

Larissa Cristina Fornitano

**PRIMEIRO MAPA GENÔMICO COMPARATIVO
ENTRE O CROMOSSOMO 16 DO BÚFALO DE RIO
(BBU16) E O CROMOSSOMO 15 BOVINO
(BTA15).**



São José do Rio Preto – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Larissa Cristina Fornitano

**PRIMEIRO MAPA GENÔMICO COMPARATIVO
ENTRE O CROMOSSOMO 16 DO BÚFALO DE RIO
(BBU16) E O CROMOSSOMO 15 BOVINO
(BTA15).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do IBILCE/UNESP para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral.
Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos.

São José do Rio Preto – SP

2009

Fornitano, Larissa Cristina.
Primeiro mapa genômico comparativo entre o cromossomo 16 do búfalo de rio (BBU16) e o cromossomo 15 bovino (BTA15) /Larissa Cristina Fornitano.
- São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.
42 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Elisabete Jorge Amaral
Co-orientador : Cláudia Regina Bonini Domingos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. *Bubalus bubalis*. 2. Genoma. 3. Búfalo de rio. 4. BBU16. 5. Mapeamento RH. I. Amaral, Maria Elisabete Jorge. II. Domingos, Cláudia Regina Bonini. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU -

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

Campus de São José do Rio Preto - UNESP

LARISSA CRISTINA FORNITANO

PRIMEIRO MAPA GENÔMICO COMPARATIVO ENTRE O CROMOSSOMO 16 DO BÚFALO DE RIO (BBU16) E O CROMOSSOMO 15 BOVINO (BTA15).

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral
Professora Assistente Doutora
UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Humberto Tonhati
Professor Adjunto
UNESP/FCAV – Jaboticabal

Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama
Professora Assistente Doutora
UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 06 de fevereiro de 2009

“À minha mãe Arlete e ao meu pai Valnei pela compreensão, paciência e carinho em cada momento da minha vida, principalmente durante a conclusão deste trabalho”.

Agradecimentos

Deixo expressos nesse momento meus sinceros agradecimentos àquelas pessoas, sem as quais o presente trabalho teria sido impossível.

Agradecer aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora Prof^a. Dr^a M. Elisabete J. Amaral, por aceitar que eu fosse sua orientada, pela sua competência e dignidade, por sempre fazer seu trabalho com a mais nobre dedicação e que, mesmo distante, deu todo apoio necessário.

Agradeço também à Prof^a Dr^a Cláudia R. Bonini-Domingos pela co-orientação, assumindo muitas responsabilidades e dando possibilidade de meu trabalho ser levado adiante.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite em compartilhar este momento e pela seriedade com que fazem seus trabalhos.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio, companhia e paciência em ensinar aquilo que me pareceu difícil, mas que com a ajuda deles tornou-se mais brando. Em especial, aos amigos Nedenia e Edson por compartilharem todos os momentos de alegria e dificuldades, sempre me apoiando, com paciência e dedicação. Essas pessoas fizeram meus dias de laboratório serem mais felizes!

Aos funcionários e membros do Programa de Pós Graduação em Genética, nos informando sobre prazos e tirando dúvidas, solucionando nossos problemas. A participação de todos eles é indispensável para a realização de um bom trabalho.

Ao meu namorado Daniel, pelo apoio, paciência nos momentos difíceis e por compartilhar de todas as alegrias sempre ao meu lado.

À minha família, por todo esforço, compreensão e que mesmo sem entender muito do meu trabalho, me apóiam, pois sabem que é um momento de realização na minha vida.

Aos meus colegas de profissão, aos meus alunos de todas as escolas e aos meus patrões, pelo incentivo e orgulho demonstrado.

A todos, muito obrigada. Que suas vidas sejam recompensadas com momentos de felicidades, afeto e sucesso.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



RESUMO

No presente trabalho, apresentamos o primeiro mapa RH do cromossomo 16 bubalino (BBU16), construído com a utilização do painel celular *BBURH*₅₀₀₀. Seqüências de *primers* para PCR de 30 genes derivados do cromossomo 15 bovino (BTA15) foram testados com DNA de búfalo para a construção do mapa RH BBU16. Dos marcadores testados, 11 geraram produtos de PCR específicos com o DNA de búfalo, mostrando-se adequados para o mapeamento utilizando o painel *BBURH*₅₀₀₀. A partir de análises estatísticas, 9 genes foram incluídos no primeiro mapa RH do cromossomo BBU16 contendo apenas um grupo de ligação. As freqüências de retenção (FR) dos marcadores variaram entre 16,6% (*SDHD*) e 32,2% (*PORIMIN*). Comparando-se o mapa RH obtido com a seqüência do BTA15, pode-se verificar que não houve discrepâncias quanto a ordem dos 9 genes em ambas espécies, evidenciando a conservação da ordem linear desses marcadores nas mesmas.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, genoma, búfalo de rio, BBU16, mapeamento RH



ABSTRACT

This paper describes a radiation hybrid (RH) map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 16, generated from a previously described river buffalo whole genome RH panel (*BBURH₅₀₀₀*). PCR Primer sequences were selected for 30 cattle derived genes mapped on bovine chromosome 15. From the total number of selected markers, 11 generated specific PCR products with buffalo DNA and were suitable for mapping using the *BBURH₅₀₀₀* panel. The statistical analysis included 9 genes on the BBU16 RH map, which were distributed in one linkage group. Retention frequencies (RF) ranged from 16,6% for *SDHD* and 32,2 % for *PORIMIN*. The marker order on the linkage group is entirely consistent with the current BTA15 sequence assembly (Btau_4.0), indicating a conservation in the order of the genes on both species.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	11
A) Aspectos gerais da bubalinocultura no Brasil	12
B) O genoma do búfalo e a importância do seu estudo	13
C) O cromossomo 16 bubalino (BBU16)	16
II. OBJETIVOS	18
III. MATERIAL E MÉTODOS	20
A) Seleção dos genes e seus respectivos <i>primers</i> para PCR	21
B) Experimentos de PCR para otimização da temperatura de anelamento dos pares de <i>primers</i> com DNA bubalino	21
C) Genotipagem das linhagens híbridas do painel BBURH ₅₀₀₀	22
D) Construção do mapa RH do cromossomo BBU16 e comparação com a sequência do cromossomo BTA15	23
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
A) Seleção dos genes e seus respectivos <i>primers</i> para PCR	25
B) Experimentos de PCR para otimização da temperatura de anelamento dos pares de <i>primers</i> com DNA bubalino	25
C) Genotipagem das linhagens híbridas do painel BBURH ₅₀₀₀	29
D) Construção do mapa RH do cromossomo BBU16 e comparação com a sequência do cromossomo BTA15	30
V. CONCLUSÃO	34
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO A - Artigo publicado com a primeira geração de mapas RH do genoma total do búfalo de rio (<i>Bubalus bubalis</i>)	42



INTRODUÇÃO

A) Aspectos gerais da bubalinocultura no Brasil

Os búfalos são animais da família Bovidae, classificados na sub-família Bovinae e mundialmente divididos em duas espécies: *Bubalus bubalis* (de origem asiática) e *Syncerus caffer* (de origem africana) (IANNUZZI et al., 1994).

A espécie *Bubalus bubalis*, a partir do continente asiático, se difundiu por todo o mundo com uma população que ultrapassa 170 milhões de animais, destacando-se a Índia com 98 milhões de animais (FAO, 2007). Introduzidos no Brasil no século XIX, em pequenos lotes originários da Ásia, Europa e Caribe os búfalos eram criados mais como uma espécie exótica do que por suas qualidades zootécnicas (BERNARDES, 2007). Hoje, conhecendo-se as vantagens da bubalinocultura, o Brasil apresenta o maior rebanho das Américas, com população em cerca de 1,2 milhões de animais, destacando-se a região Norte com 64% dos animais e a região Sudeste com apenas 9%, mas com grande importância na produção leiteira (SENO et. al., 2006). Assim, ocupando praticamente todos os estados, o búfalo de rio engloba 3 raças reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Mediterrâneo, Murrah e Jafarabadi (Figura 1).



