)	80,32 (498/620)	0,01
	241/*	6,25 (11/176)	12,1 (75/620)	
	241/241	5,68 (10/176)	7,58 (47/620)	
1870-155	*/*	80,68 (142/176)	90,32 (560/620)	0,01
	155/*	14,77 (26/176)	7,9 (49/620)	
	155/155	4,55 (8/176)	1,77 (11/620)	
312-297	*/*	86,36 (152/176)	94,03 (583/620)	0,00
	297/*	11,93 (21/176)	5,97 (37/620)	
	297/297	1,7 (3/176)	0 (0/620)	
RM185-88	*/*	96,59 (170/176)	100 (620/620)	0,00
	88/*	3,41 (6/176)	0 (0/620)	
	88/88	0 (0/176)	0 (0/620)	
RM185-92	*/*	65,91 (116/176)	61,29 (380/620)	0,04
	92/*	29,55 (52/176)	28,39 (176/620)	
	92/92	4,55 (8/176)	10,32 (64/620)	
RM185-100	*/*	59,66 (105/176)	75,97 (471/620)	0,00
	100/*	34,66 (61/176)	21,61 (134/620)	
	100/100	5,68 (10/176)	2,42 (15/620)	

Table S5 - Results of univariate analysis of the positive animals odds for BVDV infection among Curraleiro Pé-Duro breed

Polymorphism	Genotype	Infected (%)	Non-infected (%)	p-value (Fisher)
DRB3-162	*/*	81,87 (280/342)	76,96 (304/395)	0,02
	162/*	16,08 (55/342)	21,27 (84/395)	
	162/162	2,05 (7/342)	1,77 (7/395)	
DRB3-178	*/*	78,36 (268/342)	90,89 (359/395)	<0,01
	178/*	20,47 (70/342)	8,61 (34/395)	
	178/178	1,17 (4/342)	0,51 (2/395)	