

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS GENES
B-F (MHC CLASSE I) E DE UM MICROSSATÉLITE ASSOCIADO
EM GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS**

CARLOS ANDRÉ DA VEIGA LIMA ROSA

Orientador: Francisco Mauro Salzano

Co-orientador: Cláudio Wageck Canal

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências

Porto Alegre

Fevereiro/2004

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(PROPESQ/UFRGS)

Na minha infância, os meus irmãos e primos criavam, como animais de estimação, cães, gatos e cavalos. Eu criava galinhas.

Dedico esta Tese aos “mestres” Margarete Suñé Mattevi, Francisco M. Salzano e Cláudio W. Canal. Todos acreditaram em mim, pois têm, em comum, uma característica admirável: boa vontade.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta Tese só foi possível porque eu encontrei duas pessoas fundamentais que aceitaram orientá-la. Eu tenho muito a agradecer aos Professores Dr. Francisco M. Salzano e Dr. Cláudio W. Canal, não só pelo excelente trabalho de orientação, mas também por possibilitarem a realização de um objetivo há muito sonhado. Muito, muito obrigado.

À Dra. Loreta B. de Freitas pelo apoio e orientação laboratorial.

Aos meus amigos e co-autores André F. Streck, Andres D. Cañedo e Paulo R. V. Fallavena que “colocaram a mão na massa” junto comigo.

Ao Dr. Sandro Bonatto por ter aberto as portas do Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul no qual parte deste trabalho foi desenvolvido.

Às minhas amigas e colegas Marilu Fiegenbaum e Silvana de Almeida pela ajuda nas análises estatísticas.

À Dra. Luciane M. P. Passaglia pelo auxílio laboratorial.

No desenvolvimento deste trabalho eu tive o apoio profissional de muitas pessoas e grupos. Eu acredito que sozinho não se vai muito longe e, por isso, quando precisei, pedi ajuda e SEMPRE fui atendido.

Ao Fernando Pilotto e à Lisiane F. Ávila pela obtenção da amostra de aves de ovos azuis.

À Laci Krupahtz por sempre estar disponível e ajudar em toda a parte logística e de utilização do computador, relacionada a esta Tese.

À Claudia L. Dornelles e à família Dornelles.

À Valéria, Jaqueline Battilana, Patrícia e Aline, ao Clênio Machado e aos demais colegas do Laboratório 122.

À Tatiana Roman e a sua mãe, Teresinha S. Roman.

A todos os colegas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA/UFRGS), em particular ao Sílvio, Zico e Omar e ao seu Coordenador, Dr. Carlos Tadeu P. Salle.

À Sabrina E. M. Almeida, à Fabiana M. Andrade e às Dras. Tânia A. Weimer e Mara H. Hutz.

Ao Dr. Giancarlo Pasquali.

Ao Elmo Cardoso e à Ellen Mezzeck.

À Dra. Fabiana Herédia e ao colega Fabiano P. Torres.

À Cladinara Sarturi e à Renata Schmitt.

Ao pessoal do Laboratório 204, em especial à Janaína E. G. Kraemer e aos orientandos da Dra. Luciane M. P. Passaglia.

Às colegas Ana M. Pereira e Kátia G. Santos e ao Dr. Israel Roisenberg.

À Dra. Nance B. Nardi e ao Dr. José Arthur B. Chies.

Agradeço de forma pessoal aos inúmeros amigos e colegas que encontrei ao longo de minha trajetória no Doutorado e que, de uma forma ou de outra, me apoiaram. Em particular à Jaqueline Miranda e ao Gustavo; à Tatiana e à Cláudia Dornelles; à Jaqueline Battilana e ao Maurício; à Sabrina, Silvana, Marilu, Erik, Verônica e à Júlia; à Aline,

Valéria, Patrícia, Josiane, Laci, Dânae, Franceli, Verônica, Ana Helena, Ângela, Carol, Cláudia Thompson, Luana, Augusto, Geraldo e Paulinho; à Mariângela, Roseclear, Simone, Josi, Nilzane, Ana Fittel, Aline, André Felipe, Marisa, Sílvio, Laurício, Aldemir, Lucas, Lú, Sílvia, Clarissa, Denise, Fernando, Guahyba, Ana, Felipe, Guilherme e aos demais amigos do CDPA; à Adri; à Magda e ao Luiz Ernani; à Bianca, Taiana, Francine, Cristina, Ângela, Tereza, Luciana, Martín e André Alonso; ao Andres; ao Everaldo; à Bia; à Vanessa Mattevi; ao Elmo, Clênio, Ellen e Luciano; à Gabriela, Elise, Adriana Gava e Paulo Ott; à Kátia e à Ana Pereira; à Andréa; ao Nelson, Peter, Cladinara, Fernanda Britto e demais colegas do Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUC-RS; à Marialva e à Viviane; à Janaína, Juliana Nonohay e à Alessandra Selbach; à Wakana; ao Adriano Ferreira e ao Nicolás; e aos Profs. Margarete, Luciane, M. Cátira, Heloísa, Sídia, Aldo, Karen, Eliane Bandinelli e Lavínia.

Agradeço também àqueles que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Hânia Dóris, e aos meus irmãos, Luiz Felipe, Luiz Carlos, Carlos Otávio e Juliana. A família é o começo de tudo.

Ao meu querido amigo Jairo A. Grisa.

Aos amigos Sérgio Meyer e Yhevelin S. Guerin.

E à minha amiga Melina M. Baungarten que, mesmo de longe, esteve ao meu lado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO	17
I.1. COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE	18
I.2. MHC DA GALINHA	19
I.3. COMPLEXO B E RESISTÊNCIA GENÉTICA A DOENÇAS EM GALINHAS	25
I.4. GENOTIPAGEM DOS LÓCUS B-F	26
I.5. MICROSSATÉLITES	28
I.6. GALINHAS CAIPIRAS	29
CAPÍTULO II OBJETIVOS	34
CAPÍTULO III 1º ARTIGO: B-F DNA SEQUENCE VARIABILITY IN BRAZILIAN (BLUE-EGG CAIPIRA) CHICKENS	36
CAPÍTULO IV 2º ARTIGO: LEI0258 MICROSATELLITE VARIABILITY AND ITS RELATIONSHIP TO B-F HAPLOTYPES IN BRAZILIAN (BLUE-EGG CAIPIRA) CHICKENS	63
CAPÍTULO V DISCUSSÃO	76
CAPÍTULO VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CAPÍTULO VII APÊNDICE	94

RESUMO

O Brasil tem uma posição de destaque no setor de negócios avícola mundial. Esta posição é resultado de uma atividade com alto grau de desenvolvimento tecnológico, destacando-se os avanços na área da genética. Características produtivas importantes têm sido o foco dos melhoristas de galinhas. Entretanto, em termos de selecionar aves visando o aumento da resistência a doenças, pouco ou nada tem sido feito. Recentemente, a avicultura nacional voltou-se para o resgate desta característica e uma série de linhagens mais rústicas, as chamadas linhagens caipiras, têm sido desenvolvidas. Este resgate, porém tem se baseado apenas em traços fenotípicos de rusticidade, não se levando em consideração as bases da genética molecular dos mesmos.

A grande maioria das doenças que atacam as galinhas é de origem vírica, sendo os genes B-F (classe I- α do MHC) os principais responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune a estes agentes. Logo, tornam-se necessárias maiores investigações nestes genes para obter-se um melhor conhecimento sobre a imunidade aos vírus, possibilitando medidas que incrementem esta imunidade. Tais investigações ainda não tinham sido realizadas em galinhas caipiras brasileiras. Das técnicas utilizadas para genotipar os genes B-F o seqüenciamento de DNA é a única que apresenta 100% de fidelidade; entretanto, é cara e trabalhosa. Assim, técnicas mais ágeis e baratas e que apresentem resultados significantes para esta finalidade são sempre pertinentes. Recentemente, um microssatélite (LEI0258) foi descrito numa localização muito próxima da região dos genes B-F, o qual tem-se mostrado uma ótima ferramenta para genotipar os haplótipos B-F; mas novamente, não havia estudos a respeito em aves caipiras.

Este trabalho teve por finalidade investigar a variabilidade dos genes B-F, através da técnica de seqüenciamento do DNA, e deduzir as seqüências de aminoácidos codificadas pelos alelos destes genes encontrados em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Concomitantemente, procurou-se estudar o polimorfismo do microssatélite LEI0258 em duas populações desses animais (caipiras de ovos azuis criadas livremente e a linhagem caipira Paraíso Pedrês), assim como a relação dos alelos LEI0258 com os alelos ou haplótipos B-F na amostra de aves de ovos azuis.

Os resultados e conclusões alcançados podem ser resumidos como segue:

1. Vinte e seis diferentes seqüências nucleotídicas B-F de DNA, que correspondem ao fragmento que vai do exon 2 ao 4 destes genes, foram detectadas na amostra de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Dez seqüências foram similares as já descritas para aves comerciais mas 16 foram inéditas. Este resultado demonstra uma grande variabilidade, a maioria da qual ainda não detectada, apresentada por estes genes nestas aves. Em alguns animais foram amplificados os dois genes B-F (B-FI e B-FIV) mas em outros, aparentemente, apenas um deles. Conclui-se que em algumas aves o fragmento analisado possa ser idêntico para os dois genes, e portanto a mesma seqüência para ambos esteja sendo detectada. Entretanto, é possível que alterações na seqüência alvo dos iniciadores utilizados possam impedir a amplificação de determinados alelos.
2. Foi observada a diferença de expressão apresentada pelos genes B-F na análise do cDNA de três animais que diferiram quanto ao número de seqüências de DNA amplificadas. (a) animal no. 169 (*CC1/*CC12): dos oito clones analisados, cinco foram *CC1 e três *CC12; (b) no. 125 (*CC7-1/*CC7-2/*CC13): 14 clones, 13 *CC7-1, um *CC13, nenhum *CC7-2; e (c) no. 132 (*CC3-1/*CC3-2/*CC4-1/*CC4-2): seis clones, três *CC3-1, três *CC4-1, nenhum *CC3-2 ou *CC4-2. A ausência de amplificação dos clones *CC3-2, *CC4-2 e *CC7-2 deve ter sido devida aos seus baixos níveis de expressão. O fato de que, dos 14 clones analisados do animal 125, 13 foram *CC7-1 sugere que, além da diferença de expressão entre os loci B-F, pode haver também diferenças de expressão entre alelos B-F dentro de um mesmo locus.
3. Trinta e nove diferentes seqüências de aminoácidos dos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ foram geradas a partir de 45 seqüências nucleotídicas (23 obtidas no presente trabalho e outras 22 retiradas da literatura). Três outras seqüências caipiras (*CC18, *CC19 e *CC20) determinadas posteriormente a esta análise, não foram incluídas na predição. Das 13 seqüências caipiras ainda inéditas

utilizadas, dez condicionam diferenças na composição de aminoácidos quando comparadas com as já descritas. Estas são de particular interesse em futuras investigações de diferenças na resposta a patógenos.

4. Ao todo foram encontrados 15 alelos LEI0258, e o tamanho destes variou de 205 a 457 pb. Nove alelos mostraram-se presentes nas duas populações, e cada população apresentou três alelos específicos. Este grande polimorfismo habilita este microssatélite a ser utilizado como um bom marcador molecular para estudos futuros de variabilidade populacional, de paternidade e de endogamia, entre outros.

5. Foi observado um desequilíbrio de ligação total entre o locus do microssatélite e os locus B-F. Esta associação permite a tipagem parcial dos haplótipos B-F através deste microssatélite. Nos casos em que não se tem alelos deste microssatélite exclusivos para cada um dos haplótipos B-F, pode-se utilizá-los associados à técnica de PCR alelo-específico (PCR-SSP), pois a verificação da ocorrência de um alelo LEI0258 específico restringiria a determinação para dois ou três haplótipos B-F apenas, o que, de qualquer modo, é mais acessível do que o seqüenciamento. Esta associação também capacita os alelos LEI0258 a serem utilizados em programas de melhoramento genético de resistência a patógenos através da seleção assistida por marcadores, já que é mais fácil e rápido analisar uma população pelo método da PCR do que pelo do seqüenciamento.

ABSTRACT

Brazil has a distinguished position in the world of poultry business. This position is due to an activity involving a high degree of technological development, with emphasis in the advances in the area of genetics. Important production characteristics have been the focus of chicken breeders. However, in the area of disease resistance nothing, or very little, have been done. Recently the Brazilian poultry breeders turned to the investigation of this characteristic, and a series of rustic lines, the so-called “caipira” lines, had been developed. But these studies are based just in phenotypic traits, no consideration being given to their molecular genetic bases.

The large majority of the diseases which attack chickens is of viral origin, the B-F (MHC class I- α) genes being the main responsible for the development of the immune response to these agents. Therefore, more investigation on these genes is needed, to obtain a better knowledge of this viral immunity, thus making possible measures that would enhance such immunity. Investigations of this type had not been performed to date in Brazilian Caipira chicken. Of the techniques used to genotype the B-F genes, DNA sequencing is the only one that is 100% reliable; however, it is costly and demand much work. Easier and more cheap techniques, which would give significant results for this task, are naturally welcome. Recently a microsatellite (LEI0258) was described which is located in a region that is close to that of the B-F genes, and this microsatellite is being used with good results to genotype the B-F haplotypes; but again, no such studies had been performed in Brazilian Caipira chickens with this purpose.

The objective of this work is to investigate the variability of the B-F genes through DNA sequencing, and to deduce the amino acid sequences which are coded by the alleles of these genes which are found in blue-egg Caipira Brazilian chicken. Concomitantly the polymorphism of the LEI0258 microsatellite was investigated in two populations of such animals (blue-egg Caipira chicken raised freely, and the Paraíso Pedrês Caipira line), as well as the relationship between the LEI0258 alleles with B-F alleles or haplotypes in the blue-egg Caipira sample.

The results and conclusions found can be summarized as follows:

1. Twenty-six different DNA B-F nucleotide sequences were detected in the Brazilian blue-egg Caipira chickens. They correspond to a fragment located

between exons 2 and 4 of these genes. Ten sequences were similar to those already described for commercial fowl, but 16 had not been described to date. This result indicates a large variability, the majority of which was undetected, for these genes in these birds. In some animals the two B-F (B-FI and B-FIV) genes had been amplified, but in others, apparently, just one. The inference is that in some birds the analyzed fragment could be the same for both genes, and that therefore the same sequence for both was being detected. However, it is possible that changes in the primers' target sequences may prevent the amplification of certain alleles.

2. Expression differences in the B-F genes were observed in the cDNA analysis of these animals, which differed in the number of amplified DNA sequences. (a) Animal no. 169 (*CC1/*CC12): of the eight clones analyzed, five were *CC1 and three CC12; (b) no. 125 (*CC7-1/*CC7-2/*CC13): 14 clones, 13 *CC7-1, one *CC13, none *CC7-2; and (c) no. 132 (*CC3-1/*CC3-2/*CC4-1/*CC4-2): six clones, three *CC3-1, three *CC4-1, none *CC3-2 or *CC4-2. The absence of amplification of the *CC3-2, *CC4-2, and *CC7-2 clones can be due to their low expression levels. The fact that of the 14 clones recovered from animal 125 13 were *CC7-1 suggests that besides the B-F interloci expression differences, B-F intralocus differences may occur as well.
3. Thirty-nine different amino acid sequences from the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains were generated from 23 nucleotide sequences obtained in the present work and 22 others reported in the literature. Three other Caipira sequences (*CC18, *CC19, and *CC20), determined after this analysis, were not included in it. Of the 13 new Caipira sequences used, ten condition amino acid differences in relation to those already described. They are, therefore, of special interest in future investigations related to responses to pathogens.
4. A total of 15 LEI0258 alleles were found, and their sizes varied from 205 to 457 bp. Nine alleles occurred in both populations while each population presented three specific alleles. This high degree of polymorphism determines that this

microsatellite should be useful as a molecular marker in future studies of population variability, paternity, and inbreeding, among others.

5. A total linkage disequilibrium was found between the LEI0258 and B-F loci. This association allows partial typing of the B-F haplotypes through this microsatellite. In cases in which there is no microsatellite allele which is exclusive to a given B-F haplotype, the system can still be used associated to the allele-specific PCR (SSP-PCR) technique, since the establishment of the occurrence of a specific LEI0258 allele would restrict the determination to two or three B-F haplotypes only, simplifying the process in relation to sequencing. This association also allows the LEI0258 to be used in genetic breeding programs of pathogen-resistance based on markers assisted selection, since it would be easier and faster to analyze a population using PCR instead of sequencing methods.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

I.1. Complexo Maior de Histocompatibilidade

O Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) é o nome dado a um segmento cromossômico no qual se localiza um conjunto de genes que codificam glicoproteínas de diferentes estruturas e funções, as quais são expressas na superfície de uma grande variedade de células. A função principal da maioria destas moléculas é a apresentação de fragmentos de proteínas antigênicas (epitopos) às células efectoras do sistema imune, a partir da qual toda cadeia da resposta imune se desenvolve (Abbas *et al.*, 2000). Este complexo foi inicialmente descrito (em mamíferos) como a região gênica responsável pelo sucesso nos transplantes de tecidos (Guillemot *et al.*, 1989; Lamont, 1989); hoje sabe-se que esta é apenas uma das conseqüências da sua função principal.

Os genes do MHC são altamente polimórficos, ou seja, cada locus apresenta várias formas (alelos), e são, geralmente, herdados na forma de haplótipos (um grupo de genes herdados em conjunto como uma unidade simples) do MHC (Abbas *et al.*, 2000). Estes genes, em mamíferos, dividem-se em três classes: I, II e III. De maneira geral, os genes de classe I codificam moléculas que são responsáveis pela apresentação de antígenos endógenos (epitopos derivados do processamento de proteínas virais e de bactérias intracelulares, assim como de proteínas que levam a doenças autoimunes), os de classe II, moléculas que apresentam antígenos exógenos (epitopos derivados do processamento de proteínas de parasitas e bactérias extracelulares), e os de classe III codificam algumas moléculas que fazem parte do sistema complemento, tais como C2, C4 e Bf, e outras que não estão envolvidas com o sistema imune (Trowsdale, 1995; Abbas *et al.*, 2000). As moléculas de classe I estão presentes na superfície de quase todas as células nucleadas do organismo, as de classe II apenas em monócitos, macrófagos, células B e numa pequena porcentagem de células T (Lamont, 1989), e as de classe III podem estar presentes na circulação sanguínea ou em outros fluidos biológicos, sob a forma solúvel, ou ligadas à superfície de certas células, principalmente células do sangue periférico (Scroferneker e Pohlmann, 1998).