Figura 1: As três raças de búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) criadas no Brasil. FONTE: Andrade, V. J. e Garcia, S. K. Padrões raciais e registro de bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.29, p.39-45, 2005.

O sucesso do búfalo decorre de suas características peculiares que fazem dele uma espécie vantajosa, principalmente quando comparada aos bovinos, despertando o interesse dos produtores como uma alternativa para a produção de carne, leite e força motriz (ANUALPEC, 2006; BERNARDES, 2007). Os bubalinos têm temperamento dócil, o que facilita sua criação e manejo, bem como a adaptação às mais variadas condições ambientais. Além disso, é um animal que pode ser

criado em menor tempo e em condições mais econômicas que o bovino. Dados da instituição de pesquisa CPATU-Embrapa mostram que o búfalo de rio apresenta grande produtividade em leite e carne com qualidades superiores aos produtos bovinos. O leite e a carne de búfala, apresenta composição química superior ao bovinos contribuindo para alta qualidade do consumo de leite pela população humana (MIZIARA et. al., 2007).

Diante dos pontos fortes, é inegável os interesses em estudos que possam fornecer dados que contribuam para o maior crescimento da bubalinocultura no Brasil e no mundo. Sua importância econômica traz a necessidade de conhecer melhor seu potencial genético (CASSIANO et. al., 2004). O conhecimento, identificação e localização no genoma de genes responsáveis por caracteres importantes, contribuem para a aplicação de estratégias mais efetivas para o melhoramento genético desses animais e em última instância, reflete num maior retorno econômico para o setor agropecuário (KUMAR et al., 2006).

Os estudos com genomas de espécies de interesse econômico como o búfalo de rio promove a implementação de ferramentas que elucidam dados relevantes sobre a espécie, podendo posteriormente auxiliar em estratégias de melhoramento animal.

B) O genoma do búfalo e a importância do seu estudo

O genoma do búfalo de rio apresenta um conjunto diplóide $2n=50$, possuindo os cinco primeiros pares de cromossomos autossômicos do tipo sub-metacêntrico, resultantes de fusões cêntricas entre dez pares de cromossomos acrocêntricos do genoma bovino, sendo: BBU1 = BTA1/BTA27; BBU2 = BTA2/BTA23; BBU3 = BTA8/BTA19; BBU4 = BTA5/BTA28 e BBU5 = BTA16/BTA19, além de outros 19 pares de autossomos do tipo acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais X e Y (IANNUZZI et al., 1994a).

O número diplóide de cromossomos ($2n$) da família Bovidae pode variar de 30 a 60 cromossomos, apresentando o número médio de braços cromossômicos variando entre 56 e 58 para a maioria dos bóvidos (CRIBIU et al., 2001). A constância no número de braços cromossômicos é um indicativo de fusões cêntricas, cuja estimativa do cariótipo do bóvido ancestral é de 58 cromossomos autossômicos acrocêntricos, característica que permanece em bovinos (*Bos taurus*)

e cabras (*Capra hircus*), além de outros bovídeos (GALLAGHER e WOMACK, 1992; OTHMAN, 2004). Vários estudos realizados confirmaram uma conservação do genoma entre estas espécies.

Segundo Evans e colaboradores em 1973, existe uma conservação de sintenia, ou seja, uma conservação de segmentos de DNA entre os bovinos, caprinos e ovinos. Outros estudos relatam a mesma conservação entre caprinos e bovinos (BUNCH e NADLER, 1980), entre bubalinos e bovinos (IANNUZZI, 1990; 1993a; 1993b; 1996; 2001; NAVANI et. al., 2002) e entre bovinos, bubalinos e ovelhas (OTHMAN, 2004).

A conservação do genoma do búfalo de rio com relação ao genoma bovino fornece informações que podem ser extrapoladas de uma espécie para outra, abrindo portas para o estudo do búfalo de rio.

Comparados aos bubalinos, os bovinos, apresentam conjunto diplóide $2n=60$, sendo 29 pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais X e Y (GALLAGHER e WOMACK, 1992; EL NAHAS et. al., 2001). Os avanços nos estudos do genoma bovino fornecem dados que podem ser aplicados aos estudos do genoma bubalino. Até 2006 apenas 302 marcadores tinham sido mapeados no genoma bubalino (EL NAHAS et al., 2001; IANNUZZI et al., 2003; DI MEO et al., 2005; 2006). Hoje, com as ferramentas disponíveis, o estudo do genoma bubalino apresenta-se em ascensão, principalmente quanto à construção de mapas genômicos que fornecem a ordem linear de marcadores em relação a outros no mesmo cromossomo. Essa ordem leva a localização de genes associados com características econômicas e/ou biológicas (REXROAD III, 1999; GOLDAMMER et. al. 2007).

A genômica comparativa é uma estratégia de análise do genoma que usa o conhecimento do genoma de uma espécie para gerar conhecimento do genoma de outra espécie, permitindo uma maior compreensão da diversidade fisiológica, fenotípica e metabólica, tanto em níveis moleculares quanto sistêmicos entre as espécies comparadas (LARKIN, et al., 2003).

A comparação de mapas gênicos entre espécies de mamíferos é uma ferramenta útil para identificar e estudar segmentos do genoma que se encontram conservados entre as espécies, baseando-se no conceito em que genes ligados no genoma de uma espécie, se mantêm ligados no genoma da outra espécie relacionada. Quanto mais conservada a ordem dos genes entre espécies diferentes,

mais conservada estaria aquela porção do genoma durante o processo evolutivo. Caso haja rearranjos cromossômicos durante o processo evolutivo, estes acarretariam em diferenças entre as espécies comparadas (NADEAU e SANKOFF, 1998).

Muitos esforços estão sendo direcionados para estudos genômicos do búfalo de rio. Trabalhos foram realizados para o mapeamento de genes e microssatélites em cromossomos específicos usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou células somáticas (EL NAHAS et al., 2001; IANNUZZI et al., 2003; DI MEO et al., 2005; 2006; 2008). Contudo, a criação do primeiro painel de células híbridas irradiadas para o mapeamento do genoma em larga escala (painel *BBURH₅₀₀₀*) (AMARAL et al., 2007), demonstrou ser uma poderosa ferramenta no estudo do genoma bubalino, evidenciando sua eficácia na construção dos primeiros mapas RH de cromossomos individuais, tais como: BBU1 (MIZIARA et al., 2007), BBU2p (RODRIGUES-FILHO et al., 2008), BBU3 e BBU10 (AMARAL et al., 2007), BBU6 (STAFUZZA et al., 2007), BBU7 (GOLDAMMER, et al, 2007), BBU20 (KOCHAN et al., 2008) e BBUX (IANELLA et al., 2008).

Neste painel, células somáticas (fibroblastos) de búfalo de rio ($2n=50$ cromossomos), foram submetidas a um total de 5000rads de irradiação gama para a fragmentação dos cromossomos e, posteriormente, fusionadas com células de roedor (*hamster*), resultando em um painel de 90 linhagens celulares híbridas (AMARAL et al., 2007).

A técnica de mapeamento de genomas utilizando o painel de células somáticas híbridas irradiadas (mapeamento *RH*) foi primeiramente descrito em 1975 por Goss e Harris, e redescoberto por Cox e colaboradores em 1990, inicialmente para o estudo do genoma humano. Com o uso desta tecnologia é possível determinar a ordem linear de um conjunto de qualquer tipo de marcador molecular nos seus respectivos cromossomos e, a partir disso, construir mapas comparativos entre diferentes espécies, uma vez que podem ser inseridos marcadores independentemente da variação alélica (MURPHY et al., 2000). A metodologia consiste em aplicar uma dose letal de radiação nas células do genoma de interesse (denominadas doadoras) com a função de quebrar, ao acaso, seus cromossomos em múltiplos fragmentos (COX et al., 1990). Estes fragmentos são posteriormente incorporados ao genoma de uma célula receptora mutante, geralmente de roedor, por meio de fusão celular. Cada clone celular gerado a partir desta fusão contém um

conjunto de fragmentos cromossômicos da célula doadora incorporado ao genoma da célula receptora, a qual atinge a estabilidade após sucessivas divisões celulares. Posteriormente, os clones híbridos serão testados quanto à presença ou ausência de marcadores de DNA do genoma de interesse. A distância relativa entre os diferentes marcadores pode ser determinada com a utilização de métodos estatísticos para a ordenação linear.

