

POLIMORFISMO DE ADENOSINA DE AMINASE E GLIOXALASE-I EM BÚFALOS E BOVINOS NELORE- ESTADO DO PARÁ¹

Luiza NAKAYAMA²

William Gomes VALE³

Maria Iracilda Cunha SAMPAIO⁴

Horacio SCHNEIDER⁵

Maria Paula Cruz SCHNEIDER⁶

RESUMO: Foram estudados os hemolisados de búfalos d'água das quatro raças (N= 266) e de bovinos Nelore (N= 51) a fim de detectar as variações eletroforéticas de Adenosina deaminase (ADA) e Glíoxalase-I (GLO). Foram detectados três alelos em búfalos: *ADA C*, *ADA D* e *ADA E*, em três combinações (*ADA CD*, *ADA DD* e *ADA DE*). Apenas a raça Carabao foi monomórfica para o alelo mais freqüente, *ADA D*. Em bovinos Nelore foram observados três alelos (*ADA A*, *ADA B* e *ADA C*) em cinco combinações: *ADA AA*, *ADA AB*, *ADA AC*, *ADA BC* e *ADA CC*). Além disso, o polimorfismo de GLO foi evidenciado apenas na raça Carabao. Portanto, esses dados sugerem que os sistemas ADA e GLO podem ser considerados como marcadores específicos para a raça Carabao, podendo ser usados para controle de cruzamentos junto com dados citogenéticos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Adenosina Deaminase, Glíoxalase-I, Búfalo, Bovino Nelore, Marcadores Bioquímicos, Genética.

ADENOSINE DE AMINASE AND GLYOXALASE-I POLYMORPHISM IN WATER BUFFALO AND NELORE CATTLE- STATE OF PARÁ

ABSTRACT: Haemolysates from water buffalo belonging to four breeds (N= 266) and from Nelore cattle (N= 51) were studied for electrophoretic variation of Adenosine deaminase (ADA) and Glyoxalase-I (GLO). Three alleles: *ADA C*, *ADA D* and *ADA E* were detected among buffaloes in three combinations (*ADA CD*, *ADA DD* and *ADA DE*). Only the Carabao breed was monomorphic for the more frequent allele, *ADA D*. In Nelore cattle three alleles (*ADA A*, *ADA B* and *ADA C*) were observed in five combinations: *ADAAA*, *ADAAB*, *ADAAC*, *ADABC* and *ADACC*). The GLO polymorphism

¹ Aprovado para publicação em 01.07.05

² Biomédica, Dra., Professora Adjunta da Universidade Federal do Pará. Correspondência para: Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia, Campus Universitário do Guamá. 66095-480, Belém (PA). Fone: (91) 3201-7560. E.mail: lunaka@ufpa.br

³ Médico Veterinário, Dr., Professor Titular da UFRA.

⁴ Médica Veterinária, Dra., Professora Adjunta da UFPA.

⁵ Biólogo, Dr., Professor Titular da UFPA.

⁶ Bióloga, Dra., Professora Adjunta da UFPA

was evidenced only in Carabao breed. Therefore, these data suggest that the ADA and GLO systems may be considered as specific marker for Carabao being able to be used for control of crossbreeds together with cytogenetic data.

INDEX TERMS: Biochemical Markers, Genetics.

1 INTRODUÇÃO

Bubalus bubalis é genericamente denominado búfalo d'água, sendo agrupado tradicionalmente junto com os bovinos (*Bos indicus*) na subfamília Bovinae (COCKRILL, 1981).

Os búfalos d'água podem ser diferenciados pelo número cromossômico (CHOWDHARY et al., 1989; PEARY, 1990; LUZ et al., 1995) em: búfalos de rio, com $2n=50$ cromossomos e búfalos de pântano, com $2n=48$ cromossomos.

No estado do Pará, encontram-se três raças de búfalos de rio (Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi variedades Palitana e Gir) e uma de búfalo de pântano (Carabao). O bovino Nelore, grupo externo do presente trabalho, tem $2n=60$ cromossomos.