Duas cadeias polipeptídicas compõem as moléculas do MHC de classe I e II. As glicoproteínas de classe I possuem uma cadeia pesada (α) e uma cadeia leve (β_2 -microglobulina), as de classe II possuem uma cadeia α e uma cadeia β de tamanho

semelhante (Bacon e Dietert, 1991; Abbas *et al.*, 2000). A fenda, na qual o peptídeo é complexado ao MHC, é formada apenas pela cadeia α nas moléculas de classe I e por ambas as cadeias nas moléculas de classe II (Abbas *et al.*, 2000). O gene da cadeia classe I- α é formado por oito éxons. O éxon 1 codifica a seqüência sinal; os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente; o éxon 5 codifica a região trans-membrana (TM); e os éxons 6, 7 e 8 codificam a cauda citoplasmática (região que está em contato com o citoplasma celular) e a região 3' não traduzida (3' UT; Lamont, 1998a). Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam a fenda apresentadora de antígenos destas moléculas, cuja estrutura terciária é formada por uma plataforma de oito fitas β anti-paralelas (*antiparallel β -strands*), quatro em cada um destes domínios. Estas fitas β dão suporte a duas helices α paralelas (*parallel α -helices*), uma em cada um dos mesmos (Kaufman *et al.*, 1992; Hunt e Fulton, 1998).

I.2. MHC da Galinha

O Complexo Maior de Histocompatibilidade da galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) foi detectado em 1947 e é denominado de Complexo B por ter sido inicialmente descrito como o locus controlador de antígenos dos grupos sanguíneos (*blood group antigens*) por Briles *et al.* (1950), sendo que sua identificação como MHC só ocorreu por volta de 1960 (Guillemot *et al.*, 1989).

O complexo B é formado por dois grupos de genes, denominados de locus B e locus Y. Inicialmente, apenas o locus B foi detectado (Briles *et al.*, 1950). Quatro classes gênicas são identificadas neste locus: os genes B-F e B-L, os quais codificam moléculas homólogas às de classe I- α e II- β de mamíferos, respectivamente; o gene componente do sistema complemento C4, único gene de classe III identificado até o momento em galinhas; e os genes B-G, que codificam as moléculas altamente polimórficas de classe IV (Simonsen *et al.*, 1982; Kaufman *et al.*, 1999). Posteriormente, Briles *et al.* (1993) e Miller *et al.* (1994) identificaram um outro grupo gênico, o locus Y ou *Rfp-Y* (*Restriction Fragment Pattern-Y*), que continha genes de classe I- α e II- β (identificados por polimorfismos de sítios de restrição padrão dos genes B-F e B-L em hibridizações por Southern Blot), mas que, no entanto, localizavam-se em uma outra região cromossômica,

diferente da do locus B. Eventos genéticos, tais como duplicações e translocações, poderiam ser a explicação para a existência desta segunda localização de genes classe I- α e II- β no complexo B (Briles *et al.*, 1993).

A galinha apresenta oito pares de cromossomos grandes, os macrocromossomos, 30 pares de cromossomos pequenos e dificilmente distinguíveis, os microcromossomos, e os cromossomos sexuais Z e W, sendo o seu número diplóide, portanto, 78 (Burt *et al.*, 1995; Smith e Burt, 1998). Ambos os loci (B e Y) estão localizados no mesmo microcromossomo, 16; entretanto, segregam-se independentemente por estarem separados por uma região grande, repetitiva e altamente recombinogênica, a Região Organizadora Nucleolar ou NOR (*Nucleolar Organizer Region*; Bloom e Bacon, 1985; Bloom *et al.*, 1987; Briles *et al.*, 1993). O único gene que codifica a cadeia II- α (classe II- α) detectado em galinhas localiza-se no mesmo microcromossomo 16, mas numa região fora do complexo B, a uma distância genética de 5 cM do mesmo (Kaufman *et al.*, 1999). O gene que codifica a cadeia β_2 -microglobulina de classe I localiza-se também fora do MHC da galinha, em um outro microcromossomo, 9 ou 10 (Riegert *et al.*, 1996).

Os genes de classe I- α e II- β encontrados no locus B são considerados genes clássicos do complexo B, enquanto que os do locus Y são os genes não-clássicos. A designação clássicos para os genes do locus B vem do fato de que estes apresentam todos os critérios avaliáveis esperados para moléculas clássicas, tais como alto polimorfismo, promoção de rápida rejeição a tecidos enxertados e influência em uma variedade de outros fenômenos reconhecidos para linfócitos T (Kaufman *et al.*, 1992; Kaufman e Salomonsen, 1997). Ao contrário destes, os genes do locus Y apresentam baixo polimorfismo, não condicionam uma rápida rejeição a tecidos enxertados, e são pobremente expressos em tecidos linfóides. Os genes de classe I- α e II- β são atualmente denominados de B-F e B-L, quando localizados no locus B, e Y-F e Y-L, quando estão no locus Y (Guillemot *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1996).

Os genes B-G codificam os antígenos B-G eritrocitários, que são geralmente usados para a tipagem sorológica; eles não são encontrados no locus Y, e não possuem equivalentes em mamíferos, embora um gene de classe I de mamíferos, o *Mog*, tenha similaridade com eles (Pink *et al.*, 1977; Briles *et al.*, 1993; Steinman, 1993). São encontrados, além de na superfície dos eritrócitos, nos trombócitos, timócitos, linfócitos e células epiteliais do intestino, ceco e fígado (Gruber, 1999).

O complexo B foi clonado em cinco grupos de cosmídeos e analisado (Fig. 1.; Guillemot *et al.*, 1988, 1989; Kaufman *et al.* 1991). Quatro genes classe I para a cadeia α (dois B-F e dois Y-F), cinco genes classe II para a cadeia β (dois B-L e três Y-L) e vários genes B-G foram identificados nestes clones (Kaufman e Wallny, 1996).

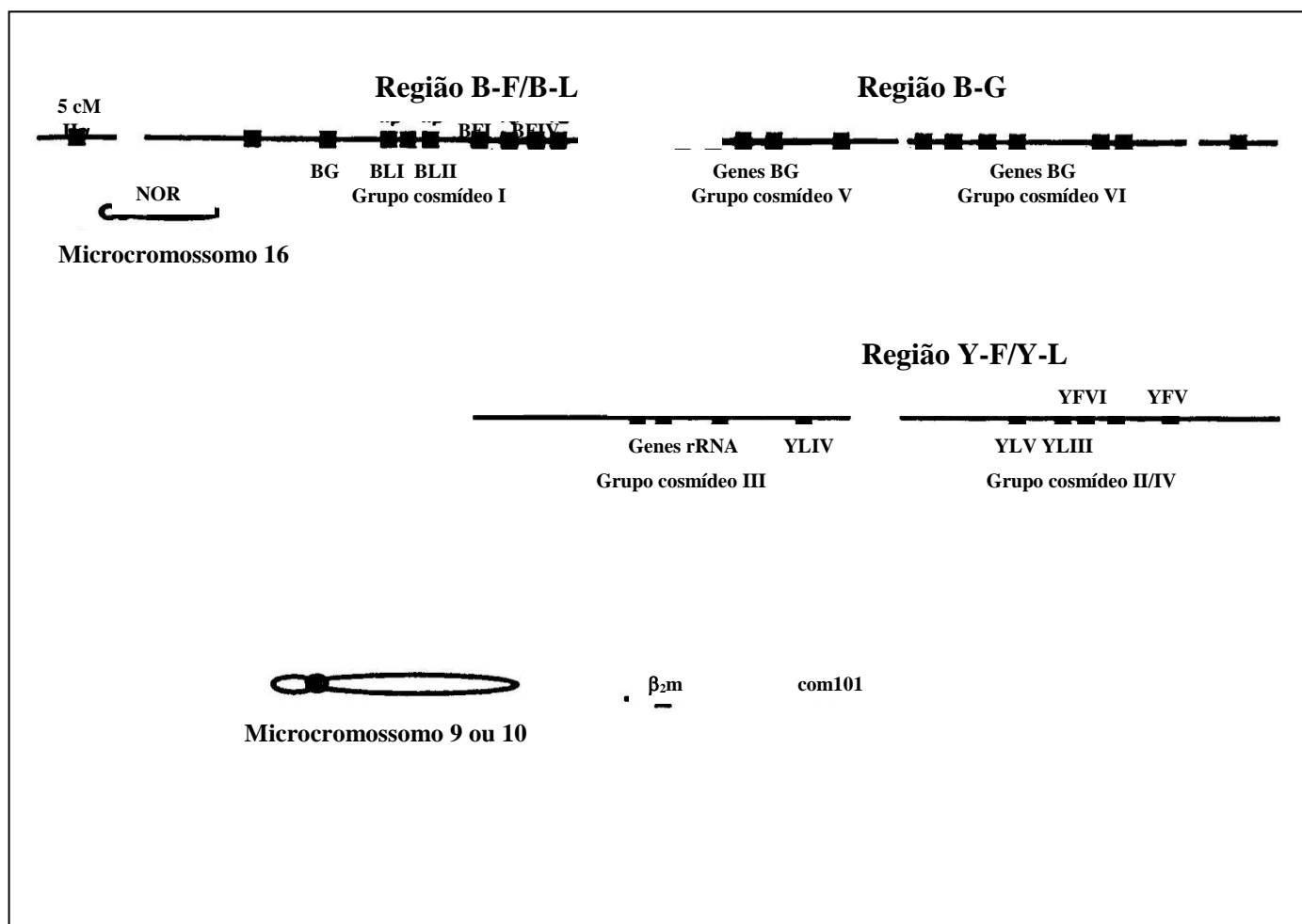


Figura 1. MHC da galinha e as regiões genômicas contendo genes relacionados (figura extraída de Kaufman *et al.*, 1995 e modificada de acordo com Miller *et al.*, 1996).

Os genes de classe I- α , localizados no lócus B, são denominados de B-FI e B-FIV e, os localizados no lócus Y, de Y-FV e Y-FVI (Miller *et al.*, 1996; Kaufman e Salomonsen, 1997). Esta designação vem do fato de que, inicialmente, seis genes classe I- α tinham sido identificados no genoma da galinha: B-FI, B-FII, B-FIII, B-FIV, B-FV e B-FVI (Guillemot *et al.*, 1989); entretanto, apenas quatro são reconhecidos atualmente (Trowsdale, 1995). Os genes que foram denominados primeiramente como B-FI e B-FII foram, posteriormente, confirmados como sendo duas partes de um mesmo gene: B-FI; o

mesmo em relação aos genes B-FIII e IV, que são um único gene: B-FIV. As enzimas de restrição utilizadas para gerar os fragmentos nos experimentos dos trabalhos iniciais cortaram ao meio os dois genes B-F e, quando o cDNA de comprimento total foi utilizado como sonda houve a hibridização com os dois fragmentos de cada um destes dois genes (Kaufman *et al.*, 1999); os genes B-FV e VI foram renomeados Y-FV e Y-FVI, respectivamente, por estarem localizados no locus Y.

Kaufman e Salomonsen (1997), a partir da análise dos grupos de cosmídeos e de análises de cDNAs de moléculas de classe I em diferentes haplótipos, relataram uma expressão diferencial dos genes de classe I- α em nível de proteína. Na maioria dos haplótipos analisados, apenas dois genes, dos quatro presentes no genoma da galinha, eram transcritos em mRNA, com níveis de expressão bem diferentes, sendo que, em alguns haplótipos, apenas um dos genes era transcrito. Em geral, a seqüência gênica de alta expressão, às vezes única, foi relacionada ao gene B-FIV, também chamado *B-F major gene*, enquanto que a de menor expressão foi relacionada ao gene B-FI, ou *B-F minor gene*. Geralmente a determinação *major* para alelos B-FIV e *minor* para alelos B-FI (Kaufman, 1995; Kaufman *et al.*, 1995) é feita com base nessa expressão gênica diferencial. Na região promotora destes genes pode estar, em parte, a causa desta diferença de expressão. Kaufman *et al.* (1999) observaram que os promotores dos *major genes* de todas as linhagens de galinhas analisadas eram idênticos ao promotor do alelo B-F12 (B-FIV B12) descrito por Kroemer *et al.* (1990), o qual possuía uma significativa homologia com os elementos encontrados nos promotores classe I de mamíferos, tal como o enhancer A (ou *class I response element*) tido como o mais importante elemento para altos níveis de transcrição em genes classe I destes animais.

Os promotores dos *minor genes*, por sua vez, eram idênticos aos do alelo B-F12 na região proximal, mas na região distal, onde localiza-se o elemento enhancer A, eram altamente divergentes (haplótipos B-F B2, B4, B6, e B21), ou eram mesmo totalmente ausentes (haplótipos B12 e B19). Em todos estes haplótipos, como visto, duas seqüências de cDNA foram detectadas, apesar de diferenças de expressão de até 10 vezes entre os *major* e *minor genes*, mas em dois haplótipos (B14 e B15) somente uma seqüência B-F foi obtida, igualmente quando o cDNA (Kaufman *et al.*, 1995) ou o próprio DNA (Kaufman *et al.*, 1999) foram utilizados nas amplificações. Os autores acreditam que mudanças maiores, que, poderiam ter perturbado o funcionamento do *minor gene*, possam ser a causa da expressão, ou mesmo, da detecção de apenas um gene B-F nestes haplótipos. Resultados

semelhantes, porém com pequenas variações, foram observados por Dalgaard *et al.* (2003) para os haplótipos B2, B6, B12, B14, B15, B19 e B21. No haplótipo B21 os dois transcritos tiveram expressão aproximadamente igual; em B2, B6, B12 e B19 a taxa de expressão foi de 4:1; enquanto que em B14 e B15 somente um transcrito foi detectado, como previamente relatado por Kaufman *et al.* (1999).

Deve-se ressaltar que o par de iniciadores utilizados nos experimentos da PCR (reação em cadeia da polimerase), em provavelmente todos os trabalhos relatados aqui, são capazes de amplificar os dois genes B-F. Entretanto, em alguns casos apenas uma seqüência B-F é obtida. Nos casos como os dos haplótipos B14 e B15 os motivos seriam os citados acima. Porém, em outros, a diferença de expressão, que em alguns haplótipos pode ser de até 10 vezes, deve ser a causa da detecção de apenas um gene B-F. Como a grande maioria destes trabalhos utiliza cDNA como molde, uma maior quantidade de clones do que a normalmente utilizada deveria ser seqüenciada para que ambos os genes B-F fossem detectados.

Hunt e Fulton (1998) e Kaufman *et al.* (1999) afirmam que o gene B-FIV (ou o gene B-F localizado à direita na região B-F/B-L) é sempre predominantemente expresso. Os dados da literatura dão suporte à existência de um B-F *major gene* no complexo B. Entretanto, a afirmação de que é sempre o mesmo gene o de principal expressão não é unânime. As seqüências B-F, predominantemente no haplótipo B^{A5}, ou unicamente no haplótipo B^{A8}, expressas no trabalho de Li *et al.* (1999) foram idênticas às seqüências de baixa expressão B-F4 *minor* e B-F6 *minor*, respectivamente, reportadas por Kaufman (1995). A mesma seqüência que em alguns haplótipos foi a de principal expressão não o foi em outros. Segundo Li *et al.* (1999), a expressão das seqüências B-F4 *minor* e B-F6 *minor* tanto podem variar dependendo do haplótipo (Li *et al.*, 1999 analisaram frangos de corte; o grupo de Kaufman trabalha principalmente com galinhas de postura, linhagens da raça Leghorn), quanto podem variar por estarem sendo reguladas por outros fatores (tais como *non-MHC genes* ou fatores ambientais). Ou seja, parece mais correto supor que pode haver também uma variação individual (ou de raças) entre qual gene é predominantemente expresso, e as designações *major* ou *minor* para um ou outro gene podem diferir individual ou haplotipicamente.

Um outro tipo de variação é observado nas moléculas de classe I- α da galinha. O nível total (a soma da expressão dos dois genes) das moléculas B-F expressas na superfície das células também varia conforme o haplótipo (Kaufman *et al.*, 1995, 1999; Kaufman e

Salomonsen, 1997; Kaufman e Venugopal, 1998). Ao investigar a correlação da resistência ou susceptibilidade à Doença de Marek com determinados haplótipos do complexo B os autores notaram que o haplótipo B19, o mais susceptível à doença, apresentava altos níveis de expressão, enquanto que o haplótipo B21, o mais resistente, apresentava baixos níveis de expressão na superfície celular. Isto, provavelmente, deva-se a algum aspecto do transporte das moléculas até a superfície da célula (Kaufman e Salomonsen, 1997; Kaufman *et al.*, 1999). Uma outra hipótese para esta variação seria o envolvimento das células *natural killer* (NK) na resposta imunológica. As aves com o haplótipo B21 têm grande quantidade destas células quando comparadas com as portadoras de outros haplótipos B-F. Havendo grande quantidade de NK, não seria necessário alta atividade de citotoxicidade das células T, pois este haplótipo condicionaria uma máxima atividade de citotoxicidade das NK (em Kaufman *et al.*, 1995). Haplótipos MHC que tenham moderada expressão total de moléculas de classe I poderiam ter moderados níveis de ambas as atividades, citotoxicidade das células T e das NK, e haplótipos com altos níveis de expressão total de moléculas de classe I teriam maior ação das células T, por terem menores níveis de atividade de células NK. Logo, há uma expressão diferencial dos genes B-F, tanto em relação ao nível total de expressão na superfície celular, quanto ao número de genes expressos, bem como quanto a qual gene é predominantemente expresso. Estas variações parecem depender do haplótipo MHC apresentado pela galinha, ou da raça, ou ainda, de fatores ainda não determinados.

Recentemente, Afanassieff *et al.* (2001) comprovaram a expressão de pelo menos um dos dois genes Y-F; entretanto, esta expressão foi detectada em apenas alguns tecidos, confirmando a baixa expressão dos genes deste locus detectadas por Zoorob *et al.* (1993) e Kaufman *et al.* (1995). Resultados semelhantes foram encontrados nas moléculas de classe II- β (Zoorob *et al.*, 1993; Pharr *et al.*, 1998).