Esta técnica tem sido extensivamente usada no mapeamento das principais espécies de mamíferos tais como camundongo (McCARTHY et al., 1997), cachorro (PRIAT et al., 1998; VIGNAUX et al., 1999a,b), porco (HAWKEN et al., 1999; YERLE et al., 2002), gato (MURPHY et al., 1999 e 2000), cavalo (KIGUWA et al., 2000; CHOWDHARY et al., 2002), boi (WOMACK et al., 1997; REXROAD III et al., 2000) e búfalo (AMARAL et al., 2007)

Atualmente, um dos principais avanços nos estudos do genoma bubalino foi o mapeamento do genoma total usando o painel *BBURH₅₀₀₀*. O mapa do genoma completo contém 2.621 marcadores distribuídos nos 24 cromossomos autossômicos e no cromossomo X. Os mapas RH obtidos foram comparados com a mais recente versão da sequência do genoma bovino (Btau_4.0) disponível no banco de dados NCBI - *Map Viewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913), mostrando-se essencial para a localização de genes com características economicamente importantes e detecção de possíveis rearranjos entre os cromossomos de ambas as espécies (AMARAL et al., 2008).

C) O cromossomo 16 bubalino (BBU16)

No estudo do genoma bubalino, vários cromossomos merecem atenção especial por possuírem genes responsáveis por caracteres econômicos e regiões de QTL (*quantitative traits loci*) relacionados à qualidade e produção de carne e leite. Dentre eles, destacamos o cromossomo 16 bubalino (BBU16), o qual apresenta conservação de sintonia com o cromossomo 15 bovino (BTA15) (IANNUZZI et al., 2003; DI MEO et al., 2008). Tal atenção é destacada pelas regiões de QTL encontradas no BTA15 relacionadas à qualidade da carcaça, maciez da carne e porcentagem de proteína (AMARANTE et al., 2000; REXROAD III, et al., 2001; GAUTIER et al., 2002; POLINELI et al., 2006). Além disso, outros genes interessantes pela sua importância fisiológica estão presentes no BTA15, como o

gene *UCP3* relacionado com tenacidade muscular (STONE et. *al.*, 2003) e o *CD44* que atua mediando resposta inflamatória em mastite bovina (GONEN et. *al.*, 2008).

O BBU16 caracteriza-se por ser um cromossomo acrocêntrico, possuindo 7 genes (*MMP1*, *FDX1*, *APOA1*, *HBB*, *FSHB*, *PAX6* e *WT1*) e 3 marcadores do tipo microssatélite (*D15S16*, *D15S13* e *BM0848*) previamente alocados por técnicas citogenéticas (IANNUZZI et *al.*, 2003).

Tendo em vista que o genoma bovino encontra-se inteiramente sequenciado, suas informações ancoram os dados obtidos nos estudos de mapeamento do genoma do búfalo, permitindo avançar os estudos comparativos entre estas duas espécies de interesse econômico.



OBJETIVOS

A partir deste trabalho de mestrado, pretendeu-se:

1. Utilizar pares de *primers* para PCR de genes previamente mapeados no cromossomo 15 bovino para o mapeamento do cromossomo 16 do búfalo de rio.
2. Construir um mapa RH do cromossomo 16 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*), utilizando como ferramenta o painel de células somáticas híbridas irradiadas (*BBURH₅₀₀₀*).
3. Realizar a comparação entre o mapa RH do cromossomo 16 do búfalo de rio com a sequência do cromossomo 15 bovino para verificar o nível de conservação da ordem dos marcadores.



MATERIAL E MÉTODOS

A) Seleção dos genes e seus respectivos *primers* para PCR

Os marcadores que foram utilizados no mapeamento do cromossomo 16 de búfalo são todos genes codificantes de proteínas, previamente mapeados no cromossomo 15 bovino. Para a seleção dos marcadores utilizou-se informações de diversos mapas do cromossomo 15 bovino, disponíveis em bancos de dados públicos. Dentre os mapas consultados constam o mapa RH - ILTX disponível no banco de dados NCBI – *Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapviewer/>).

As sequências dos pares de *primers* dos genes estudados foram obtidas em literatura específica ou no banco de dados NCBI (NCBI–e-PCR), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>.

B) Experimentos de PCR para otimização da temperatura de anelamento dos pares de *primers* com DNA bubalino

Reações de PCR com gradiente de temperatura de anelamento foram realizadas visando à obtenção de um produto único de PCR com DNA bubalino, podendo este ser búfalo específico ou diferenciado do produto de PCR com DNA de roedor. Para essas reações, utilizou-se um termociclador do tipo PTC-200™ (*M.J.Research*), com bloco para 96 amostras distribuídas em 12 colunas e 8 linhas. Em cada coluna do termociclador foram programadas temperaturas de anelamento variando de 50°C a 65 °C, sendo respectivamente: 50°C; 50,4°C; 51,2°C; 52,5°C; 54,2°C; 56,4°C; 58,9°C; 61°C; 62,7°C; 63,9°C; 64,7°C e 65 °C.

Nos experimentos cada marcador foi testado com:

- DNA bovino, em temperaturas variando de 50°C a 65°C, para verificar a qualidade do *primer* uma vez que estes foram inicialmente desenhados para o mapeamento do genoma bovino (controle positivo).

- DNA de roedor, provenientes dos fibroblastos utilizados na formação do painel *BBURH₅₀₀₀*, em temperaturas variando de 50°C a 65°C, para verificar se as amplificações geradas poderiam interferir nas amplificações geradas com DNA bubalino.

- DNA bubalino, provenientes dos fibroblastos utilizados na formação do painel *BBURH₅₀₀₀*, em temperaturas variando de 50°C a 65°C, para verificar a

presença de amplificação e assim escolher a temperatura ideal de anelamento, levando em conta as amplificações geradas em roedor.

- Controle negativo, ou seja, reação de PCR sem a adição de DNA, a fim de evitar falsos resultados provenientes de contaminações.

Cada reação foi feita em volume total de 10 μl , utilizando 50ng de DNA, 0,2mM de *primer Forward*, 0,2 mM de *primer Reverse*, 100mM de dNTP, 10mM de Tris pH 9,5, 50mM KCl, 1,5mM de MgCl_2 e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (AmpliTaq Gold™, Promega e Easy). Os ciclos para a amplificação foram os seguintes: desnaturação inicial de 10 minutos (para AmpliTaq Gold™ ou Easy) ou 2 minutos (para Promega) a 94°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50-65°C durante 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e foto documentados com câmera digital DC290 KODAK™, analisados no sistema EDAS.

Os marcadores testados que apresentaram produto de PCR específicos para búfalo ou diferenciado do produto gerado com DNA de roedor, foram submetidos à genotipagem das linhagens celulares do painel *BBURH₅₀₀₀*.

C) Genotipagem das linhagens híbridas do painel *BBURH₅₀₀₀* com os marcadores selecionados

O painel *BBURH₅₀₀₀* contém 90 linhagens de células somáticas híbridas irradiadas, geradas a partir da fusão entre fibroblastos de búfalo e de hamster (AMARAL et al, 2007).

Os pares de *primers* que geraram um produto de PCR adequado ao mapeamento foram utilizados no processo de genotipagem das linhagens híbridas búfalo/roedor do painel *BBURH₅₀₀₀*. O padrão de amplificação dos marcadores foi analisado para determinar o padrão de presença e ausência dos produtos de PCR nas diferentes linhagens do painel. Cada marcador foi genotipado duas vezes com todas as linhagens híbridas. Nos casos de dúvida, as linhagens celulares foram genotipadas pela terceira vez.

A frequência de retenção (FR) para cada marcador foi calculada pela razão entre o número de linhagens celulares positivas para o produto de PCR do respectivo marcador pelo número total de linhagens do painel *BBURH₅₀₀₀*.

D) Construção do mapa RH do cromossomo BBU16 e comparação com a sequência do cromossomo BTA15

Os padrões de presença e ausência do produto de PCR dos marcadores nas diferentes linhagens híbridas do painel foram registrados em tabela do tipo *Excel*, a qual foi analisada estatisticamente pelos colaboradores da University of Alberta, Edmonton, Canadá, utilizando o pacote estatístico “CarthaGene” (SCHIEX e GASPIN, 1997). A representação gráfica do mapa RH do cromossomo BBU16 bem como da sequência do BTA15 (versão Btau_4.0), foi realizada com o auxílio do programa CMap (<http://gmod.org/cmap>).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Seleção dos genes e seus respectivos *primers* para PCR

Foram selecionados nos bancos de dados públicos 30 genes, e seus respectivos pares de *primers*, previamente mapeados no cromossomo BTA15. Dentre os genes selecionados, 6 já haviam sido previamente indicados como pertencentes ao cromossomo 16 bubalino a partir de análises citogenéticas: *APOA*, *FSHB*, *HBB*, *MMP1*, *PAX6* e *WT1* (DI MEO et al., 2008). O Quadro 1 traz informações sobre todos os genes selecionados, bem como seus respectivos pares de *primers* e a fonte de obtenção dos mesmos.

B) Experimentos de PCR para otimização da temperatura de anelamento dos pares de *primers* com DNA bubalino

Realizou-se experimentos de otimização da temperatura de anelamento dos pares de *primers* dos 30 marcadores selecionados. Destes, 11 geraram produtos de PCR adequados para as genotipagem das linhagens do painel RH bubalino, uma vez que apresentaram produtos de PCR específicos com DNA de búfalo: *APOA1*, *CD44*, *FSHB*, *HBB*, *MGC33371*, *MMP1*, *NUMA*, *PORIMIN*, *PTH*, *RRM1* e *SDHD*. Na Figura 2 encontram-se representados os géis de agarose com o produto de PCR desses marcadores. Deste conjunto de marcadores, quatro apresentavam dados citogenéticos disponíveis na literatura (*APOA1*, *FSHB*, *HBB* e *MMP1*) e serviram como “âncoras” para a orientação do mapa RH do BBU16. Os pares de *primers* que geraram produtos de PCR adequados, bem como suas temperaturas ótimas de anelamento, estão registrados no Quadro 2.

O restante dos marcadores testados (*DELGEF*, *EXT2*, *F2*, *GLYAT*, *JAB*, *KCNA4*, *LPXN*, *MGC13007*, *NCAM1*, *NUCB2*, *PAFAH1B2*, *PAX6*, *PVLR1*, *RCN1*, *SERPING1*, *SERPINH1*, *TCN1*, *UCP3* e *WT1*) foram excluídos dos experimentos de genotipagem das linhagens híbridas do painel *BBURH*₅₀₀₀ por gerarem produtos de PCR inespecíficos ou por não amplificarem produto com DNA de búfalo. A Figura 3 exemplifica a obtenção de produtos de PCR inespecífico para o gene *PAX6*, enquanto a Figura 4 mostra a ausência de produto de PCR com DNA bubalino para o gene *WT1*. Ambos os casos indicam que há diferenças nas seqüências desses genes entre bovino e búfalo, inviabilizando a utilização dos *primers* construídos a partir de seqüências de DNA bovino no mapeamento do genoma bubalino.

<u>SIMBOLO DO MARCADOR</u>	<u>SEQUÊNCIA DOS PRIMERS (5'-3')</u>	<u>REFERÊNCIA/nº de acesso UniSTS**</u>
APOA1*	F – GACCTTGGCTGTGCTCTTCT R – GTCTCTGCCACTATCCTTGATTGC	519264
CD44	F – GTGTAACACCTACTTCATGACC R – CAGTAGCACATTGCATCTG	278173
DELGEF	F – GATGCAGGAGAGCTGTATGTT R – TGGGGCAGAAGGAGGAAA	278277
EXT2	F – ATGCCGGACAGAGGAAGAGAAC R – AGCAGTCTTAGAGCCAGGGACA	278356
F2	F – CGCCTGAAGAAGTGGATACAGA R – TCATTACTGGATTGGCCTC	278360
FSHB*	F – CTTGGGATATAGACTTAGTGCCATG R – GCACAAGTCACAGTTTCTAAGGCTA	250855
GLYAT	F – GGGCGGAAGGAAGAATGAATC R – GGGTTGGAATGTGGAGGAAGCA	278480
HBB*	F – GATATAAAAAAGACCCAGTAG R – TACCTGAGTCATATGTAATATTCC	254058
JAB	F – CAGCCATTAAGGGCTGGGATTCC R – ATTTCTGGAGGAGGCTCACAGCAG	Kappes et al., 1997
KCNA4	F – CTGGAAGAGATGTTAAAAGTAAAC R – CACTGAATAAACAACCTGCTCAAAT	278590
LPXN	F – TCAGTGATGTCAGGAGTCGAAG R – GAATCACGGTGTCACTCTGAAG	278698
MGC13007	F – TCGAATGTCTTGGGAGAAGG R – TATCCAGCTCATCCACTTGC	278743
MGC33371	F – GTCATTTTGGCTCCAGTTA R – CAGGTTCACTGCAGAATG	278753
MMP1*	F – AGGTTATCCCAAAATGATAG R – TGCAGTTGAACCAGCTATTA	273431
NCAM1	F – AGTGACACAACAGCTTCTCCAG R – GTGAGTGCGTAACAAAGGAACC	278814
NUCB2	F – TGATTCTCCACCAGGTGCTGAT R – CCTACAACGTCAGCATGACCAA	278856
NUMA	F – ATCACTTCTCGGCCTGCTT R – ACCCAGAAGGAACCTGTGTGG	278859
PAFAH1B2	F – GCCTCCTCAGATCAGTTCTCTC R – GACCAGTTTAGATCCCTCCTCC	278882
PAX6*	F – AACTGGAACCTGACACACCAGG R – CCTATGCAACCCAGTCC	83989
PORIMIN	F – AAAGCAGTTCTCCATCTGT R – CCCTCTGTAATTGCAGTGT	278931
PTH	F – CTCATCTGTCTATTTCTAAGCCA R – TGACAGAGTGTGACAGTGACTA	250754
PVLR1	F – GGTTAGAACCAGGAGAATCTGC R – TCTTTCGACTCCTGCTGTGA	Everts-van der Wind et. al., 2004
RCN1	F – CTTTCTTCCAGTTTAGCCAGTG R – GAAATCCAATCCATTGCCTTGC	279011
RRM1	F – ATGACCTATTTAGACCACACCC R – GTTTTATCACCCATCTGGCAC	279042
SDHD	F – TGATTGTACACCTCCTTGCCCTC R – TCCATCCTAGCCAAACACAGAC	279068
SERPING1	F – CCGCTGTATCTGTACCAGAGAAGG R – TGGGACCAGCAGCACAAGTT	279086
SERPINH1	F – ATCTACAGGACCAGCTTCCC R – GAGAGACGACAAGTAGCCC	279087
TCN1	F – ACCTCTGTTCAAGGCATAAAG R – CAGCTGAGGAAGGTTTGA	279179
UCP3	F – TGATGCTGACTCAAGAGACAGA R – TTCCACCTTGTCAGTGCAA	279237
WT1*	F – GACTGTTTTTAAGTAACCTAAG R – GTAAATAATAAATTCCCTCC	Vaiman et al., 1995

* Genes ancorados por técnicas citogenéticas no BBU16.