Quando comparado ao MHC típico de mamíferos, o complexo B, embora dividido em duas regiões (B e Y) e com diferenças na expressão de seus genes, é extremamente compacto e simples (Hunt *et al.*, 1994). Os genes deste sistema são pequenos, estendem-se por aproximadamente 400 kb de DNA e possuem íntrons com tamanho médio de 100 pb (Kroemer *et al.*, 1990; Zoorob *et al.*, 1990; Trowsdale, 1995). Os genes B-F e B-L têm distâncias intergênicas muito curtas (10-20 kb). Isto os caracteriza como um bloco gênico muito compacto, sendo este último muitas vezes referido como B-F/B-L. Os eventos de recombinação entre eles podem ocorrer, mas são muito raros (Kaufman *et al.*, 1999). A

existência, ou não, de recombinação entre os genes de classe I- α e II- β do locus Y não foi ainda investigada.

Baseados nesta simplicidade, Kaufman *et al.* (1995) propuseram a teoria do MHC mínimo (*Minimal Essential MHC*), que postula que as galinhas têm um número reduzido de genes funcionais no complexo B. Assim, parece que, apesar de vários genes de ambas as classes (I- α e II- β) estarem presentes no genoma das galinhas, poucos são efetivamente expressos, ficando a cargo dos diferentes alelos de um gene predominantemente expresso as variações observadas na susceptibilidade a doenças nestes organismos. No caso de patógenos endógenos, os alelos do B-F *major gene* parecem ser os principais apresentadores destes ao sistema imune.

I.3. Complexo B e Resistência Genética a Doenças em Galinhas

A resistência genética à maioria das doenças é poligênica, sendo os genes do complexo B os que exercem o controle principal desta resistência hospedeira a enfermidades autoimunes, víricas, bacterianas e parasitárias (Lamont, 1989, 1998b). Estes genes determinam a vida ou a morte das aves em resposta a certos patógenos, que podem ser pequenos e simples, como o vírus do sarcoma de Rous, ou grandes e complexos, como o vírus da Doença de Marek (Kaufman, 2000). Tal resistência tanto pode ser individual quanto de grupos, como raças ou linhagens, sendo estas últimas definidas como populações que possuem características comuns a uma raça e podem ser subdivisões da mesma. Além disso, as raças são muito endocruzadas e apresentam, na maioria das vezes, um alto grau de homozigose (Moreng e Avens, 1990). A resistência pode variar, assim, tanto de indivíduo para indivíduo, ou linhagem para linhagem, quanto de patógeno para patógeno no mesmo indivíduo.

Existem muitos trabalhos na literatura destacando a presença de diferenças genéticas na resistência, ou suscetibilidade, a doenças entre as diversas linhagens comerciais de galinhas. Tem sido dada uma atenção especial às doenças causadas por vírus, pois estas geram os principais problemas sanitários da avicultura moderna (Bumstead, 1998). Assim, diferenças significantes na resistência para os agentes causais da bronquite infecciosa (Bumstead *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1990), da Doença de Marek (Hanson *et al.*, 1967; Cole, 1968; Briles *et al.*, 1977; Lin e Lee, 1996; Kaufman e

Venugopal, 1998; Dalgaard *et al.*, 2003), da leucose aviária (Ignjatovic e Bagust, 1985), do sarcoma de Rous (Ignjatovic e Bagust, 1985; Plachý *et al.*, 1994; Kaufman e Venugopal, 1998), e da Doença Infecciosa da Bolsa (Gyles *et al.*, 1986; Van den Berg *et al.*, 1991; Fadly e Bacon, 1992; Bumstead *et al.*, 1993), dentre outros, têm sido relatadas.

A importância destes estudos baseia-se no fato de que o conhecimento das diferenças entre indivíduos ou linhagens pode levar ao aumento da resistência genética, através da seleção, reduzindo a necessidade de vacinações e, em lotes vacinados, proporcionando proteção parcial, caso a vacinação não seja eficiente devido a mutações virais (Lamont, 1989).

Em parte, estas variações estão fortemente associadas aos diferentes alelos (ou haplótipos) encontrados para os genes do complexo B no genoma das aves (Bacon, 1987). Para a Doença de Marek, como mencionado anteriormente, o haplótipo B21 confere resistência, os haplótipos B2, B6 e B14 resistência moderada, e o haplótipo B19 susceptibilidade às aves que os portam (Kaufman, 2000).

Os genes do complexo B também influenciam, direta ou indiretamente, características produtivas de importância econômica, tais como peso corporal, taxa de fertilização e produção de ovos. Um exemplo disto são os vários estudos que têm demonstrado que seleções para produção de ovos e resistência à Doença de Marek alteram significativamente as frequências alélicas dos genes do complexo B (Lamont, 1998a). Estes fatos tornam ainda mais relevante o conhecimento das diferenças individuais, ou de linhagens, para estes genes.

I.4. Genotipagem dos Locus B-F

Um haplótipo do complexo B (haplótipo B) tem, pelo menos, um gene de cada uma das três classes (I- α , II- β e IV) presente neste MHC (Simonsen *et al.*, 1982). Tradicionalmente, a tipagem destes genes vinha sendo feita por métodos sorológicos, os quais identificam os produtos gênicos expressos na superfície de eritrócitos, as hemoaglutininas (Li *et al.*, 1997). Briles e Briles (1982) e Simonsen *et al.* (1982) definiram mais de 30 haplótipos B diferentes (B¹ - B³⁰) a partir de linhagens de galinhas de postura White Leghorns, a maioria dos quais foram definidos como de referência ou padrão, com

estes métodos. Atualmente, novas técnicas, baseadas na genética molecular, têm sido aplicadas na genotipagem destes haplótipos.

Uma destas técnicas é a análise pelo polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), introduzida em estudos de linhagens avícolas por Soller e Beckman (1986). Este método vem sendo muito utilizado na caracterização dos genes de classe I- α (Hála *et al.*, 1988; Chaussé *et al.*, 1989; Lamont *et al.*, 1990; Chen e Lamont, 1992; Juul-Madsen *et al.*, 1993). Uma outra técnica é a PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers*) onde vários iniciadores são utilizados, um para cada haplótipo (Zheng *et al.*, 1999). Recentemente, a PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction - Single-Strand Conformation Polymorphism*) foi introduzida na definição dos alelos dos genes do complexo B (Afanassieff *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2002).

O seqüenciamento também tem sido muito utilizado na caracterização molecular dos genes do complexo B. Os transcritos de cDNA dos genes B-F de diversos haplótipos têm sido clonados, seqüenciados e analisados (Guillemot *et al.*, 1988; Kroemer *et al.*, 1990; Kaufman *et al.*, 1992; Pharr *et al.*, 1994).

Alguns destes trabalhos têm apresentado resultados muito interessantes. Hunt *et al.* (1994) analisaram a seqüência nucleotídica do cDNA do gene B-FIV de três haplótipos (B¹⁵, B¹⁹ e B^{19VI}) e observaram uma recombinação intra-alélica no DNA da região que forma a fenda de complexação do epitopo. O alelo B-FIV do haplótipo B^{19VI} possui o éxon 2 quase idêntico ao do haplótipo B¹⁵ (diferindo em apenas 1,5% dos nucleotídeos) e o éxon 3 muito semelhante ao do haplótipo B¹⁹ (com apenas 2,6% de divergência). Foram exatamente nos éxons formadores desta fenda, 2 e 3, que Fulton *et al.* (1995) e Hunt e Fulton (1998) encontraram a maior taxa de variação nucleotídica observada entre os oito éxons das moléculas de classe I- α quando analisaram diferentes alelos do gene B-FIV. Provavelmente, esta alta variabilidade é a responsável pelo grande polimorfismo encontrado neste gene.

De uma maneira geral, a utilização das tecnologias anteriormente mencionadas tem propiciado a detecção de novos alelos dos genes de classe I- α do complexo B; no entanto, nenhuma delas têm se mostrado mais eficiente para este fim do que o seqüenciamento. Li *et al.* (1997) descreveram a caracterização molecular e imunogenética de dois haplótipos de linhagens comerciais de frango de corte. Estes haplótipos, que haviam sido descritos como um único por sorologia, não diferiam nos padrões de RFLPs para a região B-G, mas

diferenciavam-se para os mesmos padrões na região B-L β . O sequenciamento revelou variações nucleotídicas entre a região B-F dos dois haplótipos não detectadas anteriormente, assim como para a região B-L β . Em trabalho posterior, Li *et al.* (1999) determinaram a sorologia dos genes do complexo B, os padrões de RFLPs dos genes B-G e a seqüência dos genes B-F e B-L de linhagens comerciais de frango de corte. As seqüências obtidas dos dois genes B-F e de um dos genes B-L foram comparadas com as seqüências dos haplótipos padrões e foram detectados novos alelos, além dos já descritos para os lócus analisados. Livant *et al.* (2001) determinaram três novos alelos B-F quando analisaram as seqüências nucleotídicas dos cDNAs dos genes B-F e B-L β II de frangos de corte da linhagem C e as compararam com todas as seqüências B-F depositadas no *GenBank*. Já existem 32 seqüências (alelos) diferentes descritas para os genes B-F (Kroemer *et al.*, 1990; Kaufman *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1994; Kaufman, 1995; Li *et al.*, 1997, 1999; Hunt e Fulton, 1998; Livant *et al.*, 2001; Livant e Ewald, 2002), todas em linhagens comerciais de galinhas.

I.5. Microssatélites

Microssatélites, ou seqüências microssatélites, são seqüências de DNA moderadamente repetitivo que estão presentes no genoma de vertebrados, insetos e plantas (Charlesworth *et al.*, 1994). Apresentam herança mendeliana codominante e são, presumidamente, neutras em termos seletivos (Weber e May, 1989; Stallings *et al.*, 1991). Em sua maioria, são repetições de mono, tetra ou, principalmente, dinucleotídeos e estão localizadas entre os genes ou dentro de íntrons (Engel *et al.*, 1996). Um alelo de microssatélite é designado conforme a variação no número das pequenas sub-unidades (1-6 pb) que o compõem ou de acordo com a homologia de sua seqüência de bases.

Muitas são as suas utilidades e atualmente eles são bastante empregados como marcadores de DNA na maioria das espécies de animais domésticos, pois podem estar associados diretamente a algum gene de interesse. Na avicultura, o uso de microssatélites como marcadores de genes de interesse também tem sido utilizado. Wardecka *et al.* (2002) analisaram a relação entre os alelos de 23 microssatélites localizados nos cromossomos 1-5 e a produção e a qualidade de ovos na progênie de duas raças de galinhas (*Rhode Island Red* e *Green-legged Partridge*). Os autores concluem que há ligação entre os lócus de

microssatélites analisados e a produção e a qualidade de ovos nestas populações. Yunis *et al.* (2002) investigaram a associação entre microssatélites e loci de traços quantitativos (QTL; *quantitative trait loci*) que controlam a resposta de anticorpos a *Escherichia coli* e a *Salmonella enteritidis* em frangos jovens. Quatorze loci de microssatélites mostraram ser significativamente associados à resposta de anticorpos a, pelo menos, uma das doenças estudadas, sendo seis significativamente associados a ambas.

McConnell *et al.* (1999) descreveram um microssatélite (LEI0258) no microcromossomo 16 das galinhas, numa localização muito próxima da região B-F/B-L. LEI0258 é o único microssatélite descrito para este cromossomo e tem se mostrado uma ótima ferramenta para genotipar os haplótipos B-F/B-L. O grupo coordenado pelo Dr. Nathaniel Bumstead tem definido molecularmente os haplótipos do complexo B de algumas linhagens de galinhas através deste microssatélite (<http://europa.eu.int/comm/research/agro/fair/en/uk1502.html>). Este grupo tem trabalhado em um projeto que busca identificar peptídeos vacinais específicos que gerem forte resposta a vacinas em animais com genótipos particulares. A alta ligação entre estes loci, assim como o grande número de alelos LEI0258, a maioria dos quais está associada a um haplótipo específico, tem permitido esta genotipagem. Até o momento, não foi feita qualquer investigação quanto à variabilidade deste microssatélite em galinhas caipiras brasileiras, nem quanto à possível associação dos alelos LEI0258 com os alelos dos genes B-F nessas aves.

I.6. Galinhas caipiras

As galinhas domésticas são originárias do Sudoeste da Ásia e descendem, única ou principalmente, de uma ave silvestre, a galinha Vermelha do Mato (*Red Jungle Fowl*; *Gallus gallus*, alguns taxonomistas a classificam como *Gallus bankiva*; Crawford, 1990). Elas foram introduzidas no Brasil pelos primeiros navegadores europeus que aqui desembarcaram, por volta de 1500 (Gomes e Albino, 1998; Albino *et al.*, 2001). Eles trouxeram raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, que foram deixadas em liberdade nos quintais das casas, sítios e fazendas. Esta liberdade propiciou a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre elas, surgindo, desta mistura de raças, as chamadas galinhas caipiras brasileiras, ou simplesmente, galinhas caipiras (Figuras 2 e 3; caipira, do tupi-

guarani, “habitante do campo”), que também são conhecidas como galinhas crioulas, da colônia, de terreiro ou de capoeira.

Algumas galinhas caipiras põem ovos azuis (Figura 4). Esta coloração da casca do ovo, que vai do azul turquesa ao verde, é característica de uma raça sul-americana de galinhas chamada Araucana. Estas são aves oriundas do Noroeste do Chile, da região de Arauca, e são a única raça de galinhas que originalmente põe ovos azuis. A origem destas aves ainda é incerta, entretanto há fortes evidências de que seja pré-colombiana, ou seja, quando Colombo, Cabral e os demais “descobridores” das Américas chegaram aqui, estas já eram bastante difundidas entre os índios, em particular entre os sul-americanos (Crawford, 1990; <http://home.wanadoo.nl/gjosinga/raseng/araucane.htm>). Por volta de 1880 estas aves expandiram-se pelo Brasil e, por mistura, acabaram participando da formação das galinhas caipiras nacionais.

Galinhas caipiras caracterizam-se pela sua rusticidade, por sua maior resistência a doenças e a condições adversas de clima, temperatura e alimentação, principalmente quando comparadas às galinhas industriais modernas, que são oriundas de seleções genéticas restritas e mantidas em um regime de total confinamento, onde tudo é rigorosamente controlado (Moreng e Avens, 1990; Anônimo, 1997).

Entretanto, apesar destas características interessantes, as caipiras foram quase exterminadas. Nos anos 30, a avicultura nacional iniciou um processo de transformação. As aves mais produtivas começaram a substituir as galinhas caipiras, sendo que esta substituição foi intensificada nas décadas de 60-70, quando linhagens especializadas em ovos (postura), em carne (corte) ou mistas (dupla aptidão) foram desenvolvidas e a avicultura industrial estabeleceu-se definitivamente no país (Moreng e Avens, 1990; Gomes e Albino, 1998). Na presença de aves altamente produtivas, as caipiras não tiveram mais espaço e foram preservadas apenas porque permaneceram esquecidas nos terreiros do interior (Cerri, 1992).

A mudança nos hábitos de consumo, ocorrida no início dos anos 80, valorizou os produtos naturais e tornou as galinhas caipiras alternativas de grande valor comercial. Como elas são aves criadas de maneira mais natural, são mais saudáveis, não sendo dependentes de antimicrobianos ou antiestressantes, além de possuírem uma carne mais consistente, firme e saborosa, assim como ovos também mais saborosos (Cerri, 1992; Ramos, 1995).

Com esta nova exigência do mercado, o resgate da galinha caipira tornou-se inevitável, porém, a sua baixa produtividade inviabilizou a competição desta com a galinha industrial (Ramos, 1995). A saída foi o desenvolvimento das chamadas linhagens caipiras, nome genérico dado a linhagens, tanto de corte quanto de postura, que mesclam a rusticidade e a resistência das caipiras com a produtividade das industriais (Gomes e Albino, 1998; Albino *et al.*, 2001).

Existem, no mercado avícola, algumas linhagens desenvolvidas no Brasil com esta finalidade. Uma destas linhagens é a Paraíso Pedrês (Figuras 5 e 6), que foi selecionada para corte pelos proprietários da fazenda Aves do Paraíso (Rodovia Romildo Prado, KM 10, Itatiba/SP), a partir do resgate de características de raças puras dentro de plantéis de galinhas caipiras. Quando galos ou galinhas caipiras possuíam traços desejáveis de raças puras, eram selecionados, cruzados e as características apuradas, obtendo-se, assim, raças homogêneas a partir de galinhas caipiras (Ramos, 1995). Estas raças, 11 no total, depois de selecionadas, foram cruzadas e o produto é a linhagem de galinhas caipiras Paraíso Pedrês. As linhagens caipiras brasileiras apresentam, além de uma boa produção de carne e/ou ovos, uma maior resistência a patógenos, quando comparadas às aves industriais típicas (Albino *et al.*, 2001).

A origem desta maior resistência das atuais galinhas e linhagens caipiras ainda é uma incógnita; entretanto, acredita-se que deva ser decorrente da presença de alelos provenientes dos seus ancestrais caipiras (Gomes e Albino, 1998). Pode-se supor que o sistema de criação silvestre ao qual as galinhas caipiras foram submetidas, sendo criadas livres, sem a devida proteção (vacinações) a doenças e fora de abrigos adequados, nestes 500 anos, deva ter propiciado o aparecimento de novas combinações alélicas, geradas pela mistura de raças e/ou por novos alelos surgidos por mutações. Se alguns destes alelos ou combinações alélicas conferiram aumento na resistência a doenças, eles foram selecionados, perpetuando-se e aumentando sua frequência nas gerações seguintes. Sendo assim, estes organismos são de especial atenção na busca de um esclarecimento para esta questão.

A grande maioria das doenças que atingem as galinhas é de origem vírica e apesar de serem em número limitado, estes agentes causam efeitos catastróficos na indústria avícola (Bumstead, 1998). Portanto, o aumento da resistência a patógenos virais é de enorme interesse nesta indústria. Como foi visto, os genes B-F são os principais responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune a agentes virais. Logo, tornam-se

necessárias maiores investigações nestes genes para possibilitar um melhor conhecimento sobre a imunidade aos vírus, possibilitando o incremento desta imunidade. Tais investigações ainda não foram realizadas em galinhas ou linhagens caipiras brasileiras. Das técnicas utilizadas para genotipar os genes B-F o seqüenciamento é a única que apresenta 100% de fidelidade; entretanto, é mais cara e trabalhosa do que as demais (requer, além da extração do DNA e da amplificação do fragmento desejado, clonagem, extração do plasmídeo e o seqüenciamento propriamente dito). Assim, técnicas mais ágeis e baratas que apresentem resultados significantes para esta finalidade são sempre pertinentes.



Figura 2. Pintos caipiras.



Figura 3. Galinhas caipiras.



Figura 4. Ovos azuis (figura extraída do site http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm).



Figura 5. Pintos da linhagem Paraíso Pedrês.



Figura 6. Aves da linhagem Paraíso Pedrês.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

II.1. Gerais

Este trabalho teve a finalidade de investigar a variabilidade dos genes B-F, através da técnica de seqüenciamento, em galinhas caipiras brasileiras. Se forem encontrados alelos ainda não descritos em aves industriais típicas, abrir-se-á a possibilidade de uma investigação, em trabalhos posteriores, da associação desses a menor susceptibilidade a doenças encontradas em galinhas e/ou linhagens caipiras, tendo em vista que eles podem ter sido selecionados para propiciar uma maior adaptabilidade a condições adversas. Também é objetivo deste trabalho investigar o polimorfismo do microssatélite LEI0258, assim como a relação dos alelos LEI0258 com os alelos ou haplótipos B-F destas aves. Definindo esta relação, este microssatélite poderá então ser utilizado como ferramenta na genotipagem destes, agilizando, assim, a determinação dos alelos ou haplótipos B-F das galinhas caipiras.

II.2. Específicos

- Obter as seqüências dos dois genes B-F (B-FI e B-FIV) e assim detectar os alelos existentes para estes genes em galinhas caipiras brasileiras;
- Comparar os alelos encontrados com os já descritos na literatura para as linhagens comerciais típicas;
- Deduzir as seqüências de aminoácidos dos alelos dos genes B-F encontrados;
- Investigar o polimorfismo do microssatélite LEI0258 em galinhas caipiras brasileiras;
- Relacionar os alelos LEI0258 encontrados com os haplótipos B-F.

CAPÍTULO III

**1º Artigo: “B-F DNA SEQUENCE VARIABILITY IN BRAZILIAN (BLUE-EGG
CAIPIRA) CHICKENS”**

**C. A. V. Lima-Rosa, C. W. Canal, A. F. Streck, L. B. Freitas, A. D. Cañedo, S. L.
Bonatto, and F. M. Salzano**

Manuscrito submetido à revista ANIMAL GENETICS

***B-F* DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira)
chickens**

C. A. V. Lima-Rosa*, **C. W. Canal[†]**, **A. F. Streck[†]**, **L. B. Freitas***, **A. D. Cañedo***, **S. L. Bonatto[‡]** and **F. M. Salzano***

*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. [†]Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil. [‡]Centro de Biologia Gênômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil

F. M. Salzano, Departamento de Genética, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: francisco.salzano@ufrgs.br

Summary

A total of 100 chickens which eclosed from blue eggs oviposited by a Brazilian (Caipira) breed were studied in relation to exon 2 of the *B-F* genes of the major histocompatibility region. Ninety-eight of them were heterozygotes. Twenty-two animals were selected for additional amplification, cloning, and sequencing experiments, which included 1,048 base pairs of exons 2-4. Twenty-three sequences were obtained, of which at least 13 are new, as compared to previous results. Their inferred protein structures were compared with those previously described, totaling 39 different sequences with amino acid changes in 33 of 88 sites in $\alpha 1$, and 34 of 91 sites in $\alpha 2$ domains. Allele expression was investigated in these animals through cloning experiments. The blue-egg Caipira chickens seem to be a good source of genes for genetic improvement programs.

Keywords: major histocompatibility complex, *B-F* genes, Brazilian chickens, avian genetics, DNA variability.

Introduction

Chicken's major histocompatibility complex (MHC or B complex) is composed by two gene regions: the *B* (Briles *et al.* 1950) and *Y* (*Rfp-Y*; Briles *et al.* 1993) loci. The *B* locus presents three gene classes, I- α (*B-F*), II- β (*B-L*), as well as IV (*B-G*) (Pink *et al.* 1977; Simonsen *et al.* 1982), while the *Y* locus is composed by just the classes I- α (*Y-F*) and II- β (*Y-L*) (Briles *et al.* 1993) genes. At least four class I genes are located in the B complex, the classical *B-FI* and *B-FIV* genes and the non-classical *Y-FV* and *Y-FVI* (Kaufman *et al.* 1992; Miller *et al.* 1994, 1996; Kaufman & Salomonsen 1997). Exons 2 and 3 of these genes codify the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains that form the cleft which presents class I antigens, whose tertiary structure is formed by eight antiparallel β -strands which give support to two parallel α -helices (Kaufman *et al.* 1992).

The class I genes exert the main control of the host resistance to viral diseases (Lamont 1998), that are the most important pathogens in modern aviculture. Therefore, special attention has been given to the presence of genetic differences in the resistance or susceptibility to viral diseases among the several commercial chicken strains (review in Bumstead 1998). Some of these variations are strongly associated with different alleles (or haplotypes) of the chicken genome (Bacon 1987).

Several methods have been applied to the typing of these genes. They vary from the traditional serological tests to the modern molecular techniques. Among the latter, sequencing is the method of choice, since it provides the exact nucleotide composition of a given allele. Guillemot *et al.* (1988), Kroemer *et al.* (1990), Kaufman *et al.* (1992), Pharr *et al.* (1994), Hunt *et al.* (1994), Fulton *et al.* (1995), Li *et al.* (1997, 1999), Hunt & Fulton (1998), Juul-Madsen *et al.* (2000), Livant *et al.* (2001), and Liu *et al.* (2002) have used this technique to characterize at the molecular level the *B-F* genes in commercial breeder lines (Leghorn or broiler chicken lines).

The Brazilian Caipira chickens are the result of random crosses between the different Oriental, Mediterranean, and Southern European races that were introduced in Brazil since the time the first colonizers arrived there, around 1500 (Albino *et al.* 2001). Race admixture and the successive generations with little or no artificial selection produced birds with high resistance to diseases and adverse climate, temperature, and food conditions, especially when compared to the modern industrial chickens (Anonymous 1997). Recently these chickens are being crossed with commercial breeds, with the formation of the so-

called Caipira lines. The objective is to improve the rusticity of commercial birds, so that they can have a better performance when bred in extensive or semi-confined systems (Albino *et al.* 2001). Nothing is known about the polymorphisms of the *B-F* genes in Caipira chickens, nor whether part of these birds' rusticity is due to undescribed *B-F* alleles. A characteristic of some of the Caipira chickens is the oviposition of blue eggs. This trait provides a good marker of the breed, and therefore we decided to investigate the *B-F* genes variability in these animals with a view to future genetic improvement programs.

Materials and methods

Chickens

Blue eggs were collected in farms from Dois Lajeados County, state of Rio Grande do Sul, Brazil. They were placed in a Petersime Industrial incubator machine, and after hatching peripheral blood was collected from the chicks using 0.5% EDTA as anticoagulant.

DNA extraction, amplification, and exon 2 sequencing

Genomic DNA was extracted from the birds' erythrocytes using the standard procedure described by Sambrook *et al.* (1989). Amplification of exon 2 ($\alpha 1$ domain), intron 2, exon 3 ($\alpha 2$ domain), intron 3, and part (the codifying sequence for amino acids 233-239) of exon 4 ($\alpha 3$ domain) was obtained using the B-F1s upstream primer (5'-GCCGAGCTCCATACCCTGCG-3') and the B-F2a downstream primer (5'-GGTGTGGTAGGTGCCGTCGCC-3'), as indicated by Li *et al.* (1997). The total fragment thus obtained contained 1,048 base pairs (bp). The PCR mix was as follows: 100 ng of DNA, 2.5 μ L of 10x buffer (100 mM tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2.5 μ L of PCRx Enhancer System, 2 μ L of dNTP mix (1.25 mM of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.2 μ M of each primer, 2.5 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) and distilled water to obtain a final volume of 25 μ L. The amplification process consisted of a 2-minutes initial denaturation at 95°C, followed by 35

1-minute denaturation cycles at 95°C, one second annealing at 63°C, 2-minutes extension at 72°C, and 10-minutes final extension at 72°C. The short annealing stage followed Ennis *et al.*' (1990) recommendation, and the objective was to avoid the occurrence of PCR-produced errors due to recombination of different alleles, which can occur when the DNA of heterozygotes are amplified. Purification of the PCR products was performed by enzymatic methods using the PCR Product Pre-Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Exon 2 sequencing was performed using the DYEnamic ET DYE Terminator Kit (MegaBACE, Amersham Biosciences) as instructed, in one MegaBACE 1000 machine. Sequencing was performed in both directions with the B-F1s upstream primer, and the B-F3a downstream primer (5'-CGCCRGCTCTGGTT-3')(R=A/G), which corresponds to exon 2's final sequence.

Expression

For the RT-PCR expression studies the lymphocyte isolation from peripheral blood, RNA extraction, and cDNA yield followed the procedures described by Li *et al.* (1997). Primers and amplification conditions were as described above. A 720 bp fragment was obtained. Cloning and sequencing of these fragments were done as described below.

Cloning and sequencing of the cloned PCR fragments

Cloning of the DNA and cDNA fragments was performed using the Topo TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies), as indicated by the manufacturer. To favor the cloning process, PCR products of the appropriate size were isolated using 2% agar gel electrophoresis (GibcoBRL Life Technologies) and stained with ethidium bromide. The DNA or cDNA fragments were then excised and purified using the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), according to the manufacturer's instructions. DNA extraction from the plasmids was obtained using the Concert™ Rapid Plasmid Purification System (Gibco BRL Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Sequencing of the cloned fragments was performed using the same kit and machine employed for the exon 2 investigation. Three clones from at least two animals with the same allele were sequenced (for exceptions see the footnote to Table

1). Sequencing of each clone was done using two fragments, since it was not possible to read a part of the intron 3 sequence in any of the two directions. The first fragment (exon 2, intron 2, exon 3; GenBank accession numbers: AY489138 to AY489160) was sequenced in both directions with the M13 forward primers (from the Topo TA Cloning Kit for Sequencing); B-F5s (5'-GGCTGTGAMATCCTCGAG-3')(M=A/C), which corresponds to codons 98-103 of exon 3; and B-F4a (5'-TCTCCTGCCAGCTC-3'), which corresponds to exon 3's final sequence. The second fragment, including part of exon 4 (GenBank accession numbers: AY489161 to AY489183), was sequenced in one direction only with the M13 reverse primer of the same above-indicated kit. Six to 14 clones of the cDNA of each animal were sequenced in just one direction with the M13 forward primer.

Amino acid comparisons

The amino acid sequences inferred from the DNA data were obtained using the Mega 2 program (Kumar *et al.* 2001). Alignment was performed using the B-F12 sequence described by Guillemot *et al.* (1988) as a model. The residues presumed to contact with the peptide, $\alpha 3$, β_2 -microglobulin, and T-cell receptor are as suggested in Kaufman *et al.* (1992) and Hunt & Fulton (1998).

Allele denomination

Since there is a variety of nomenclatures which were applied to this system, we decided to name the alleles described indicating the locus (B-F) and the Caipira chicken (CC) sequences observed using an arbitrary numbering, subclasses differentiating cases in which the *B-FI* and *B-FIV* loci were different (for instance, B-F*CC3-1 and B-F*CC3-2).

Results

Preliminary survey and nucleotide sequence characterization

Initially, the 100 animals that composed the sample were grouped according to exon 2 DNA sequences. Ninety-eight of them were heterozygotes. After a meticulous analysis 22

animals were selected for additional DNA amplification, cloning, and sequencing. These 22 animals showed most of the alleles detected in the sample, with at least two animals for each allele, with the exceptions indicated at the footnote of Table 1. Twenty-three different sequences were obtained. A total of 143 nucleotide substitutions were found in the 696 coding nucleotides analysed, and they are displayed in Fig. 1, while their inferred amino acid composition is given in Fig. 2. Comparisons were made between each of them and between them and the *B-F* sequences already published in the literature or deposited in the GenBank. However, this comparison is approximate, since the large majority of these sequences are RT-PCR products, and therefore do not include intron 2; while others have this intron but not exon 4. The homologies that could be made with previously identified nucleotide sequences are displayed in Table 1. As shown there, 10 of the 23 sequences could be related to those previously described, although for seven of them, namely AF094779, B^{A1}-1 (AF026913), AF094778, B-FIV2 (AF013492), B-F2minor (Z54322), B-F6major (Z54330), and B-FIV21 (AF013493) no intron 2 information is available; while those labeled as AF342825, AY126668, and AY072913 lack exon 4 data. The B-F*CC7-1 sequence may be one of those present in the heterozygous fragment AF459826, described by Liu *et al.* (2002) and derived from the Egyptian Fayoumi breed.

As for the 13 sequences that are new, three differed in just one nucleotide from already described alleles. B-F*CC17 diverged from B-F14major (Kaufman 1995) at position 320 (T→C, exon 3), B-F*CC8 from B^{A4v} (Li *et al.* 1997) at position 609 (C→T, exon 4), and B-F*CC12 from B^{A1}-2 (Li *et al.* 1999) at position 680 (G→C, exon 4). On the other hand, B-F*CC15-2 differed from B^{A1}-2 by three nucleotides (positions 546, C→T; 576, C→T and 680, G→C, all in exon 4). The remaining sequences diverged from previously described alleles by at least four nucleotides. Comparing the blue-egg Caipira sequences among themselves, B-F*CC12 was different from B-F*CC15-2 by two nucleotides in exon 4 (positions 546, T→C and 576, T→C) and two in intron 2 (positions 149, G→A and 197, G→C; Fig. 3); while the others showed more differences among themselves.

If we restrict our attention to intron 2, only eight different sequences were found (Fig. 3). Fourteen alleles had the same intron sequence, which is identical to that of B-F12 of Kroemer *et al.* (1990), except by the presence of a guanine at position 50. Alleles B-F*CC9-2, B-F*CC4-2, B-F*CC7-1, B-F*CC14, and B-F*CC8 showed an additional point mutation, B-F*CC13 and B-F*CC15-2 two additional point mutations, while B-F*CC3-1

and B-F*CC4-1 presented five point mutations and a 14 bp deletion in relation when compared to B-F12.

Amino acid sequences

The inferred 23 amino acid sequences of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains obtained in the present work were compared with 22 others deduced from data described by other investigators (Fig. 2). A total of 39 different sequences were observed, of which 33 in 88 (37%), and 34 in 91 (37%) sites showed amino acid changes in domains $\alpha 1$ and $\alpha 2$, respectively. In the $\alpha 1$ domain the majority of the polymorphic residues (24/33 or 73%) occur in or around the region that forms the α -helix (indicated by === in Fig. 2), while in $\alpha 2$ 65% (22/34) are in or around the region that forms the four β -strands (+++ in Fig. 2). Fifteen (45%) of these 33 variable $\alpha 1$ and 11/34 (32%) of the $\alpha 2$ domain residues are peptide binding sites (PBS; P in Fig. 2). Since there are a total of 20 PBS in the $\alpha 1$ and 17 in the $\alpha 2$ domains (Kaufman et al. 1992), 15/20 or 75% and 11/17 or 65% of these residues are polymorphic in these two regions. No variability was found in the six residues (three in the $\alpha 1$ and three in the $\alpha 2$ domains; A in Fig. 2) that contact with the $\alpha 3$ domain. The variability found in the contact $\alpha 1/\alpha 2$ sites with β_2 -microglobulin (B in Fig. 2) is lower ($\alpha 1$: 2/10, 20%; $\alpha 2$: 2/9, 22%) than those found in the PBS or TCR (T-cell receptor) sites. In the latter (T in Fig. 2) variation is found in 67% (4/6) and 50% (5/10) of the $\alpha 1$ e $\alpha 2$ domains, respectively.

Some sequences are identical in both the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains (*CC8 and B^{A4v}; B-FIV13 and B-F4major; *CC4-2 and B^{A9}-1; *CC12, *CC15-2, B^{A1}-2, and B-F4minor). On the other hand, *CC16 and B-F19major, *CC17 and B-F14major, as well as *CC6-2 and *CC12, present the same $\alpha 1$, but differ respectively by two, one, and two amino acids in the $\alpha 2$ domain; these are mainly PBS residues. Conversely B-F19major and B-FIV19v1, *CC3-1 and B-FIV17, *CC11 and *CC1, as well as B-F12minor and B-F19minor, are identical in the $\alpha 2$ domain, but differ respectively in one, three, five, and one amino acids in $\alpha 1$; again, these are chiefly PBS residues. The other sequences proved to be unique in both domains.

Allele expression

Allele expression was investigated in three animals which differed in the number of amplified DNA sequences, and the results obtained were as follows: (a) animal no. 169 (*CC1/*CC12): eight clones, five *CC1 and three *CC12; (b) no. 125 (*CC7-1/*CC7-2/*CC13): 14 clones, 13 *CC7-1 and one *CC13; none with *CC7-2; and (c) no. 132 (*CC3-1/*CC3-2/*CC4-1/*CC4-2): six clones, three *CC3-1 and three *CC4-1; none with *CC3-2 or *CC4-2.

Discussion

As expected from breeds that cross freely in nature, we have observed a high variability in the *B-F* locus of blue-egg Caipira chicken. No less than 13 of the 23 sequences had not been described before, and for the other 10, although they can be assigned to previously described sequences, this preliminary evaluation may be conservative due to lack of comparative data in some of the DNA regions. This high variability was also observed by Iglesias *et al.* (2003) studying this same system in Camperos broiler chickens through PCR-SSCP. A target for future studies will be the determination if carriers of these new sequences identified by us present a differential performance in relation to specific pathogens. Since the changes are located in and around the functional region of the protein, the hypothesis of adaptive changes is likely.

The problem of the differential amplification of DNA sequences from regions that harbour the *B-FI* and *B-FIV* genes is a complex one. Theoretically, if all animals are heterozygous for the two genes, four different sequences are expected. While the MHC region is generally highly variable, population constraints due to diverse histories make the assumption of permanent heterozygosity unlikely. The distribution observed in the present work (amplification of just two sequences in 10 animals; of three in seven; and of four in five) is not much different from that expected if homozygosity is present in some of these regions. The alternative is that the absence of amplification, in some cases, may be due to primer construction. The set of primers we have used was chosen because they had been previously utilized by other authors (Li *et al.* 1997, 1999; Livant *et al.* 2001), and also because they amplify fragments that codify the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains, responsible for the

antigen presenting cleft of these class I molecules. However, Kaufman *et al.* (1999) used different primers from those employed here, which amplified the upstream region, corresponding to the promoter down to exon 3 (while ours included exon 2 down to exon 4), and obtained similar results. Haplotypes B14 and B15 had just one gene amplified, while the others (B2, B4, B6, B12, B19, and B21) had two, either when DNA (Kaufman *et al.* 1999) or cDNA (Kaufman *et al.* 1995) was utilized.