** Web site do banco de dados UniSTS: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/>

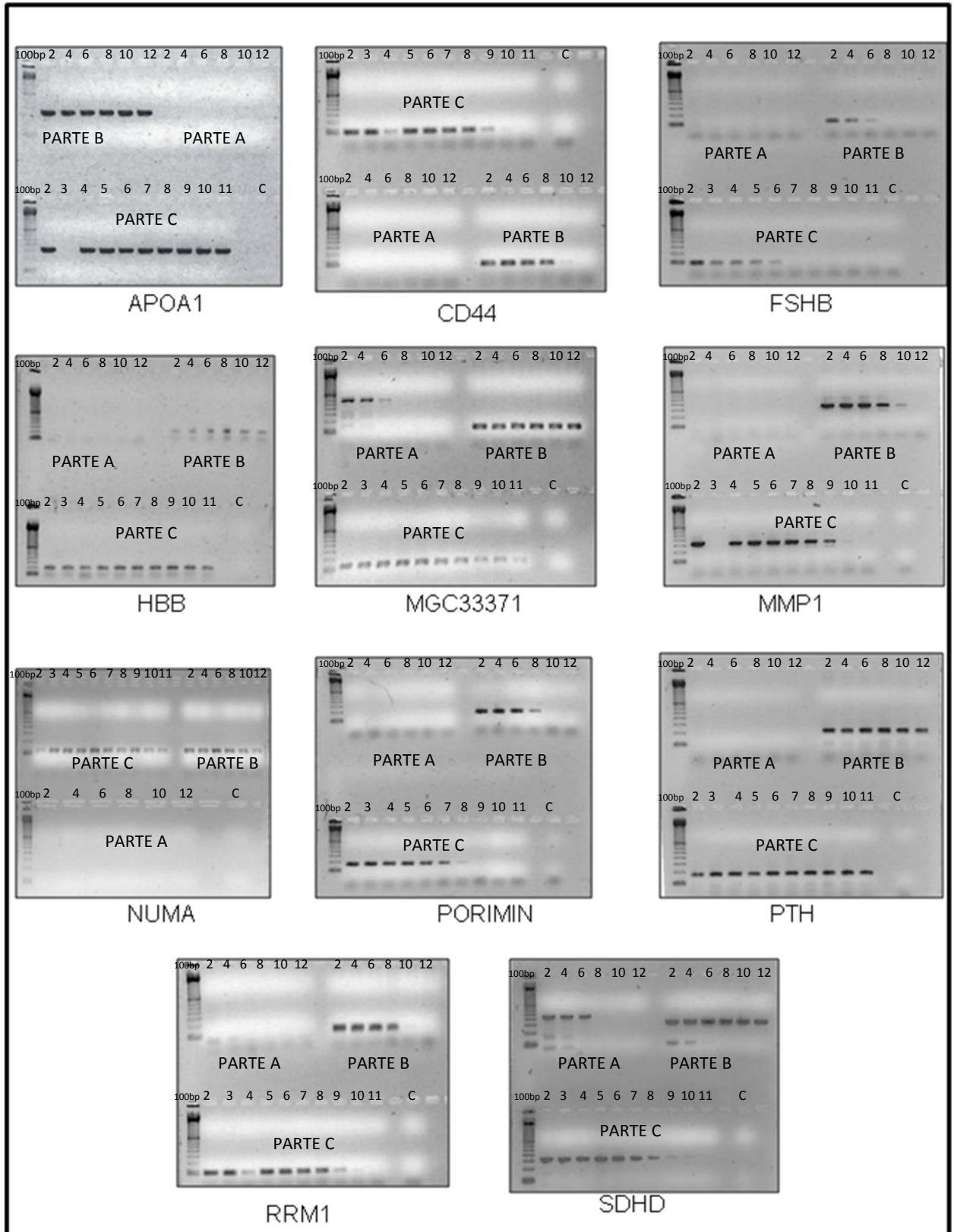


Figura 2: Géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo, mostrando os resultados das reações de PCR com gradientes de temperaturas de anelamento para os 11 genes que apresentaram produtos búfalo específico. **PARTE A (2-12)** – reação com DNA de roedor; **PARTE B (2-12)** – reação com DNA bovino, usado como controle positivo; **PARTE C (2-11)** – reação com DNA bubalino; **C** – controle negativo da reação de PCR (todos os componentes da reação exceto DNA). **100bp:** Marcador de peso molecular 100bp Temperaturas testadas no gradiente: **Colunas: 2** – 50,4°C; **3** – 51,2°C; **4** – 52,5°C; **5** – 54,2°C; **6** – 56,4°C; **7** – 58,9°C; **8** – 61°C; **9** – 62,7°C; **10** – 63,9°C; **11** – 64,7°C; **12** – 65°C.

Quadro 2: Conjunto dos genes que apresentaram produtos de PCR búfalo específico ou diferenciado do produto de roedor, bem como suas temperaturas ótimas de anelamento (°C).

<u>SÍMBOLO DO MARCADOR</u>	<u>TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)</u>
APOA1	65
CD44	50
FSHB	65
HBB	50
MGC33371	60
MMP1	50
NUMA	65
PORIMIN	50
PTH	65
RRM1	50
SDHD	60

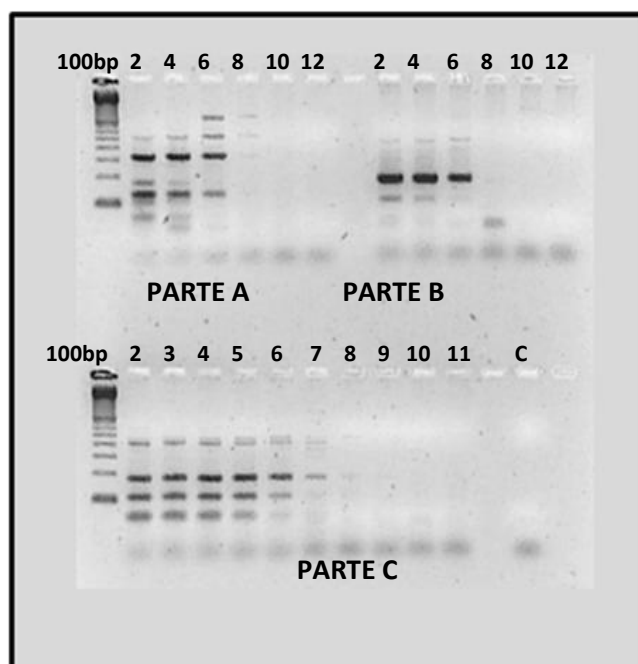


Figura 3: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, mostrando o resultado da reação de PCR com gradiente de temperatura de anelamento para o gene *PAX6*. **PARTE A (2-12)** – reação com DNA roedor; **PARTE B (2-12)** – reação com DNA bovino usado como controle positivo; **PARTE C (2-11)** – reação com DNA bubalino; **C** – controle negativo da reação de PCR (todos os componentes da reação exceto DNA). **100bp**: Marcador de peso molecular 100bp. Temperaturas testadas no gradiente: **Coluna 2** – 50,4°C; **3** – 51,2°C; **4** – 52,5°C; **5** – 54,2°C; **6** – 56,4°C; **7** – 58,9°C; **8** – 61°C; **9** – 62,7°C; **10** – 63,9°C; **11** – 64,7°C; **12** – 65°C. Não há um produto de PCR único de búfalo. Assim, esse marcador foi descartado da genotipagem utilizando o painel *BBURH*₅₀₀₀.

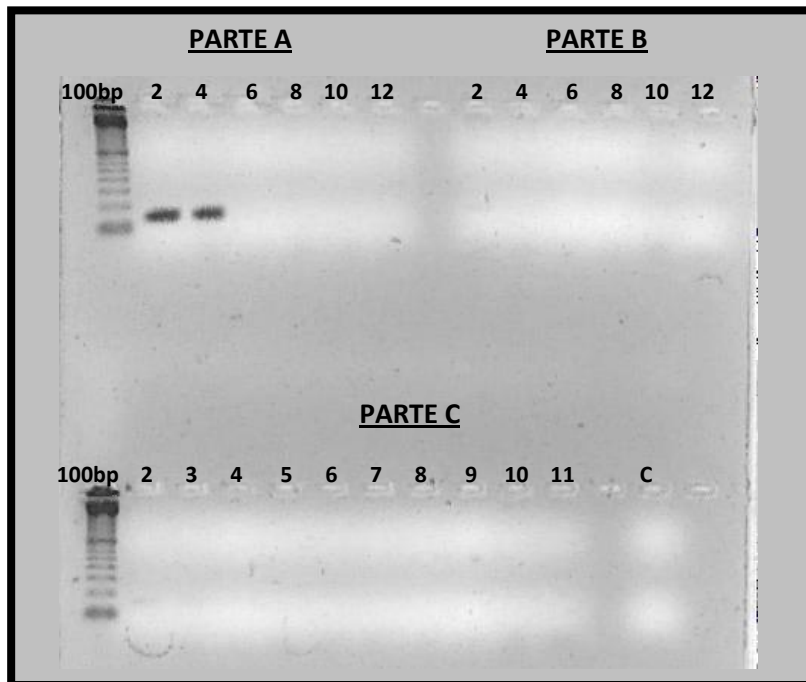


Figura 4: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, mostrando o resultado da reação de PCR com gradiente de temperatura de anelamento para o gene *WT1*. **PARTE A (2-12)** – reação com DNA bovino usado como controle positivo; **PARTE B (2-12)** – reação com DNA de roedor; **PARTE C (2-11)** – reação com DNA bubalino; **C** – controle negativo da reação de PCR (todos os componentes da reação exceto DNA). **100bp:** Marcador de peso molecular 100bp. Temperaturas testadas no gradiente: **Coluna 2** – 50,4°C; **3** – 51,2°C; **4** – 52,5°C; **5** – 54,2°C; **6** – 56,4°C; **7** – 58,9°C; **8** – 61°C; **9** – 62,7°C; **10** – 63,9°C; **11** – 64,7°C; **12** – 65°C. Note que, exceto nas colunas 2 e 4 da PARTE A, as demais amostras de DNA não tiveram amplificação com o uso deste par de *primers*.

C) Genotipagem das linhagens híbridas do painel *BBURH*₅₀₀₀ com os marcadores selecionados

Os 11 genes, cujas temperaturas de anelamento dos *primers* foram otimizadas com sucesso, foram utilizados no processo de genotipagem das linhagens celulares híbridas do painel *BBURH*₅₀₀₀ para determinar o padrão de presença e ausência dos produtos de PCR. As reações de PCR para o mapeamento seguem a mesma metodologia das reações de PCR com gradiente de temperatura de anelamento, mas agora, utilizando a temperatura de anelamento específica para cada par de *primers*.

A Figura 5 mostra o experimento de PCR desenvolvido com as linhagens híbridas do painel para o gene *MMP1*. É possível observar o padrão de presença e ausência do produto nas diferentes linhagens do painel. Assim como *MMP1*, os outros 10 marcadores foram mapeados com o painel *BBURH*₅₀₀₀ para a construção do mapa do cromossomo BBU16.

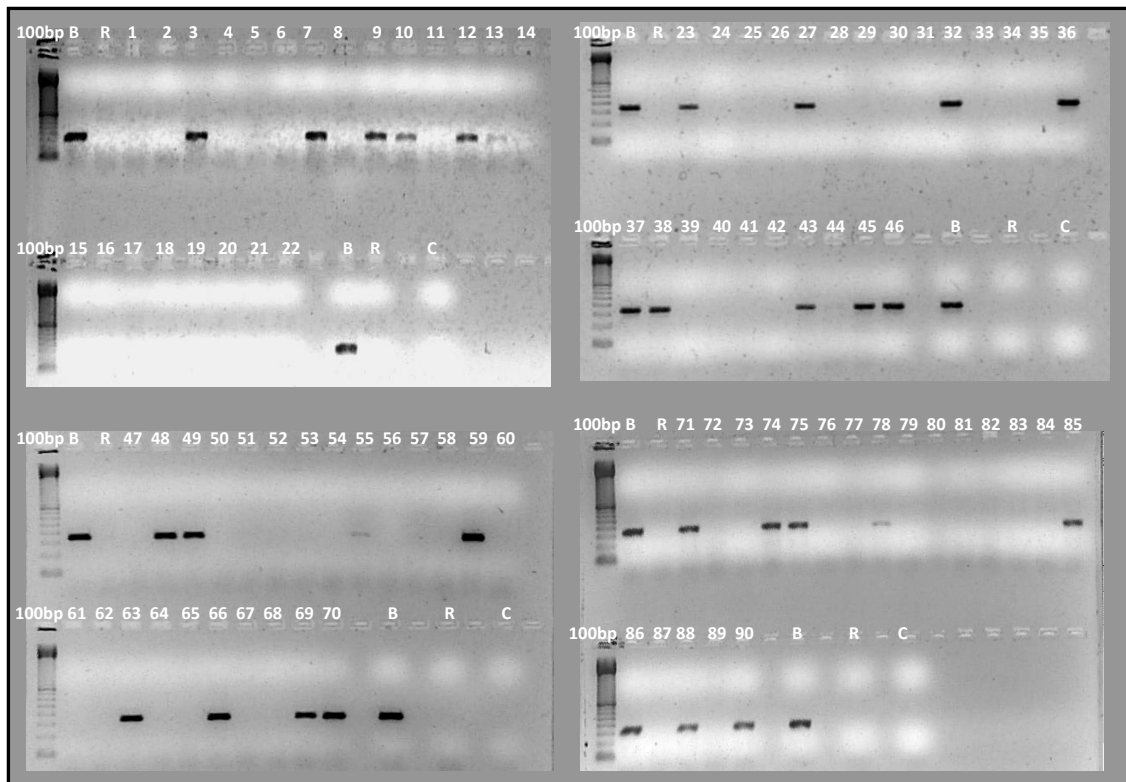


Figura 5. Géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo, mostrando os produtos de PCR das reações de PCR do gene *MMP1* com as linhagens híbridas do painel *BBURH₅₀₀₀*. **B** – reação com DNA bubalino usado como controle positivo; **R** – reação com DNA de roedor; **1-90** – produto de PCR com DNA das linhagens híbridas do painel *BBURH₅₀₀₀*, 100bp: marcador de peso molecular **C** – controle negativo da reação de PCR (todos os componentes da reação exceto DNA). Os pocinhos não numerados não contém reações.

D) Construção do mapa RH do cromossomo BBU16 e comparação com a sequência do cromossomo BTA15

Após os experimentos de PCR, os dados do padrão de presença e ausência do produto de PCR dos genes nas diferentes linhagens híbridas foram registrados em tabela do tipo *Excel* (Figura 6) e enviados para os colaboradores do projeto da *Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá*. A análise estatística foi realizada utilizando o programa “CarthaGene”. O mapa RH do BBU16 está representado na Figura 7, juntamente com a sequência do cromossomo BTA15.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	
1	Locus symbol	PCR Product Size	2	5	8	9	15	17	21	22	23	24	25	26	27	30	31	33	38	39	44	47	48	51	53	55	62	63	66	67	70	
2	APOA1-LGC	350bp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
3	CD44-LGC	100bp	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
4	FSHB-LGC	200bp	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
5	HBB-LGC	100bp	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
6	MGC33371-LGC	100bp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	
7	MMP1-LGC	350bp	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
8	NUMA-LGC	150bp	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
9	PORIMIN-LGC	180bp	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
10	PTH-LGC	200bp	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
11	RRM1-LGC	150bp	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
12	SDHD-LGC	350bp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	1	1	0	0	0	

Figura 6: Comparação do mapa RH do cromossomo 16 do genoma do búfalo de rio (à esquerda) com a sequência de cromossomo 15 bovino (à direita), construídos a partir do programa CMap. As distâncias entre os marcadores do mapa RH estão indicadas em cRay, enquanto que as distâncias das sequências do cromossomo 15 bovino estão representadas em Megabases (Mb). Marcadores destacados são aqueles mapeados neste trabalho. Os marcadores HBB e SDHD, apesar de mapeados, não se encontram representados para preservar a resolução da figura.

As análises estatísticas, permitiram a construção do mapa RH do BBU16 usando 9 dos 11 marcadores genotipados neste trabalho (*APOA1*, *FSHB*, *HBB*, *MMP1*, *NUMA*, *PORIMIN*, *PTH*, *RRM1* e *SDHD*), sendo que 4 deles (*APOA1*, *FSHB*, *HBB* e *MMP1*) são marcadores ancorados por FISH no cromossomo 16 bubalino, auxiliando na orientação do grupo de ligação obtido. Os marcadores *CD44* e *MGC33371* foram descartados do mapa, uma vez que não apresentaram ligação com nenhum dos demais marcadores do grupo.