Guillemot *et al.* (1988), Kaufman *et al.* (1992), Fulton *et al.* (1995), and Hunt & Fulton (1998) have made a comparative analysis of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains of chicken class I molecules with those from humans and other species. The variation observed here in chicken *B-F* molecules are similar, but somewhat higher (around 37%) than those observed by Hunt & Fulton (1998), which varied from 27% to 24% ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains, respectively), but this would be expected, since a larger number of sequences were considered here. As was observed by other authors, the variability found by us was higher in the α -helix of the $\alpha 1$ and in the β -strands of the $\alpha 2$ domains. Eleven of 13 PBS residues of this α -helix and all those of the β -strands are polymorphic, suggesting that this variation is important for the proper functioning of antigen presentation in this species.

The absence of *CC3-2, *CC4-2, and *CC7-2 clones in the cDNA studies could be due to their low levels of expression. Ten-fold differences in expression had been previously observed in these genes (for instance, Guillemot *et al.* 1988; Kaufman *et al.* 1999; Li *et al.* 1999). In this regard, the fact that of the 14 clones obtained from animal no. 125, 13 were *CC7-1 suggests differential expression between this and the other sequences (*CC7-2 and *CC13). The question of the differential expression of *B-F* genes remains open for further investigations.

Acknowledgements

We thank Luciane M. P. Passaglia for laboratory help. Financial assistance was provided by Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS).

References

- Albino L.F.T., Vargas Jr. J.G. & Silva J.H.V. (2001) *Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa*. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, MG, Brazil.
- Anonymous (1997) Caipiras com pedigree. *Globo Rural* **139**, 51-8.
- Bacon L.D. (1987) Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. *Poultry Science* **66**, 802-11.
- Briles W.E., McGibbon W.H. & Irwin M.R. (1950) On multiple alleles affecting cellular antigens in chicken. *Genetics* **35**, 633-52.
- Briles W.E., Goto R.M., Auffray C. & Miller M.M. (1993) A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **37**, 408-14.
- Bumstead N. (1998) Genetic resistance to Avian viruses. *Reviews in Science and Technology* **17**, 249-55.
- Ennis P.D., Zemmour J., Salter R.D. & Parham P. (1990) Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: frequency and nature of errors produced in amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 2833-7.
- Fulton J.E., Thacker E.L., Bacon L.D. & Hunt H.D. (1995) Functional analysis of avian class I (BFIV) glycoproteins by epitope tagging and mutagenesis *in vitro*. *European Journal of Immunology* **25**, 2069-76.
- Guillemot F., Billault A., Pourquié O., Béhar G., Chaussé A.-M., Zoorob R., Kreibich G. & Auffray C. (1988) A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II β genes are closely linked to the class I genes and nucleolar organizer. *EMBO Journal* **7**, 2775-85.
- Hunt H.D. & Fulton J.E. (1998) Analysis of polymorphisms in the major expressed class I locus (B-FIV) of the chicken. *Immunogenetics* **47**, 456-67.

- Hunt H.D., Pharr G. & Bacon L.D. (1994) Molecular analysis reveals MHC class I intra-locus recombination in the chicken. *Immunogenetics* **40**, 370-5.
- Iglesias G.M., Soria L.A., Goto R.M., Jar A.M., Miquel M.C., Lopez O.J. & Miller M.M. (2003) Genotypic variability at the major histocompatibility complex (*B* and *Rfp-Y*) in Camperos broiler chickens. *Animal Genetics* **34**, 88-95.
- Juul-Madsen H.R., Dalgaard T.S. & Afanassieff M. (2000) Molecular characterization of major and minor MHC class I and II genes in B²¹-like haplotypes in chickens. *Animal Genetics* **31**, 252-61.
- Kaufman J. (1995) *Direct submission to the GenBank nucleotide database. Accession numbers: Z54314, Z54315, Z54317, Z54318, Z54320, Z54322, Z54324, Z54325, Z54330.*
- Kaufman, J. & Salomonsen J. (1997) The “Minimal Essential MHC” revisited: Both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas* **127**, 67-73.
- Kaufman J., Andersen R., Avila D., Engberg J., Lambris J., Salomonsen J., Welinder K. & Skjodt K. (1992) Different features of the MHC class I heterodimer have evolved at different rates: chicken B-F and β_2 -microglobulin sequences reveal invariant surface residues. *Journal of Immunology* **148**, 1532-46.
- Kaufman J., Völk H. & Wallny H.J. (1995) A “minimal essential MHC” and an “unrecognized MHC”: two extremes in selection for polymorphism. *Immunological Reviews* **143**, 63-88.
- Kaufman J., Jacob J., Shaw I., Walker B., Milne S., Beck S. & Salomonsen J. (1999) Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunological Reviews* **167**, 101-17.
- Kroemer G., Zoorob R. & Auffray C. (1990) Structure and expression of a chicken MHC class I gene. *Immunogenetics* **31**, 405-9.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. & Nei M. (2001) Mega 2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-5.

- Lamont S.J. (1998) Impact of genetics on disease resistance. *Poultry Science* **77**, 1111-8.
- Li L., Johnson W.L. & Ewald S.J. (1997) Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Animal Genetics* **28**, 258-67.
- Li L., Johnson W.L., Livant E.J. & Ewald S.J. (1999) The MHC of broiler chicken line: serology, B-G genotypes, and B-F/B-L β sequences. *Immunogenetics* **49**, 215-24.
- Liu W., Miller M.M. & Lamont S.J. (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms with vaccine or challenge response to *Salmonella enteritidis* in young chickens. *Immunogenetics* **54**, 582-90.
- Livant E.J. & Ewald S.J. (2002) *Direct submission to the GenBank nucleotide database. Accession numbers: AY072913, AY126668, AF342825, AF469127, AF483195.*
- Livant E.J., Zheng D., Johnson L.W., Shi W. & Ewald S.J. (2001) Three new MHC haplotypes in broiler breeder chickens. *Animal Genetics* **32**, 123-31.
- Miller M.M., Goto R., Bernot A., Zoorob R., Auffray C., Bumstead N. & Briles W.E. (1994) Two MHC class I and two MHC class II genes map to the chicken *RFP-Y* system outside the B complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 4397-401.
- Miller M.M., Goto R., Taylor Jr. R.L., Zoorob R., Auffray C., Briles R.W., Briles W.E. & Bloom S.E. (1996) Assignment of *Rfp-Y* to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 3958-62.
- Pharr G.T., Bacon L.D. & Dodgson J.B. (1994) A class I cDNA from SPAFAS line-11 chickens. *European Journal of Immunology* **21**, 59-66.
- Pink J.R.L., Droege W., Hala K., Miggianno V.C. & Ziegler A. (1977) A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **5**, 203-16.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Simonsen M., Crone M., Koch C. & Hála K. (1982) The MHC haplotypes of chicken. *Immunogenetics* **16**, 513-32.

Table 1 Characterization of the nucleotide sequences observed in 22 blue-egg Caipira chickens¹

Individual Number	Nucleotide sequences of <i>B-F</i> genes	
	Microchromosome 16 A ²	Microchromosome 16 B ²
105	B-F*CC1 (AF094779)	B-F*CC2 (AF342825)
113	B-F*CC1 (AF094779)	B-F*CC3-1 (new) B-F*CC3-2 (new)
116	B-F*CC1 (AF094779)	B-F*CC8 (new)
169	B-F*CC1 (AF094779)	B-F*CC12 (new)
114	B-F*CC2 (AF342825)	B-F*CC5 (new)
132	B-F*CC3-1 (new) B-F*CC3-2 (new)	B-F*CC4-1 (B ^{A1} -1) B-F*CC4-2 (AY126668)
119	B-F*CC3-1 (new) B-F*CC3-2 (new)	B-F*CC5 (new)
124	B-F*CC3-1 (new) B-F*CC3-2 (new)	B-F*CC9-1 (B-FIV2) B-F*CC9-2 (B-F2minor)
183	B-F*CC4-1 (B ^{A1} -1) B-F*CC4-2 (AY126668)	B-F*CC4-1 (B ^{A1} -1) B-F*CC4-2 (AY126668)
129	B-F*CC4-1 (B ^{A1} -1) B-F*CC4-2 (AY126668)	B-F*CC13 (new)
147	B-F*CC6-1 (AF094778) B-F*CC6-2 (AY072913)	B-F*CC7-1 (new) B-F*CC7-2 (new)
133	B-F*CC6-1 (AF094778) B-F*CC6-2 (AY072913)	B-F*CC8 (new)
125	B-F*CC7-1 (new) B-F*CC7-2 (new)	B-F*CC13 (new)
131	B-F*CC9-1 (B-FIV2) B-F*CC9-2 (B-F2minor)	B-F*CC9-1 (B-FIV2) B-F*CC9-2 (B-F2minor)
156	B-F*CC9-1 (B-FIV2;) B-F*CC9-2 (B-F2minor)	B-F*CC16 (new)
179	B-F*CC10 (new)	B-F*CC10 (new)
174	B-F*CC10 (new)	B-F*CC11 ³ (B-F6major)
135	B-F*CC10 (new)	B-F*CC12 (new)
151	B-F*CC12 (new)	B-F*CC14 (new)
145	B-F*CC12 (new)	B-F*CC17 ³ (new)
139	B-F*CC14 (new)	B-F*CC16 (new)
213	B-F*CC15-1 ³ (B-FIV21) B-F*CC15-2 ³ (new)	B-F*CC13 (new)

¹The homologies to sequences previously described in the literature are based on partial comparisons with the whole region sequenced here, since some of these early studies did not include either intron 2 or exon 4. See the text for further details. Sources for the previously reported sequences are as follows: AF094778 and AF094779: Livant *et al.* (2001); AF342825, AY126668, and AY072913: Livant & Ewald (2002); B^{A1}-1 (AF026913): Li *et al.* (1999); B-FIV2 (AF013492) and B-FIV21 (AF013493): Hunt & Fulton (1998); B-F2minor (Z54322) and B-F6major (Z54330): Kaufman (1995).

²Letters A and B were randomly assigned to the two members of this chromosome pair.

³Differently from the other sequences, always obtained from at least two animals, these occurred in one animal only. In these cases two independent amplification and cloning experiments had been performed, and sequencing done in at least three clones for each allele by experiment to assure the reliability of the results.

Figure 1. Nucleotide changes observed in exons 2, 3, and 4 (partial) sequences of the *B-F* genes of blue-egg Caipira chickens as compared to B-F12 (M31012; Kroemer *et al.* 1990), and others sequences described in the literature. Sites surveyed: 1-696.

Figure 2. The 23 inferred amino acid sequences of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains of blue-egg Caipira chickens determined here, compared with 22 others deduced from data described in the literature. The numbers above the sequences indicate the positions of the residues. The points in the sequences denote identities. Symbols above the numbers indicate structural positions and orientation of the residues in the α -helix (+++) and the β -strands (===). Presumed contacts with the peptides are indicated by P; with $\alpha 3$ by A; with $\beta 2$ -microglobulin by B; and with the T-cell receptor by T, as presented in Kaufman *et al.* (1992) and Hunt & Fulton (1998). Sources for the sequences obtained in the other studies: 1. B-F12 (GenBank accession number: M31012), Kroemer *et al.* (1990); 2. B¹⁵ and B¹⁹ (GenBank accession numbers: L28958 and L28959), Hunt *et al.* (1994); 3. B-F12 minor, B-F14 major, B-F19 major, B-F19 minor, B-F4 major, B-F4 minor, and B-F6 minor (GenBank accession numbers: Z54314, Z54315, Z54317, Z54318, Z54323, Z54324, and Z54325), Kaufman (1995); 4. B^{A4v}, B^{A9}-1, B^{A1}-2, and B^{A9}-2 (GenBank accession numbers: U88299, AF026914, AF026915, and AF026916), Li *et al.* (1997, 1999); 5. B-FIV5, B-FIV13, B-FIV17, and B-FIV18 (GenBank accession numbers: AF013491, AF013494, AF013495, and AF013496), Hunt & Fulton (1998); 6. AF094777, Livant *et al.* (2001); 7. AF469127 and AF483195, Livant & Ewald (2002); 8. B-FIV19v1 described in Kaufman *et al.* (1992) and renamed in Hunt *et al.* (1994). Sites surveyed: 1-179.

Figure 3. Intron 2 sequences of the *B-F* genes of blue-egg Caipira chickens compared to B-F12 (M31012; Kroemer *et al.* 1990). Sequence 1: B-F*CC1, *CC2, *CC3-2, *CC5, *CC6-1, *CC6-2, *CC7-2, *CC9-1, *CC10, *CC11, *CC12, *CC15-1, , *CC16, and , *CC17; sequence 2: B-F*CC9-2; sequence 3: B-F*CC4-2; sequence 4: B-F*CC7-1; sequence 5: B-F*CC14; sequence 6: B-F*CC8; sequence 7: B-F*CC13 and *CC15-2; sequence 8: B-F*CC3-1 and *CC4-1. Sites surveyed: 1-229.

Figure 1 (Cont.)

Part of Exon 4

```

55555566666666666666
44777923455567889
36367490834925786
B-F12          GCCCGCTTCCGGGCCGC
AF094778/B-F*CC6-1  .....C.....G...
B-F*CC7-1      .....AG...
B-F*CC13       .....C.....AG...
AF342825/B-F*CC2   .....CC.....G.A.
B-F*CC5        .....G.AT
B-F*CC10       A.....G..T
BA1-1/B-F*CC4-1   .....T.AA.G...
B-F*CC3-1      ....A.....AG...
B-F*CC16       .....CC.....GT..
B-F*CC8        .....CC....AG...
B-F*CC17       .....G...
B-F*CC7-2      .T....CC..A..G...
B-F2minor/B-F*CC9-2 .T.....G...
B-FIV21/B-F*CC15-1 A.....G...
B-F*CC14       .....G...
B-FIV2/B-F*CC9-1  .....
B-F6major/B-F*CC11 .....C.....G...
AF094779/B-F*CC1   .....G...
B-F*CC15-2     .....A..G.AT
B-F*CC12       .T.T.....A..G.AT
AY072913/B-F*CC6-2 A.....T...G...
B-F*CC3-2      A...AG...T...G...
AY126668/B-F*CC4-2 ..T...CC.....G...

```


Figure 2

$\alpha 1$ domain

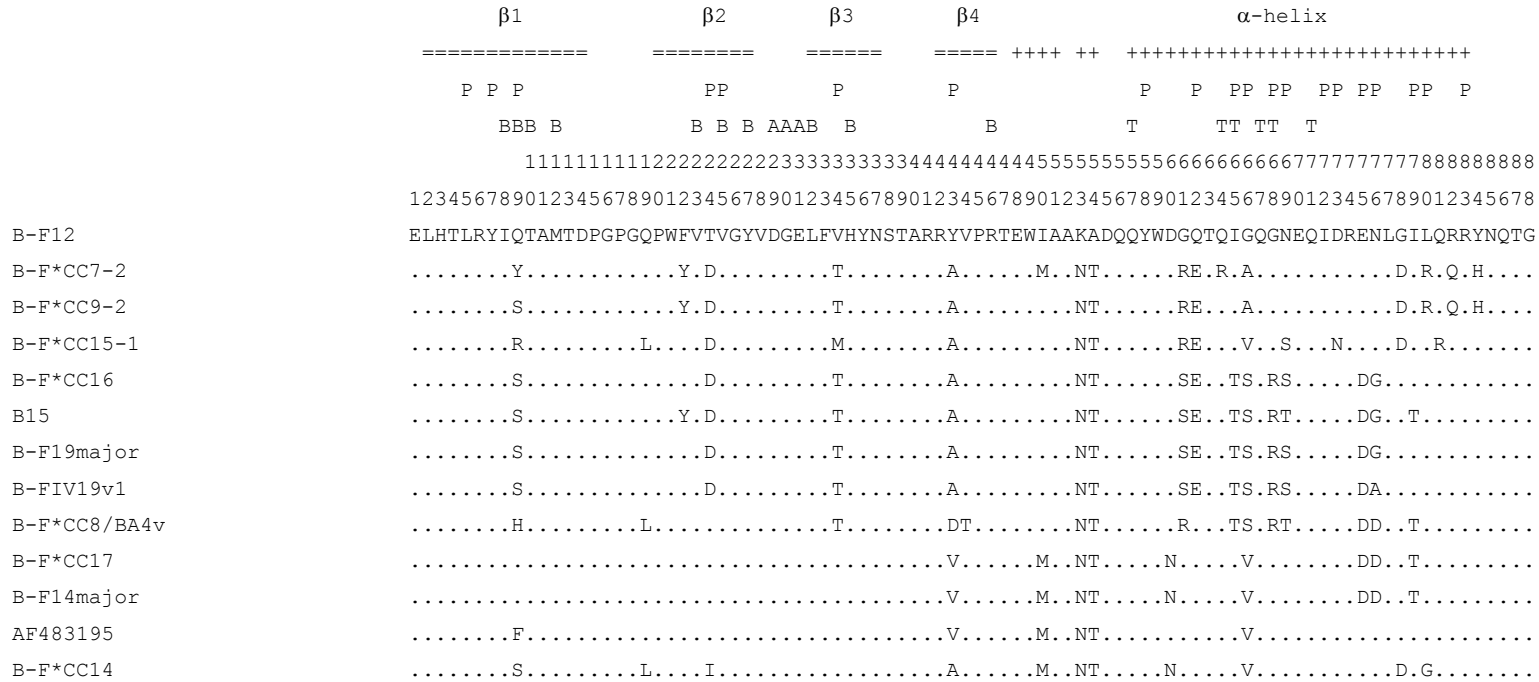


Figure 2 (Cont.)

B-F*CC4-1H.....L.....I.....M.....A.....M.....RE...E.H.....T.....
B-F*CC3-1H.....L.....I.....M.....V.....M.....RE...E.H.....T.....
B-FIV17H.....L.....I.....M.....A.....M.....E.H.....T.....
B-F*CC9-1R.....L..Y.D.....
B19R.....L..Y.D.....RS.....
B-FIV5S.....L.....V.....T.....M.....E.....D..R.....
AF094777H.....D.....M..R..R.....L..N.....
B-F*CC5R.....NT.....R.....D.G.....
B-FIV13/B-F4majorR.....NT.....L..N.....R.....
B-F*CC10VH.....L.....I.....F.....M.....RV.....V..DD..T.....
B-F*CC2S.....D.....M.....M..NT.....RV.....H..T.HG..DT.R.....
B-F6minorD.....T.....A.....M.....RE.....H..T.HG.....
BA9-2Y.....L.....I.....M.....A.....M.....L..H..VNS.D.DT.....
B-FIV18F.....L.....A.....M.....N.....V.....I.....
B-F*CC6-1S.....L.....M..NT.....A.....T.R.....
B-F*CC7-1S.....D.....T.....A.....M..NT.....A.....S.....T.R.....
B-F*CC13S.....D.....M..NT.....T.HG..T.....
B-F*CC11L.....A.....M.....RE.....R..RSVKVS.DT..E.....
B-F*CC1Y.....L.....M.....L..RSVKVS.DT..E.....
B-F12minorVH.....L.....D.....M..NT.....RSVEVS.NT..E.....
B-F19minorVH.....L.....D.....M..NT.....RSVKVS.NT..E.....