Além dos 9 genes analisados neste trabalho, outros 79 marcadores foram incluídos no mapa apresentado por Amaral e colaboradores, 2008 (Anexo 1). Os marcadores foram distribuídos em um único grupo de ligação com LOD score ≥ 8 . O mapa RH obtido com todos os marcadores apresentou um tamanho aproximado de 1419,3 cRay, com densidade aproximada de um locus para cada 17,7cR₅₀₀₀. Apenas os marcadores feitos nesse trabalho são genes codificantes de proteínas, os demais

79 marcadores são SNP - *Single Nucleotide Polymorphic*. As posições dos 9 genes mapeados em cRay foram as seguintes: *MMP1* (0 cRay), *PORIMIN* (5,2 cRay), *SDHD* (236,1cRay), *APOA1* (356,4 cRay), *PTH* (632,2 cRay), *HBB* (859,4 cRay), *RRM1* (890,1 cRay), *NUMA* (901,4 cRay), *FSHB* (1224,4 cRay).

Foi possível extrapolar a extensão do mapa RH do BBU16 em pares de base comparando-o com o primeiro e o último marcador do grupo de ligação obtido com suas respectivas posições na sequência do BTA15. Dessa forma, o mapa RH do BBU16 apresentou aproximadamente 84Mb (AMARAL et al, 2008). A frequência de retenção (FR) para cada marcador analisado neste trabalho variou de 16,6% (*SDHD*) a 32,2% (*PORIMIN*).

A comparação realizada entre o mapa RH do BBU16 e a sequência do BTA15 evidenciou que a ordem linear dos genes mapeados neste trabalho apresenta-se conservada nos cromossomos de ambas as espécies indicando uma importância funcional dos mesmos. No mais, o mapa RH obtido, representa o primeiro passo para estudos de alta resolução deste cromossomo bubalino no futuro.

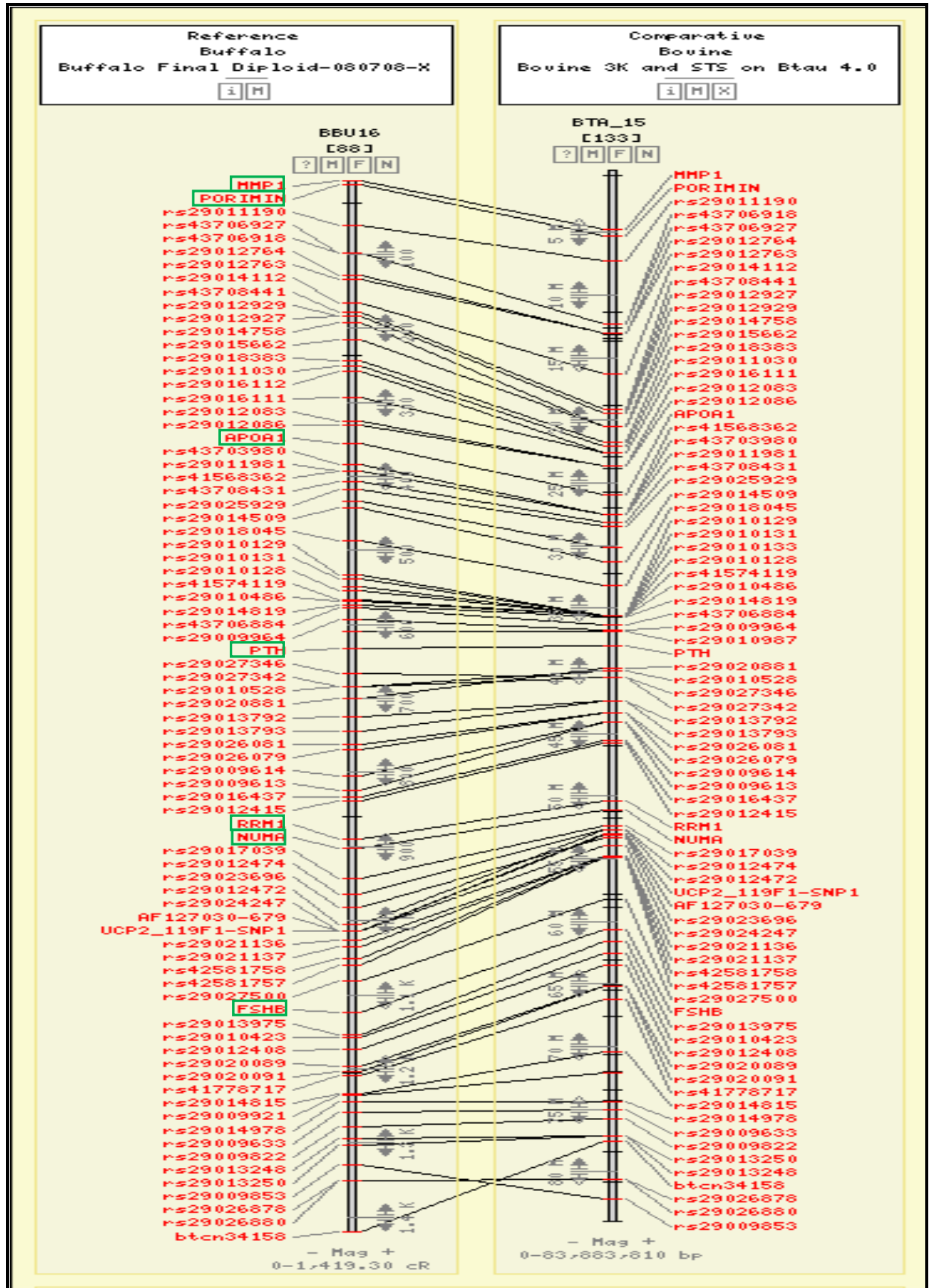


Figura 6: Comparação do mapa RH do cromossomo 16 do genoma do búfalo de rio (à esquerda) com a sequência do cromossomo 15 bovino (à direita), construídos a partir do programa CMap. As distâncias entre os marcadores do mapa RH estão indicadas em cRay, enquanto que as distâncias das sequências do cromossomo 15 bovino estão representadas em Mb (Megabases). Marcadores destacados pelo quadro verde são aqueles mapeados neste trabalho. Os marcadores *HBB* e *SDHD*, apesar de mapeados, não se encontram representados para preservar a resolução da figura.



CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir:

1. Dos 30 pares de *primers* derivados do cromossomo 15 bovino (BTA15), 11 produziram produtos de PCR específicos com DNA bubalino;
2. Pela primeira vez foram obtidos produtos de PCR para 11 genes do cromossomo 16 bubalino: *APOA1*, *CD44*, *FSHB*, *HBB*, *MGC33371*, *MMP1*, *NUMA*, *PORIMIN*, *PTH*, *RRM* e *SDHD*;
3. 19 genes foram excluídos do processo de mapeamento, uma vez que os *primers* geraram produtos de PCR inespecíficos ou não geraram produto de PCR com DNA bubalino;
4. Dos 11 genes analisados com o painel *BBURH₅₀₀₀*, 9 foram incluídos no primeiro mapa RH do BBU16;
5. Análises estatísticas com o programa “CarthaGene” distribuíram os 9 genes estudados em apenas 1 grupo de ligação;
6. As frequências de retenção (FR) dos marcadores variaram entre 16,6% (*SDHD*) e 32,2% (*PORIMIN*);
7. Comparando-se o mapa RH do BBU16 com a sequência do BTA15 pode-se verificar que não houve discrepâncias quanto a ordem dos 9 genes em ambas espécies.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/> Acesso em: 20 dezembro 2008.

AMARAL, M. J. E. et al. A first generation wholt genome RH map of the river buffalo with comparision to domestic cattle. **BMC Genomics**. 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-9-631.pdf>. Acesso em dezembro 2008.

AMARAL, M.E.J. et al. Construction of river búfalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v.38, p. 311-314, 2007.

AMARANTE, M. R. V. et al. RH maps of bovine chromosomes 15 and 29: conservation of human chromosomes 11 and 5. **Mammalian genome**, v. 11, p. 364-368, 2000.