Figure 2 (Cont.)

B15L.....D.T....S.D.....I....D.....GDYA.GL.Q.....
B-F19majorD.T....R.Y.....I.....GDYA.GL.Q.....
B-FIV19v1D.T....R.Y.....I.....GDYA.GL.Q.....
B-F*CC8/BA4vL.....D.T....R.D.....I.....VDYA.S.....
B-F*CC17L.....D.T....S.D.....I.....GDYA.GL.Q.....
B-F14majorL.....D.TT...S.D.....I.....GDYA.GL.Q.....
AF483195Q.....D.T....S.D.....I.....S.....GDYA.GL.Q.....G.....
B-F*CC14R.....D.T....H.T.....I....AK.....GGYA.GL.Q.....
B-F*CC4-1R.S.....D.T....E.D....I.....GGYA.GL.Q.....
B-F*CC3-1R.S.....D.T....E.D....I.....GDYA.GL.Q.....
B-FIV17R.S.....D.T....E.D....I.....GDYA.GL.Q.....
B-F*CC9-1GDYA.GL.Q.....
B19D.T....R.Y.....I.....GDYA.GL.Q.....
B-FIV5D.T....T.....I.....GDYA.GL.Q.....G.....
AF094777T.....D.T....H.E.....I.LAEDMK.....S.....GYA.K.Q.....
B-F*CC5A.S.....S.....I.....S.....
B-FIV13/B-F4majorF.....D.T....R.S.....I.L..DMK.....
B-F*CC10R.....D.T....S.Y.....I....K.....M.....
B-F*CC2A.....D.T....S.Y.....I.L..DMK.....VDYA.....A.....
B-F6minorA.....D.T....S.Y.....I.L..DMK.....GDVA.....
BA9-2A.....I.L..DMK.....VDYA.S.....

Figure 2 (Cont.)

B-FIV18L.....D.T....S.Y.....I.L..D.K.....S.....VDYA.S.....A.....
B-F*CC6-1F.....G.S.....F.E.....LI....D.....S.....GGVA.G..S.....
B-F*CC7-1G.S.....F.E.....LI....D.....S.....GGVA.G..S.....
B-F*CC13VGVA.....
B-F*CC11	...A.....D.T....H.E.....I.L..DMK.....GGVA.GR.Q.....
B-F*CC1	...A.....D.T....H.E.....I.L..DMK.....GGVA.GR.Q.....
B-F12minorL.....D.T....H.T.....I.....GGVA...S.....G.....
B-F19minorL.....D.T....H.T.....I.....GGVA...S.....G.....
B-F*CC4-2/BA9-1	...L.....E...D.T....S.Y.....I.....K.....GGVA.V.....G.....
B-F*CC6-2F.....D.T....H.....K..I...DMK.....GGVA.G..S.....
B-F*CC12/B-F*CC15-2/ B-F4minor/BA1-2F.....D.T....R.V...K..I...DMK.....GGVA.G..S.....
B-F*CC3-2L.S.....D.T....R.Y....K..I...DMK.....GGVA.GL.Q.....
AF469127F.....D.T....H.....I.....S.....GGVA.G..S.....-----

CAPÍTULO IV
**2º Artigo: “LEI0258 MICROSATELLITE VARIABILITY AND ITS
RELATIONSHIP TO B-F HAPLOTYPES IN BRAZILIAN (BLUE-EGG
CAIPIRA) CHICKENS”**
**C. A. V. Lima-Rosa, C. W. Canal, P. R. V. Fallavena, L. B. Freitas,
and F. M. Salzano**

Manuscrito submetido à revista POULTRY SCIENCE

RESEARCH NOTE

LEI0258 Microsatellite Variability and its Relationship to *B-F* Haplotypes in Brazilian (Blue-Egg Caipira) Chickens¹

C. A. V. Lima-Rosa,* C. W. Canal,† P. R. V. Fallavena,* L. B. Freitas,* and F. M. Salzano*²

*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, and †Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

¹Research supported by Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS).

²To whom correspondence should be addressed: francisco.salzano@ufrgs.br

ABSTRACT A total of 149 chickens from two different sources (one non-commercial, the other commercial) was tested for variability in relation to the LEI0258 microsatellite. Fifty- three genotypes, explainable by 15 alleles, were found. There are clear allele and heterozygosity differences between the two samples. One of them was simultaneously studied in relation to the MHC *B-F* haplotypes. Strong genetic disequilibrium was observed between the variants of the two systems, therefore providing a cheap alternative for MHC genotyping.

(*Key words:* microsatellite, LEI0258, *B-F* haplotypes, Brazilian chickens)

INTRODUCTION

Microsatellites (also called short tandem repeats or STRs) are moderately repetitive DNA sequences with small core sizes (di-, tri- or tetranucleotides mainly) that have been widely used for the investigation of a series of problems, including those which occur in chickens (Kaiser et al., 2000). McConnell et al. (1999) described one such tetranucleotide repeat system (LEI0258), located in chicken's microchromosome 16. Molecular markers in this chromosome are of special interest, since the major histocompatibility B complex also occurs there (Wain et al., 1998). LEI0258 is the only microsatellite described for this chromosome, and is placed near the *B-F/B-L* region. Up to now no study had been performed in relation to this STR's population variability.

We recently investigated the *B-F* region of a Brazilian (Caipira) breed. These animals are characterized by their rusticity, and therefore as potential sources for resistance genes against diseases and adverse climate, temperature, and food conditions. Twenty-three different DNA sequences were identified, of which at least 13 were new when compared to previous results (Lima-Rosa et al., unpublished data). It would be important to verify whether the LEI0258 variants would be associated with these alleles, since they could provide markers detectable with an easier (and cheaper) laboratory method than sequencing. This was the objective of the present investigation. In addition, we wanted to verify if different Caipira populations would present significant genetic heterogeneity.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals

Two populations were studied. Since an interesting characteristic of some Caipira chickens is the oviposition of blue eggs, such eggs had been collected in farms from Dois Lagados county, state of Rio Grande do Sul, Brazil. They were then placed in a Petersime Industrial incubator machine until hatching. Additionally, Paraíso Pedrês chicks (a Caipira commercial line) were purchased from the Aves do Paraíso farm, located at km 10 of Romildo Prado highway, in Itatiba, state of São Paulo, Brazil. Peripheral blood from these animals was collected using 0.5% EDTA as anticoagulant.

DNA Extraction, Amplification, and Microsatellite Typing

Genomic DNA was extracted from the birds' erythrocytes using Sambrook et al. (1989) standard method. Amplification by the polymerase chain reaction (PCR) was performed as described by McConnell et al. (1999), with some adjustments, from total DNA. The primers used were those described by these authors: Z83781 (5'–CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG–3') and T15iG09 (5'–AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC–3'). The mixtures for the PCR reactions, and reagent concentrations, were as follows: 50 ng of DNA, 2.5 µL of 10x buffer (100 mM tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg Cl₂), 2.5 µL of PCRx Enhancer System buffer (Invitrogen Life Technologies), 2 µL of dNTP mix (1.25 mM of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), one µM of each primer, 0.25 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) and distilled water to obtain a final volume of 25 µL. The amplification conditions consisted of a 1-minute initial denaturation at 96°C, followed by 35 1-minute denaturation cycles at 96°C, 30 seconds annealing at 54°C, 30 seconds extension at 72°C, and 3-minutes of final extension at 72°C. The PCR products were analyzed by vertical electrophoresis in 7% non-denaturing polyacrilamide gel (Lahiri et al., 1997).

B-F Haplotype Classification

The *B-F* haplotype variability in the Caipira sample had been previously evaluated through sequencing, and cloning techniques described in Lima-Rosa et al. (unpublished). Briefly, the primers were those indicated by Li et al. (1997), the PCR conditions those described by Li et al. (1997) and Ennis et al. (1990), and the sequences were obtained using a MegaBACE 1000 machine. As for the cloning studies, they had been performed using the Topo TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies).

Statistical Analysis

Allele frequencies were determined by gene counting and the fit to the Hardy-Weinberg equilibrium by the Markov chain method (Guo and Thompson, 1992) using version 2000 of the Arlequin program (Schneider et al., 2000). The interpopulation

comparison of the allele frequencies was performed by the chi-square test (Roff and Bentzen, 1989), while the LEI0258/*B-F* linkage disequilibrium was also determined by the Arlequin program, D' being manually calculated as described by Lewontin (1988).

RESULTS AND DISCUSSION

The 53 genotypes found, and their frequencies in the two samples, are listed in Table 1, while the derived allele frequencies are given in Table 2. A total of 15 alleles were observed in the 149 chickens tested, their sizes varying between 205 and 457 bp. Nine alleles were present in the two samples, but M7, M9, and M14 were only found among the blue-egg Caipira chickens, while M10, M11, and M15 occurred exclusively in the Paraíso Pedrês sample. There are clear allele differences between the two populations ($\chi^2=111.4$; $p<0.0001$). The three most frequent alleles in the blue-egg Caipira sample were M2 (42%), M8 (16%), and M4 (15%), while for Paraíso Pedrês they were M4 (16%), M12 (15%), and M1 (14%). The observed heterozygosity was 50% in blue-egg Caipira and 75% in Paraíso Pedrês chickens. Good genotype frequency fit to the Hardy-Weinberg predictions was obtained in the Paraíso Pedrês ($p:0.207$) but not in the blue-egg Caipira ($p<0.001$) samples.

The number of alleles observed in our material is high (15); the study of other microsatellites by other authors in non-commercial chickens detected at most 11 alleles per locus (Takahashi et al., 1998; Zhou and Lamont, 1999; Wimmers et al., 1999, 2000; Marle-Köster and Nel, 2000). This could be due to the fact that LEI0258 is located in a region where genes of the major histocompatibility B complex also occur, which could be under the influence of diversifying selection. Be as it may, this variability condition that this system may turn out to be quite useful in the investigation of different academic and applied problems.

Our sample derived from two distinct populations, one which was subjected to artificial selection, while the other was from animals raised without control. The number of alleles detected in each (12), however, was the same. Allele distribution and degree of heterozygosity, on the other hand, were different. This is not surprising, since they originated from widely separated (about one thousand kilometers) populations. Founder effects or even some adaptative advantage of given alleles, may explain the differences. The fact that the blue-egg Caipira sample is not in Hardy-Weinberg equilibrium may be

due to the fact that the eggs were obtained at random in the different farms, and some hens may have contributed in a differential, disproportionate way to the sample.

Information about the association between the LEI0258 alleles and *B-F* haplotypes in the blue-egg Caipira chickens is provided in Table 3. Five alleles (M3, M7, M12, M13, M14) showed association with just one *B-F* haplotype, other five (M1, M5, M6, M8, M9) to two, and just two (M2, M4) to three. *B-F*CC12* was the only haplotype associated with two LEI0258 alleles (M7 and M9). Linkage disequilibrium was quite high ($\chi^2=637.3$; $p<0.0001$).

The strong association between LEI0258 alleles and *B-F* haplotypes has important theoretical and practical applications. First, the microsatellites may provide indirect information about the population distribution of *B-F* markers. But perhaps of higher value is the fact that in 42% of the cases there was a direct correspondence between a given LEI0258 allele and a specific *B-F* haplotype, providing an easier method for determination of the latter (*B-F* typing generally requires sequencing techniques). Even in the case that more than one *B-F* haplotype is associated with a LEI0258 allele, allele specific (PCR-SSP; Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers) typing can be performed with a restricted number of options (two or three) thus considerably reducing the cost of *B-F* genotyping.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marilu Fiegenbaum and Silvana de Almeida for statistical help.

REFERENCES

- Ennis P. D., J. Zemmour, R. D. Salter, and P. Parham. 1990. Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87:2833-7.
- Guo, S. W., and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.

- Kaiser, M. G., N. Yonash, A. Cahaner, and S. J. Lamont. 2000. Microsatellite polymorphism between and within broiler populations. *Poult. Sci.* 79:626-628.
- Lahiri, D. K., A. Zhang, and J. I. Nurnberger. 1997. High-resolution detection of PCR products from microsatellite markers using a nonradiosotopic technique. *Biochim. Mol. Med.* 60:70-75.
- Lewontin, R. C. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120:849-852.
- Li L., W. L. Johnson, and S. J. Ewald. 1997. Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Anim. Genet.* 28:258-67.
- Marle-Köster, E. van, and L. H. Nel. 2000. Genetic characterization of native southern African chicken populations: evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers. *South Afr. J. Anim. Sci.* 30:1-6.
- McConnell, S. K. J., D. A. Dawson, A. Wardle, and T. Burke. 1999. The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. *Anim. Genet.* 30:183-189.
- Roff, D. A., and P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.* 6:539-545.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schneider, S., J.-M. Kueffer, D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2000: a software for population data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Takahashi, H., K. Nirasawa, Y. Nagamine, M. Tsudzuki, and Y. Yamamoto. 1998. Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *J. Hered.* 89:543-546.

- Wain, H. M., A. A. Toyé, S. Hughes, and N. Bumstead. 1998. Targeting of marker loci to chicken chromosome 16 by representational difference analysis. *Anim. Genet.* 29:446-452.
- Wimmers, K., S. Ponsuksili, F. Schmoll, T. Hardge, E. B. Sonaiya, K. Schellander, and P. Horst. 1999. Application of microsatellite analysis to group chicken according to their genetic similarity. *Arch. Tierz.* 42:629-639.
- Wimmers, K., S. Ponsuksili, T. Hardge, A. Valle-Zarate, P. K. Mathur, and P. Horst. 2000. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. *Anim. Genet.* 31:159-165.
- Zhou, H., and S. J. Lamont. 1999. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Anim. Genet.* 30:256-264.

TABLE 1. LEI0258 genotype frequencies in two samples of Brazilian chickens

Genotypes	Allele sizes (bp)	Blue-egg Caipira		Paraíso Pedrês	
		N	%	N	%
<i>M1/M1</i>	205/205	1	1.00	4	8.16
<i>M1/M2</i>	205/217	5	5.00	-	-
<i>M1/M3</i>	205/229	1	1.00	-	-
<i>M1/M4</i>	205/265	3	3.00	2	4.08
<i>M1/M5</i>	205/277	1	1.00	1	2.04
<i>M1/M6</i>	205/301	-	-	1	2.04
<i>M1/M7</i>	205/313	1	1.00	-	-
<i>M1/M8</i>	205/325	3	3.00	-	-
<i>M1/M11</i>	205/385	-	-	1	2.04
<i>M1/M15</i>	205/457	-	-	1	2.04
<i>M2/M2</i>	217/217	30	30.00	2	4.08
<i>M2/M3</i>	217/229	1	1.00	-	-
<i>M2/M4</i>	217/265	7	7.00	1	2.04
<i>M2/M5</i>	217/277	1	1.00	2	4.08
<i>M2/M8</i>	217/325	9	9.00	-	-
<i>M2/M10</i>	217/373	-	-	2	4.08
<i>M2/M12</i>	217/397	-	-	1	2.04
<i>M3/M3</i>	229/229	-	-	1	2.04
<i>M3/M4</i>	229/265	1	1.00	-	-
<i>M3/M8</i>	229/325	1	1.00	-	-
<i>M3/M11</i>	229/385	-	-	1	2.04
<i>M4/M4</i>	265/265	6	6.00	2	4.08
<i>M4/M5</i>	265/277	1	1.00	2	4.08
<i>M4/M6</i>	265/301	-	-	1	2.04
<i>M4/M8</i>	265/325	6	6.00	-	-
<i>M4/M10</i>	265/373	-	-	2	4.08
<i>M4/M12</i>	265/397	-	-	2	4.08
<i>M4/M15</i>	265/457	-	-	2	4.08
<i>M5/M5</i>	277/277	4	4.00	-	-
<i>M5/M8</i>	277/325	4	4.00	-	-
<i>M5/M11</i>	277/385	-	-	1	2.04
<i>M5/M12</i>	277/397	-	-	1	2.04
<i>M5/M13</i>	277/409	1	1.00	-	-
<i>M6/M6</i>	301/301	3	3.00	-	-
<i>M6/M9</i>	301/337	1	1.00	-	-
<i>M8/M8</i>	325/325	4	4.00	-	-
<i>M8/M10</i>	325/373	-	-	1	2.04
<i>M8/M12</i>	325/397	1	1.00	2	4.08

TABLE 1 (Cont.)

Genotypes	Allele sizes (bp)	Blue-egg Caipira		Paraíso Pedrês	
		N	%	N	%
<i>M8/M13</i>	325/409	1	1.00	-	-
<i>M8/M15</i>	325/457	-	-	1	2.04
<i>M9/M9</i>	337/337	1	1.00	-	-
<i>M9/M13</i>	337/409	1	1.00	-	-
<i>M9/M14</i>	337/421	1	1.00	-	-
<i>M10/M12</i>	373/397	-	-	1	2.04
<i>M10/M13</i>	373/409	-	-	1	2.04
<i>M10/M15</i>	373/457	-	-	1	2.04
<i>M11/M12</i>	385/397	-	-	1	2.04
<i>M11/M15</i>	385/457	-	-	1	2.04
<i>M12/M12</i>	397/397	-	-	2	4.08
<i>M12/M13</i>	397/409	-	-	2	4.08
<i>M12/M15</i>	397/457	-	-	1	2.04
<i>M13/M15</i>	409/457	-	-	1	2.04
<i>M15/M15</i>	457/457	-	-	1	2.04

TABLE 2. LEI0258 allele frequencies in two samples of Brazilian chickens

Allele	Size (bp)	Blue-egg Caipira %	Paraíso Pedrês %
<i>M1</i>	205	8.0	14.3
<i>M2</i>	217	42.0	10.2
<i>M3</i>	229	2.0	3.1
<i>M4</i>	265	15.0	16.3
<i>M5</i>	277	8.0	7.1
<i>M6</i>	301	3.5	2.0
<i>M7</i>	313	0.5	-
<i>M8</i>	325	16.0	4.1
<i>M9</i>	337	2.5	-
<i>M10</i>	373	-	8.2
<i>M11</i>	385	-	5.1
<i>M12</i>	397	0.5	15.3
<i>M13</i>	409	1.5	4.1
<i>M14</i>	421	0.5	-
<i>M15</i>	457	-	10.2

TABLE 3. Association between the LEI0258 alleles and *B-F* haplotypes in Blue-egg Caipira chickens

LEI0258 allele	<i>B-F</i> haplotype ¹	Frequency	
		N	%
<i>M1</i>	<i>B-F*CC1</i>	14	7.0
	<i>B-F*CC2</i>	2	1.0
<i>M2</i>	<i>B-F*CC3</i>	21	10.5
	<i>B-F*CC4</i>	43	21.5
	<i>B-F*CC18</i>	19	9.5
<i>M3</i>	<i>B-F*CC5</i>	4	2.0
<i>M4</i>	<i>B-F*CC6</i>	2	1.0
	<i>B-F*CC7</i>	17	8.5
	<i>B-F*CC8</i>	11	5.5
<i>M5</i>	<i>B-F*CC9</i>	4	2.0
	<i>B-F*CC19</i>	12	6.0
<i>M6</i>	<i>B-F*CC10</i>	6	3.0
	<i>B-F*CC11</i>	1	0.5
<i>M7</i>	<i>B-F*CC12</i>	1	0.5
<i>M8</i>	<i>B-F*CC13</i>	20	10.0
	<i>B-F*CC20</i>	13	6.5
<i>M9</i>	<i>B-F*CC12</i>	3	1.5
	<i>B-F*CC14</i>	2	1.0
<i>M12</i>	<i>B-F*CC15</i>	1	0.5
<i>M13</i>	<i>B-F*CC16</i>	3	1.5
<i>M14</i>	<i>B-F*CC17</i>	1	0.5

¹*B-F*CC18*, *B-F*CC19*, and *B-F*CC20* had not been described by Lima-Rosa *et al.* (unpublished), but were identified with essentially the same methods described by these authors.

CAPÍTULO V
DISCUSSÃO

O Brasil tem apresentando uma posição de destaque no setor avícola mundial. Sua avicultura comercial já é líder em receita (US\$ 1,8 bilhão) no *ranking* de países exportadores de frangos, sendo a segunda em volume de exportação. No ano passado, segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), foram exportadas 1,9 milhão de toneladas de carnes de aves *in natura*, além de 37,7 mil toneladas de produtos processados, e espera-se um volume ainda maior para 2004. A produção total de carne de frango chegou a 7,8 milhões de toneladas, sendo 5,9 milhões de toneladas absorvidas pelo mercado interno. Igualmente, a produção de ovos nacionais tem apresentado resultados satisfatórios de crescimento nos últimos anos, alcançando em 2003 a marca de 15,750 bilhões de unidades, e espera-se também um crescimento ainda maior, tanto na produção quanto nas exportações de ovos para 2004 (APA).

Esta posição de destaque é resultado de uma atividade com alto grau de desenvolvimento tecnológico. Os contínuos avanços em genética, sanidade, nutrição, manejo e ambiência obtidos, tanto em níveis nacional quanto mundial, têm sido aplicados no nosso setor avícola, permitindo, assim, termos essa avicultura de ponta, motivo de orgulho do agronegócio brasileiro.

Se focarmos nossa atenção para os avanços genéticos, notamos que eles são gerados a partir de um aumento constante do conhecimento na área (genética quantitativa aliada a técnicas computacionais e estatísticas) que tem sido utilizado nos programas de melhoramento genético, os quais selecionam animais com parâmetros zootécnicos de produção sucessivamente melhores (Gruber, 1999; Schmidt e Ledur, 1999). Características importantes como, por exemplo, desenvolvimento precoce, níveis de conversão alimentar e produção de ovos têm sido o foco dos melhoristas avícolas. O processo de seleção é responsável por 80% das melhorias alcançadas nas linhagens de corte e postura (Schmidt e Ledur, 1999). Entretanto, em termos de seleção de aves visando o aumento da resistência a doenças, pouco ou nada tem sido feito. Pelo contrário, segundo Gruber (1999), o fato de não se conhecer perfeitamente os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a doenças pode ter contribuído indiretamente para a seleção de linhagens mais susceptíveis a elas. Há muito se sabe que, em termos populacionais, a diversidade genética é diretamente proporcional à capacidade de resposta efetiva a um determinado patógeno. Ou seja, quanto maior for o polimorfismo genético de uma população para um determinado gene envolvido na resposta imunológica a um agente infeccioso, maior será a chance de alguns indivíduos

da população sobreviverem a ele. Paradoxalmente, os processos seletivos que visam parâmetros produtivos como os referidos acima, geralmente, tornam as linhagens muito uniformes, diminuindo, assim, a variabilidade genética populacional.

Recentemente, a avicultura nacional voltou-se para o resgate desta diversidade e uma série de linhagens mais rústicas, as chamadas linhagens caipiras, têm sido desenvolvidas por diversas empresas privadas ou órgãos públicos. O objetivo é produzir aves mais resistentes que possam ser criadas em sistemas extensivos ou de semi-confinamento. Algumas destas linhagens surgiram do melhoramento genético de galinhas caipiras originais, criadas em liberdade e sem qualquer tipo de seleção. Este é o caso da galinha dos ovos azuis, linhagem lançada no final do ano passado pela empresa gaúcha Sulave, que buscou na cor dos ovos dar a garantia da origem caipira das mesmas. Também se incluem nesta categoria a Paraíso Pedrês (linhagem de corte utilizada neste trabalho) e a Rubro Negra, linhagem de postura igualmente desenvolvida pelos proprietários da fazenda Aves do Paraíso da mesma maneira que a Paraíso Pedrês (seleção de características de raças puras dentro de plantéis de galinhas caipiras).

Outras linhagens foram desenvolvidas a partir da mistura de aves caipiras com linhagens ou raças comerciais. Uma delas é a Caipira Melhorada, linhagem mista obtida pelos pesquisadores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFL/MG) a partir do cruzamento direto de galinhas caipiras mineiras com três raças industriais boas de carne e ovos: a Plymouth Rock, a New Hampshire e a Rhode Island Red (Anônimo, 1997).

Ainda existem outras que, embora sejam chamadas de linhagens caipiras, são, na verdade, o produto de uma rigorosa seleção de características de rusticidade dentro de raças comerciais. Nesta categoria pode-se incluir a Frango Colonial 041 e a Poedeira Colonial 051 desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Suínos e Aves (Concórdia, SC). A Embrapa 041 resulta do cruzamento entre raças pesadas de corte e raças semi-pesadas de postura. As matrizes são a Plymouth Rock White (fêmea, cor branca) e a Rhode Island Red (macho, cor vermelha). A Embrapa 051, por outro lado, é o resultado do cruzamento de outras linhagens Rhode Island Red e Plymouth Rock White. Ainda pode-se incluir adicionalmente as caipiras francesas chamadas Label Rouge. Estas foram desenvolvidas pelos pesquisadores do Instituto de Seleção Avícola da França (ISA) e são consideradas, por muitos especialistas, linhagens genéticas específicas (não, propriamente, galinhas caipiras). Elas estão no Brasil há apenas 10 anos, mas o “selo

vermelho” existe desde 1965, e consiste de um certificado de conformidade de criação caipira (Gessulli, 1999; Anônimo, 2003). As linhagens Label Rouge mais difundidas no Brasil são a Caipira Pescoço Pelado Label Rouge e a Caipira Pesadão Label Rouge, para corte, e a Caipira Rouge, para postura (Gessulli, 1999). Estes são apenas alguns exemplos de linhagens caipiras desenvolvidas ou criadas no Brasil e demonstram o interesse que este tipo de ave tem despertado por aqui.

Todavia, este resgate tem se baseado apenas em características fenotípicas de rusticidade, não se levando em consideração as bases da genética molecular das mesmas, em especial, da resistência a doenças. Isto é explicado pelo fato de que se conhece apenas parcialmente os mecanismos moleculares desta resistência (Gruber, 1999). Muito poucos são os genes mapeados para resistência e, na maioria dos casos, ela baseia-se em alelos específicos dos genes do MHC.

As novas tecnologias moleculares que têm sido desenvolvidas, a maioria das quais já está sendo aplicada na avicultura, podem e vão ajudar a aumentar o conhecimento sobre esta resistência. Dentre estas tecnologias pode-se destacar a PCR; o seqüenciamento genômico; as técnicas de clonagem e inserção de genes (transgênicos); e o uso de marcadores moleculares, como RFLPs, mini e microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). A maioria destas técnicas tem sido aplicada no mapeamento do genoma das galinhas, o que nos permitirá, no futuro, determinar a completa relação gene/característica. A PCR é utilizada para amplificar o DNA ou o cDNA e quase todas as técnicas aqui mencionadas podem ou fazem uso dela.

O seqüenciamento genômico nos proporciona conhecer a composição nucleotídica de um gene ou segmento gênico. Através desta técnica, 26 seqüências nucleotídicas B-F diferentes foram detectadas em uma amostra de galinhas caipiras brasileiras. Neste grupo, formado por 100 aves eclodidas de ovos azuis, dez seqüências foram similares as já descritas para aves comerciais e 16 foram inéditas. Vinte e três destas seqüências estão descritas no primeiro artigo da seção de Resultados (Capítulo III), enquanto outras três (B-F*CC18, B-F*CC19 e B-F*CC20) foram determinadas após a remessa deste artigo para publicação e incluídas no segundo artigo (Capítulo IV), estando descritas no Apêndice. Estas 26 seqüências correspondem à região compreendida entre os exons 2 e 4 do DNA dos dois genes B-F (B-FI e B-FIV).

Devido à metodologia utilizada para detectá-las, não foi possível determinar qual seqüência pertence a qual gene. Algumas considerações devem ser feitas a este respeito.

Em primeiro lugar deve-se considerar que apenas com a análise do fragmento seqüenciado é impossível estabelecer-se a relação seqüência/gene para estes lócus (Li *et al.*, 1999). Kaufman *et al.* (1999) postulam, no entanto, que a seqüência da região promotora destes genes pode definir esta relação. De acordo com eles, quando esta está “intacta” em relação à do alelo do gene B-FIV do haplótipo B12 (B-F12; Kroemer *et al.*, 1990), que apresenta significativa homologia com a mesma região dos genes desta classe em mamíferos, ela pertenceria a esse gene; enquanto que se ela apresenta algum tipo de alteração (mutação ou deleção) em relação à mesma, pertenceria ao gene B-FI.

Em segundo lugar, estas alterações na região promotora também seriam a explicação para a diferença de expressão observada entre estes genes. O gene B-FIV (região promotora “intacta”) seria o de principal expressão e, portanto, poderia ser chamado *B-F major gene*, e o outro, de menor expressão, de *B-F minor gene* (Kaufman *et al.*, 1999). Logo, utilizando-se o cDNA como molde nas reações de amplificação poder-se-ia determinar a relação seqüência/gene, pois o gene com expressão principal teria muito mais cópias do que o outro, o que, teoricamente, seria notado através do número maior de clones seqüenciados do primeiro.

Entretanto, Dalgaard *et al.* (2003) obtiveram uma expressão aproximadamente igual dos dois transcritos diferentes detectados por eles para o haplótipo B21. Já Li *et al.* (1999) observaram que as seqüências predominantemente expressas nos haplótipos B^{A5} e B^{A8} eram idênticas às seqüências de baixa expressão B-F4 *minor* e B-F6 *minor*, respectivamente, descritas por Kaufman (1995). Nenhum destes dois trabalhos analisou a região promotora destes genes, o que, em si, não invalida as conclusões do grupo de Kaufman quanto à expressão diferencial. Tanto os dois genes B-F do haplótipo B21 no trabalho de Dalgaard *et al.* (2003), quanto os de principal expressão no de Li *et al.* (1999), podem ter regiões promotoras do tipo “intacto”, e por isto apresentam tais níveis de expressão. Porém, os resultados destes trabalhos deixam em aberto a questão de que apenas o gene B-FIV possuiria a região promotora “intacta” e de que, portanto, a análise desta região determinaria a relação seqüência/gene. Assim, por esta determinação ainda estar incerta e porque a inclusão de mais ou menos uns 1000 pares de bases (pb) aos fragmentos analisados (1048 pb) dificultaria o processo das clonagens, a região promotora destes genes não foi analisada no presente trabalho.

A opção para utilizar o DNA como molde relaciona-se ao fato de que o objetivo principal da pesquisa foi observar a variabilidade dos genes B-F e, se o cDNA fosse

utilizado, alelos com expressão muito baixa dificilmente seriam detectados, mascarando, assim, a variabilidade real destes loci na amostra analisada. Todavia, é válido, futuramente, analisar tanto o cDNA quanto a região promotora dos alelos detectados aqui e verificar como eles se apresentam, contribuindo talvez, com isto, um pouco mais para o esclarecimento desta questão.

A principal importância da detecção de “novos” alelos é o uso que pode-se fazer deles no futuro. Primeiramente, deve-se investigar se estes “novos” alelos conferem, ou não, resistência a algum dos patógenos aviários. Caso esta associação ocorra, eles poderão ser selecionados em programas de melhoramento genético para resistência a doenças. O aumento da imuno-competência pode aumentar a eficácia das vacinações e reduzir a necessidade do tratamento com antibióticos (comum na atividade avícola atual), o qual gera resíduos nos produtos avícolas (Lamont, 1998b).

Duas ressalvas devem ser feitas (Gruber, 1999): um alelo pode conferir resistência a um patógeno, mas susceptibilidade a outro; e programas de melhoramento da resistência podem levar a perda de outras características desejáveis. Em relação ao primeiro ponto, linhagens de resistência deverão ser desenvolvidas de maneira diferenciada. Em alguns locais existe a prevalência de determinadas doenças e em outros de outras. Linhagens que apresentam resistência, ou respondem melhor a vacinas de patógenos de prevalência regional poderão então ser utilizadas, diminuindo os custos de produção.

Já o segundo ponto pode ser resolvido com técnicas que manipulem diretamente o genoma, como através do uso de animais transgênicos. Esta técnica pode aumentar o número de cópias dos genes do MHC no genoma de linhagens com alto padrão de produtividade, sem a perda desta produtividade. Bloom *et al.* (1987) e Delaney *et al.* (1988) demonstraram, ao analisar animais di, tri e tetrassômicos para o microcromossomo 16, que a expressão dos produtos gênicos do MHC é dependente do número de cópias dos genes. Indivíduos com um maior número de genes expressaram um maior número de cópias diferentes. Assim, segundo Lamont (1989; 1998a), a introdução de novas cópias destes genes com diferentes alelos em um mesmo indivíduo possibilitaria a resposta imune efetiva deste a uma maior diversidade de patógenos. Neste contexto, a detecção dos “novos” alelos para os genes B-F, aqui realizada, abre a possibilidade de, futuramente, os mesmos serem testados quanto à sua possível associação com a resistência a doenças e, caso tal associação ocorra, poder-se-á formar um banco de dados de alelos de resistência que seriam usados em programas de melhoramento genético, moleculares ou não.

Estas diferenças na resposta a patógenos são, em parte, o resultado de alterações na estrutura funcional das moléculas do Complexo B. Para tentar-se detectar estas alterações, foi feita a predição da seqüência de aminoácidos que as moléculas de classe I- α poderiam gerar, pois, como se sabe, mutações nucleotídicas nem sempre correspondem a mudanças de aminoácidos na composição das proteínas. O que importa neste caso são as mutações que trocam aminoácidos pois, só assim, poder-se-ia ter alterações na resposta a patógenos. Foram analisadas 45 seqüências nucleotídicas (alelos) diferentes (descritas na Figura 2 do primeiro artigo da seção dos Resultados ou Capítulo III) e geradas 39 seqüências de aminoácidos dos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Das 13 seqüências ainda inéditas utilizadas nesta predição, dez condicionam diferenças na composição de aminoácidos. As outras três (CC*8, CC*12 e CC*15-2) tiveram os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ idênticos aos de seqüências da literatura.

Os marcadores moleculares são importantes quando se desconhecem os genes responsáveis por uma característica, pois pode-se associá-la a um marcador, o qual poderá ser utilizado em programas de melhoramento genético que visem o seu aprimoramento (Coutinho, 1999). Tais marcadores também são importantes quando a tipagem dos genes de um traço requer técnicas de valor elevado, como é o caso dos genes de classe I- α , onde a técnica de seqüenciamento é a mais indicada devido ao grande número de genes desta classe presente nos genomas e ao alto grau de polimorfismo dos mesmos. Com este intuito, foi genotipado o microsatélite LEI0258 em duas populações caipiras (galinhas de ovos azuis e a linhagem Paraíso Pedrês) e os alelos encontrados relacionados com os haplótipos B-F na população de ovos azuis. Ao todo foram encontrados 15 alelos LEI0258 e o tamanho destes variou de 205 a 457 pb. Nove alelos estavam presentes nas duas populações e cada população apresentou três alelos específicos. Este alto grau de polimorfismo habilita este microsatélite a ser utilizado como um bom marcador molecular para estudos de variabilidade populacional, de paternidade e de coeficiente de endogamia, entre outros.

Na análise de associação, observou-se um desequilíbrio de ligação total entre os lócus estudados. Apesar desta associação já ser conhecida e já estar sendo utilizada para tipar os lócus do complexo B pelo grupo coordenado pelo Dr. Nathaniel Bumstead (<http://europa.eu.int/comm/research/agro/fair/en/uk1502.html>), nada ainda foi publicado a este respeito, o que torna a publicação dos dados aqui obtidos relevante para as

análises genótípicas dos haplótipos B-F. A associação dos alelos LEI0258 aos haplótipos B-F os capacita também a serem utilizados em programas de seleção assistida, já que é mais fácil, rápido e barato analisar uma população através da PCR do que pelo seqüenciamento.

Como já foi salientado anteriormente, nos casos em que não se têm alelos deste microssatélite exclusivos para cada um dos haplótipos B-F, pode-se utilizá-los associados à técnica de PCR alelo-específico (PCR-SSP), pois a verificação da ocorrência de um alelo LEI0258 específico restringiria a determinação para dois ou três haplótipos B-F apenas, o que, de qualquer modo, é mais acessível do que o seqüenciamento.