ANUALPEC 2006. Disponível em: <<http://ifnp.org.br>>. Acesso em dezembro de 2006.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de reprodução animal**, v.31, p. 293-298, 2007.

BUNCH, T. D., NADLER, C. F. Giemsa-band patterns of the tahr and chromosomal evolution of the tribe caprini. **The Journal of Heredity**, v. 71, p. 110-116, 1980.

CASSIANO, L. A. P. et al., Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos da Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.5, p.451-457. 2004.

CHOWDHARY, B. P. et al. Construction of a 5000(rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 89-94, 2002.

COX, D. R. et al. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. **Science**, v. 250, p. 245-250. 1990.

CPATU-EMBRAPA. Amazônia Oriental: Rebanho bubalino. Disponível em: <http://www.cptau.embrapa.br/>. Acesso em: 03 janeiro 2009.

CRIBIU E.P., et al. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000). **Cytogenet. Cell Genet.** V.92, p. 283–299. 2001

DI MEO, G. P. et al. Comparative mapping of the fragile histidine triad (FHIT) gene in cattle, river buffalo, sheep and goat by FISH and assingment to BTA22 by RH-mapping: a comparision with HSA3. **Animal Genetics**, v. 36, p. 352-365. 2005.

DI MEO, G. P. et al. Mapping of 11 genes by FISH to BTA2, BBU2q, OAR2q and CHI2, and comparision with HSA2q. **Animal Genetics**. v. 37, p. 299-300. 2006.

¹Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR: 6023, referências bibliográficas, Rio de Janeiro, agosto 2002.

DI MEO, G. P. et al., An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n=50) cyrogenetic map: assignment of 68 autossomal loci by FISH – mapping and R – banding and comparison with human chromosomes. **Chromosome Research**, v. 16, p. 827-837. 2008.

EL NAHAS, S. M. et al. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **The Journal of Heredity**, v.92, n. 3, p. 221-225. 2001.

EVANS, H. J. et al. Chromosome homology and heterochromatin in goat, sheep, and ox studies by banding techniques. **Chromosoma**, v. 42, p. 383-402, 1973.

EVERTS-VAN DER WIND, A. E. et al. A high-resolution whole-genoma cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. **Proceedings of the National academy of Science**, v.102, p. 18526-18531, 2005.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals – livestock. Disponível em <http://www.fao.org>. Acesso em: dezembro 2007.

GALLAGHER, D. S. J.; WOMACK, J. E. Chromosome conservation in the Bovidae. **Journal of Heredity**, v.83, p. 287-297, 1992.

GAUTIER, M. et al. An extensive and comprehensive radiation hybrid map of bovine Chromosome 15: comparison with human Chromosome 11. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 316-319, 2002.

GOLDAMMER, T. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 119, p. 235-241. 2007.

GONEN, E. et al. CD44 is highly expressed on milk neutrophils in bovine mastitis and play a role in their adhesion to matrix and mammary epithelium. **Veterinary Research**, v.29, 2008.

GOSS, S. J.; HARRIS, H. New method for mapping genes in human chromosomes. **Nature**, v. 255, p. 680-684. 1975.

HAWKEN, R. J. et al. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. **Mammalian Genome**, v. 10, n. 8, p. 824-830, 1999.

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, v.39, p.196-200, 2008.

IANNUZZI, L. et al. A comparison of G and R-banding in cattle and river buffalo prometaphase chromosomes. **Caryologia**, v. 43, p. 283-290, 1990.

IANNUZZI, L. et al. Assignment of genes coding for leukocyte surface molecules to river buffalo chromosomes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 435-443, 1996.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of omega and trophoblast interferon genes in cattle and river buffalo by sequential R-banding and fluorescent *in situ* hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 62, p. 224-227, 1993b.

IANNUZZI, L. et al. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex in cattle and river buffalo by fluorescent *in situ* hybridization. **Hereditas**, v. 118, p. 187-190, 1993a.

IANNUZZI, L. et al. FISH-mapping of 31 type I loci (Texas markers) to river buffalo chromosomes. **Chromosome Research**, v. 9, p. 339-342, 2001.

IANNUZZI, L. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, $2n = 50$) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 102, p. 65-75. 2003.

IANNUZZI, L. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., $2n=50$). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 67, p. 102-113, 1994.

KAPPES, S. M. et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v. 7, p. 235-249. 1997.

KIGUWA, S. L. et al. A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 9, p. 803-805, 2002.

KOCHAN, K. J. et al., Application of Dissociation Curve Analysis to Radiation Hybrid Panel Marker Scoring: Generation of a Map of River Buffalo (*B. bubalis*) Chromosome 20. **BMC Genomics**, v. 9, p. 544. 2008.

KUMAR, S. et al. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 593-600, 2006.

LARKIN, D. M. et al. A cattle-human comparative map built with cattle BAC- and human genomes sequence. **Genome research**, v.13, p.1966-1972. 2003.

McCARTHY, L. C. et al. A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. **Genome Research**, v. 7, n. 12, p. 1153-1161, 1997.

MIZIARA, M. N. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome one (BBU1). **Cytogenet Genome Res**, v. 119, p.100-104, 2007.

MURPHY, W. J. et al. A Radiation Hybrid Map of the Cat Genome: Implications for Comparative Mapping. **Genome Research**, v. 10, p. 691-702, 2000.

MURPHY, W. J. et al. Development of a feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci. **Genomics**, v. 53, p. 1-8, 1999.

NADEAU, J.H. e SANKOFF, D. Counting a comparative maps. **Trends in genetics**, v.14, p. 495-501. 1998.

NAVANI, N. et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 33, p. 149-154, 2002.

NCBI – *Bos taurus* build 4.0 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913. Acesso em 10 dezembro 2008.

NCBI MAP VIEWER. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>. Acesso em: 10 dezembro 2008.

NCBI–e-PCR – Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>. Acesso em 03 de janeiro 2009.

OTHMAN, O. E> Chromosome and Gene Mapping Homology between River Buffalo, Cattle and Sheep using molecular markers. **Biotechnology**, v.3 (2), p. 119-125, 2004.

POLINENI, P. et al., The bovine QTL viewer: a web accessible database of bovine Quantitative Traits Loci. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 283. 2006.

PRIAT, C. et al. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 361-78, 1998.

REXROAD III, C. E. Radiation hybrid map of bovine chromosome one. **Animal Genetics**, v.30, p. 325-332. 1999.

REXROAD III, C. E. et al. A 12.000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1. **Animal Genetics**, v. 31, p. 262-265, 2000.

REXROAD III, C. E. et al. Comparative mapping of BTA 15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 561-565, 2001.

RODRIGUES-FILHO, E. A. et al. Mapping MHC genes in river buffalo. **Developments in Biologicals**, v. 132, p.343-346. 2008.

SCHIEX. T., GASPIN. C. Carthagene: constructing and joining maximum likelihood genetic maps. In: ISMB'97. 1997.

SENO, L. O. et al., Responses to selection for milk traits in dairy buffaloes. **Genetics and Molecular Research**, v.4, 0.790-796. 2006.

STAFUZZA, N. B. et al. Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. **Animal Genetics**, v.38, p.406-409, 2007.

STONE, R. T. et al. Bovine UCP2 and UCP3 map to BTA15. **Animal genetics**, v.30, p. 378-381. 2003.

VAIMAN, D. et al. Evolutionary conservation of a microsatellite in the Wilms tumour (WT) gene: mapping in sheep and cattle. *Cytogenet Cell Genetics*. v.70, p. 112-115, 1995.

VIGNAUX, F. et al. Construction and optimization of a dog whole-genome radiation hybrid panel. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 888-894, 1999a.

VIGNAUX, F. et al. Toward a dog radiation hybrid map. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 62-67, 1999b.

WOMACK, J. E. et al. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. **Mammalian Genome**, v.8, p. 854-856, 1997.

YERLE, M. et al. Generation and characterization of a 12.000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 97, p. 219-228, 2002.

ANEXO A: Artigo publicado com a primeira geração de mapa RH do genoma total do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*).

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa

São José do Rio Preto, 06/02/2009

Assinatura

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)