Os resultados deste trabalho visam contribuir um pouco mais para o conhecimento da variabilidade dos genes B-F em galinhas e dar ferramentas para a implantação de futuros programas de melhoramento genético na resistência a doenças destas aves. Muito ainda precisa ser feito para que tais programas sejam implementados, mas este, certamente, é o melhor caminho a ser seguido quando tem-se em mente uma proteção mais efetiva dos plantéis avícolas.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS (2000) Cellular and Molecular Immunology. 4th ed., W.B. Saunders, Philadelphia.
- Afanassieff M, Goto RM, Ha J, Sherman MA, Zhong L, Auffray C, Coudert F, Zoorob R and Miller MM (2001) At least one class I gene in restriction fragment pattern-Y (Rfp-Y), the second MHC gene cluster in the chicken, is transcribed, polymorphic, and shows divergent specialization in antigen binding region. *J Immunol* 66:3324-3333.
- Albino LFT, Vargas Jr JG and Silva JHV (2001) Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, MG.
- Anônimo (1997) Caipiras com pedigree. *Globo Rural* 139:51-58.
- Anônimo (2003) Label Rouge – A produtiva francesa vermelha. *Escala Rural Especial* 22:34-37.
- APA. Associação Paulista de Avicultores. Acessado em 31 de janeiro de 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.apa.com.br>.
- Bacon LD (1987) Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. *Poult Sci* 66:802-811.
- Bacon LD and Dietert RR (1991) Genetic control of cell-mediated immunity in chickens. *Poult Sci* 70:1187-1199.
- Bloom SE and Bacon L (1985) Linkage of the major histocompatibility (B) complex and the nucleolar organizer region in the chicken. *J Hered* 76:146-154.
- Bloom SE, Briles WE, Briles RW, Delany ME and Dietert RR (1987) Chromosomal localization of the major histocompatibility (B) complex (MHC) and its expression in chicken aneuploid for the major histocompatibility complex/ribosomal deoxyribonucleic acid microchromosome. *Poult Sci* 66:782-789.
- Briles WE and Briles RW (1982) Identification of haplotypes of the chicken major histocompatibility complex (B). *Immunogenet* 15:449-459.

- Briles WE, McGibbon WH and Irwin MR (1950) On multiple alleles affecting cellular antigens in chicken. *Genetics* 35:633-652.
- Briles WE, Stone HA and Cole RK (1977) Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science* 195:193-195.
- Briles WE, Goto RM, Auffray C and Miller MM (1993) A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenet* 37:408-414.
- Bumstead N (1998) Genetic resistance to avian viruses. *Rev Sci Techn* 17:249-255.
- Bumstead N, Huggins MB and Cook JK (1989) Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Brit Poult Sci* 30:39-48.
- Bumstead N, Reece RL and Cook JK (1993) Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infection with infectious bursal disease virus. *Poult Sci* 72:403-410.
- Burt DW, Bumstead N, Bitgood JJ, Ponce de Leon FA and Crittenden LB (1995) Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. *Trends Genet* 11:190-194.
- Cerri C (1992) Cocoricó de valor. *Globo Rural* 85:47-55.
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Chaussé A-M, Coudert F, Dambrine G, Guillemot F, Miller MM and Auffray C (1989) Molecular genotyping of four chicken B-complex haplotypes with B-L β , B-F, and B-G probes. *Immunogenet* 29:127-130.
- Chen Y and Lamont SJ (1992) Major histocompatibility complex class I restriction fragment length polymorphism analysis in highly inbred chicken lines and lines selected for major histocompatibility complex and immunoglobulin production. *Poult Sci* 71:999-1006.
- Cole RK (1968) Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Dis* 12:9-28.

- Cook JK, Otsuki K, Huggins MB and Bumstead N (1990) Investigations into resistance of chicken lines to infection with infectious bronchitis virus. *Adv Exp Med Biol* 276:491-196.
- Coutinho LL (1999) Uso de marcadores moleculares na avicultura. *Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola*, pp. 95-101.
- Crawford RD (1990) Origin and history of poultry species. In: Crawford RD (ed.). *Poultry Breeding and Genetics – Developments in Animal and Veterinary Science*, 22. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-41.
- Dalgaard TS, Højsgaard S, Skødt K and Juul-Madsen HR (2003) Differences in chicken major histocompatibility complex (MHC) class I α gene expression between Marek's disease-resistant and –susceptible MHC haplotypes. *Scand J Immunol* 57:135-143.
- Delaney M.E, Dietert RR and Bloom SE (1988) MHC-chromosome dosage effects: evidence for increased expression of Ia glycoprotein and alteration of B cell subpopulations in neonatal aneuploid chickens. *Immunogenet* 27:24-30.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Acessado em 31 de janeiro de 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.embrapa.br/noticia/index.htm>.
- Engel ST, Linn RA, Taylor J F and Davis SK (1996) Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *J Mammalogy* 77:504-518.
- Fadly AM and Bacon LD (1992) Response of B congenic chickens to infection with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 36:871-880.
- Fulton JE, Thacker EL, Bacon LD and Hunt HD (1995) Functional analysis of avian class I (BFIV) glycoproteins by epitope tagging and mutagenesis *in vitro*. *Eur J Immunol* 25:2069-2076.
- Gessulli OP (1999) *Avicultura Alternativa – “Caipira”*. OPG Editores, Porto Feliz, SP.

- Gomes PC and Albino LF (1998) Criação de Frango e Galinha Caipira. Filmes CPT. Cód.: 050. Série Avicultura. Viçosa, MG.
- Goto RM, Afanassieff M, Há J, Iglesias GM, Ewald SJ, Briles WE and Miller MM (2002) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poult Sci* 81:1832-1841.
- Gruber A (1999) Mecanismos moleculares de resistência a doenças em aves. Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola, pp. 119-132.
- Guillemot F, Billault A, Pourquié O, Béhar G, Chaussé A-M, Zoorob R, Kreibich G and Auffray C (1988) A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II β genes are closely linked to the class I genes and nucleolar organizer. *EMBO J* 7:2775-2785.
- Guillemot F, Kaufman JF, Skjoedt K and Auffray C (1989) The major histocompatibility complex in the chicken. *Trends Genet* 5:300-304.
- Gyles NR, Fallah-Moghaddam H, Patterson LT, Skeeles JK, Whitfill CE and Johnson LW (1986) Genetic aspects of antibody responses in chickens to different classes of antigens. *Poult Sci* 65:223-232.
- Hála K, Chaussé A-M, Bourlet Y, Lassila O, Hasler V and Auffray C (1988) Attempt to detect recombination between B-F and B-L genes within the chicken B complex by serological typing, in vitro MLR, and RFLP analyses. *Immunogenet* 28:433-438.
- Hanson MP, Van Zandy JN and Law GRJ (1967) Differences in susceptibility to Marek's disease in chickens carrying two different B locus blood alleles. *Poult Sci* 46:1268.
- Hunt HD and Fulton JE (1998) Analysis of polymorphisms in the major expressed class I locus (B-FIV) of the chicken. *Immunogenet* 47:456-467.
- Hunt HD, Pharr G and Bacon LD (1994) Molecular analysis reveals MHC class I intra-locus recombination in the chicken. *Immunogenet* 40:370-375.

- Ignjatovic J and Bagust TJ (1985) Variation in susceptibility to avian sarcoma viruses and expression of endogenous avian leukosis virus antigens in specific pathogen-free chicken lines. *J Gen Virol* 66:1723-1731.
- Juul-Madsen HR, Hedemand JE, Salomonsen J and Simonsen M (1993) Restriction fragment length polymorphism analysis of the chicken B-F and B-L genes and their association with serologically defined B haplotypes. *Anim Genet* 24:243-247.
- Kaufman J (1995) *Direct submission to the GenBank nucleotide database. Accession numbers: Z54314, Z54315, Z54317, Z54318, Z54320, Z54322, Z54324, Z54325, Z54330.*
- Kaufman J (2000) The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:1077-1084.
- Kaufman J and Salomonsen J (1997) The “Minimal Essential MHC” revisited: Both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas* 127:67-73.
- Kaufman J and Venugopal K (1998) The importance of MHC for Rous sarcoma virus and Marek’s disease virus – some Payne-ful considerations. *Avian Pathol* 27:S82-S87.
- Kaufman J and Wallny HJ (1996) Chicken MHC molecules, disease resistance and evolutionary origin of birds. In: Vainio O and Imhof BA (eds.). *Immunology and developmental biology of chicken*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 129-141.
- Kaufman J, Skdodt K and Salomonsen J (1991) The B-G multigene family of the chicken MHC. *Crit Ver Immunol* 11:113-143.
- Kaufman J, Andersen R, Avila D, Engberg J, Lambris J, Salomonsen J, Welinder K and Skjodt K (1992) Different features of the MHC class I heterodimer have evolved at different rates: chicken B-F and β_2 -microglobulin sequences reveal invariant surface residues. *J Immunol* 148:1532-1546.
- Kaufman J, Völk H and Wallny HJ (1995) A “minimal essential MHC” and an “unrecognized MHC”: two extremes in selection for polymorphism. *Immunol Rev* 143:63-88.

- Kaufman J, Jacob J, Shaw I, Walker B, Milne S, Beck S and Salomonsen J (1999) Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunol Rev* 167:101-17.
- Kroemer G, Zoorob R and Auffray C (1990) Structure and expression of a chicken MHC class I gene. *Immunogenet* 31:405-409.
- Lamont SJ (1989) The chicken major histocompatibility complex in disease resistance and poultry breeding. *J Dairy Sci* 72:1328-1333.
- Lamont SJ (1998a) The chicken major histocompatibility complex and disease. *Rev Sci Techn* 17:128-142.
- Lamont SJ (1998b) Impact of genetics on disease resistance. *Poult Sci* 77:1111-1118.
- Lamont SJ, Gerndt BM, Warner CM and Bacon LD (1990) Analysis of restriction fragment length polymorphisms of major histocompatibility complex of 15I₅-B-congenic chicken lines. *Poult Sci* 69:1195-1203.
- Li L, Johnson WL and Ewald SJ (1997) Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Anim Genet* 28:258-267.
- Li L, Johnson WL, Livant EJ and Ewald SJ (1999) The MHC of broiler chicken line: serology, B-G genotypes, and B-F/B-L β sequences. *Immunogenet* 49:215-224.
- Lin JA and Lee TS (1996) Genetic susceptibility to Marek's disease virus of local chickens in Taiwan. *Avian Dis* 40:576-581.
- Livant EJ and Ewald SJ (2002) *Direct submission to the GenBank nucleotide database. Accession numbers: AY072913, AY126668, AF342825, AF469127, AF483195.*
- Livant EJ, Zheng D, Johnson LW, Shi W and Ewald SJ (2001) Three new MHC haplotypes in broiler breeder chickens. *Anim Genet* 32:123-131.
- McConnell SKJ, Dawson DA, Wardle A and Burke T (1999) The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. *Anim Genet* 30:183-189.

- Miller MM, Goto R, Bernot A, Zoorob R, Auffray C, Bumstead N and Briles WE (1994) Two MHC class I and two MHC class II genes map to the chicken *RFP-Y* system outside the B complex. Proc Natl Acad Sci USA 91:4397-4401.
- Miller MM, Goto R, Taylor Jr RL, Zoorob R, Auffray C, Briles RW, Briles WE and Bloom SE (1996) Assignment of *Rfp-Y* to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. Proc Natl Acad Sci USA 93:3958-3962.
- Moreng RE and Avens JS (1990) Ciência e Produção de Aves. Livraria Roca, São Paulo, SP.
- Pharr GT, Bacon LD and Dodgson JB (1994) A class I cDNA from SPAFAS line-11 chickens. Euro J Immunol 21:59-66.
- Pharr GT, Dodgson JB, Hunt HD and Bacon LD (1998) Class II MHC cDNA 15I₅ B-congenic chickens. Immunogenet 47:350-354.
- Pink JRL, Droege W, Hala K, Miggiano VC and Ziegler A (1977) A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex. Immunogenet 5:203-216.
- Plachý J, Hála K, Hejnar J, Geryk J and Svoboda J (1994) Src-specific immunity in inbred chickens bearing v-src DNA- and RSV-induced tumors. Immunogenet 40:257-265.
- Ramos MA (1995) O caipira de sangue azul. Globo Rural 113:39-43.
- Riegert P, Andersen R, Bumstead N, Döhring C, Dominguez-Steglich M, Ennberg J, Salomonsen J, Schmidt M, Skjødtt K, Schwager J and Kaufman J (1996) The chicken β_2 -microglobulin gene is located on a non-MHC microchromosome : small, G + C rich gene with X and Y boxes in the promoter. Proc Natl Acad Sci USA 93:1243-8.
- Schmidt GS and Ledur MC (1999) Interação da genética quantitativa e molecular no processo de seleção de aves. Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola, pp. 133-144.

- Scroferneker ML and Pohlmann PR (1998) *Imunologia Básica e Aplicada*. Sagra Luzzato, Porto Alegre, RS.
- Simonsen M, Crone M, Koch C and Hála K (1982) The MHC haplotypes of chicken. *Immunogenet* 16:513-532.
- Smith J and Burt DW (1998) Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*). *Anim Genet* 29:290-294.
- Soller M and Beckman JS (1986) Restriction fragment length polymorphisms in poultry breeding. *Poult Sci* 65:1474-1488.
- Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC and Hildebrand CE (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807-815.
- Steinman L (1993) Connections between the immune system and the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7912-7914.
- Sulave. Acessado em 16 de janeiro de 2004. Online. Disponível na Internet http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm.
- Trowsdale J (1995) “Both man & bird & beast”: comparative organization of MHC genes. *Immunogenet* 41:1-17.
- UBA. União Brasileira de Avicultura. Acessado em 20 de janeiro de 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.rudah.com.br/uba>.
- Van den Berg TP, Gonze M and Meulemans G (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol* 20:133-143.
- Wardecka B, Olszewski R, Jaszczak K, Zieba G, Pierzchala M and Wicinska K (2002) Relationship between microsatellite marker alleles on chromosomes 1-5 originating from the Rhode Island Red and Green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F₂ mapping population. *J Appl Genet* 43:319-329.

- Weber JL and May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396.
- Yunis R, Heller ED, Hillel J and Cahaner A (2002) Microsatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* in young broilers. *Anim Genet* 33:407-414.
- Zheng D, O'Keefe G, Johnson JW and Ewald SJ (1999) A PCR method for typing B-L β II family (class II MHC) alleles in broiler chickens. *Anim Genet* 30:109-119.
- Zoorob R, Béhar G, Kroemer G and Auffray C (1990) Organization of functional chicken class II B gene. *Immunogenet* 31:179-187.
- Zoorob R, Bernot A, Renoir DM, Choukri F and Auffray C (1993) Chicken major histocompatibility complex class II B genes: analysis of interallelic and interlocus sequence variance. *Euro J Immunol* 23:1139-1145.

CAPÍTULO VII
APÊNDICE

Seqüências nucleotídicas dos exons 2, 3, e 4 (parcial) dos alelos *CC18, *CC19 e *CC20 dos genes B-F obtidos em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. O íntron 2 destas três seqüências é igual ao da seqüência 1 apresentada no 1º artigo da seção de Resultados (Capítulo III).

Exon 2		
	111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 777 777 777	
	123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678	
BF*CC20	GAG CTC CAT ACC CTG CGG TAC GTC CAT ACG GCG ATG ACG GAT CCC GGC CCC GGG CAG CCG TGG TAC GTG GAC GTG GGG	
BF*CC18 A.. TC.T.	
BF*CC19 A.. TT.T. ATT	
	111 111	
	788 888 888 889 999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555	
	901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456	
BF*CC20	TAC GTG GAC GGG GAA CTC TTC GTG CAC TAC AAC AGC ACC GCG CGG AGG TAC GTG CCC CGC ACC GAG TGG ATG GCG GCC	
BF*CC18 A.. G.. AC.	
BF*CC19 GTT	
	111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222	
	555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333	
	789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234	
BF*CC20	AAG GCG GAC CAG CAG TAC TGG GAT GGA CAG ACG CAG ATC GGA CAG CGC AAT GAG CGG AGT GTG AAA GTG AGC CTG GAC	
BF*CC18T.	
BF*CC19	..C A.. ..C A.. G.. ..C.. ..A.. .C. .AC C.C .G. .A.G.	
Exon 3		
	222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 223 333 333 333 333	
	333 334 444 444 444 555 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 990 000 000 000 111	
	567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012	
BF*CC20	ACA CTG CAG GAG CGA TAC AAC CAG ACC GGC GGG TCT CAC ACG GTG CAG TGG ATG TCC GGC TGT GAC ATC CTC GAG GAT	
BF*CC18AC.A.	
BF*CC19	.T. CG. ..CAA.	
	333 333	
	111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889	
	345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890	
BF*CC20	GGC ACC ATC CGG GGG TAT TAT CAG TCA GCC TAC GAT GGG AGA GAC TTC ATT GCC TTC GAC AAA GGC GCA AAG ACG TTC	
BF*CC18 C.. ... GAG C.TA. ATG	
BF*CC19 C.. ... GAG A.G .T. .T. ...	

333 333 333 444
 999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666
 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678
 BF*CC20 ACT GCG GCA GTT CCA GAG GCA GTT CCC ACC AAG AGG AAA TGG GAG GAA GGA GGT GTT GCT GAG AGG TGG AAG AGT TAC
 BF*CC18G.. C.. ... CAG ...
 BF*CC19G. TA. ... G.. CT. ... CAG ...

Exon 4

444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 455 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555
 677 777 777 778 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 334 444 444
 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456
 BF*CC20 CTG GAG GAA ACC TGC GTG GAG TGG CTG CGG AGA TAC GTG GAA TAC GGG AAG GCT GAG CTG GGC AGG AGA GAG CGG CCC
 BF*CC18T
 BF*CC19T

555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 556 666 666 666 666 666 666 666
 444 555 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 990 000 000 000 111 111 111 122 222
 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234
 BF*CC20 GAG GTG CGA GTG TGG GGG AAG GAG GCC GAC GGG ATC CTG ACC TTG TCC TGC CGC GCT CAC GGC TTC TAC CCG CGG CCC
 BF*CC18T
 BF*CC19T

666 777
 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 000
 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012
 BF*CC20 ATC GCT GTC AGC TGG CTG AAG GAC GGC GCG GTG CGG GAC CAG AAC GCC CAG TCG GGG GGC ATC GTG CCC AAC GGC GAC
 BF*CC18T.G. ... G..
 BF*CC19G. ... G..

777 777 777 777 777
 000 000 011 111 111
 345 678 901 234 567
 BF*CC20 GGC ACC TAC CAC ACC
 BF*CC18
 BF*CC19