As variações encontradas nas proteínas constituem os marcadores genéticos bioquímicos de grande utilidade em estudos genéticos, tais como: controle de paternidade, identificação de animais, distância entre raças e endocruzamento. O polimorfismo também fornece subsídios que poderão auxiliar no desenvolvimento e acompanhamento dos programas de melhoramento animal e preservação de germoplasma (PANEPUCCI, 1986).

A Adenosina deaminase (ADA) é uma aminohidrolase de estrutura monomérica, que atua no metabolismo das purinas, promovendo uma desaminação hidrolítica da adenosina. Suas isoenzimas ocorrem em todos os tecidos e são codificadas por um único loco autossômico. Na técnica da eletroforese é comum a formação de bandas secundárias, devido, provavelmente, às alterações pós-síntese da ADA eritrocitária.

A Glioxalase I (GLO) é uma liase de estrutura dimérica e que catalisa a conversão da S-lactoil glutationa em glutationa e metilglioxal. Esta enzima é codificada por um loco autossômico e está presente em quantidades consideráveis nos eritrócitos. A sua função não está bem esclarecida, porém existem indícios de que esta enzima esteja envolvida com o processo de divisão celular, removendo o metilglioxal que, supostamente, agiria como inibidor desse processo (RANZANI; ANTONINO; SANTA-CHIARA-BENERECETTI, 1979).

Há poucas informações sobre o estudo de variantes protéicas de ADA e GLO em Bovinae. O presente trabalho teve como objetivo o estudo eletroforético dessas proteínas em búfalos d'água e bovinos Nelore.

O presente estudo teve como objetivo o estudo de fenótipos eletroforéticos dessas proteínas em búfalos d'água e bovinos Nelore, para determinar marcadores genéticos que possam ser utilizados em estudos de parentesco na subfamília Bovinae.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 266 búfalos d'água e de 51 bovinos Nelore, adultos e saudáveis de ambos os sexos, com alto grau de pureza racial e todos criados no estado do Pará (Tabela 1) foram coletadas da veia jugular em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA (14 mg/10 mL de sangue total).

O plasma foi separado por centrifugação e as hemácias glicerotizadas, conforme metodologia descrita por Rowe, Eyster e Kellner (1968) e estocadas a -20 °C.

O hemolisado foi preparado misturando-se volumes iguais de hemácias e água destilada a meio volume de tetracloreto de carbono, agitando-se vigorosamente e em seguida centrifugando.

O hemolisado límpido foi usado para o estudo da ADA e da GLO.

As variantes protéicas foram identificadas pelo processo de eletroforese horizontal, em géis de agarose a 1% para ADA e de penetrose a 11%, para GLO. As soluções tampões usadas foram as empregadas por Martin, Berndt e Otis (1975) para ADA e Spencer, Hapkinson e Harris (1964) para GLO.

A denominação dos fenótipos eletroforéticos foi estabelecida a partir da comparação intra e inter-racial, além da intergenérica, de todos os padrões observados. Os alelos foram classificados em ordem alfabética e progressiva, a partir do mais anódico para o mais catódico.

Para a representação dos alelos foram usadas as regras de nomenclatura estabelecidas para bovinos (LARSEN et al., 1992), e para os fenótipos, o guia de nomenclatura genética para ruminantes (ANDERSEN et al., 1991).

Para a análise dos dados, cada rebanho de uma fazenda foi considerado subpopulação e cada raça considerada população.

As frequências gênicas e as respectivas variâncias de cada um dos sistemas, nas quatro raças bubalinas e na Nelore, foram obtidas através do programa de computador BIOSYS- 1 de Swofford e Selander (1989).

Para verificar se as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste do Qui-quadrado usando-se a opção HDYWBG do programa.

A heterogeneidade genética dentro de cada raça bubalina foi calculada através da opção HETXSQ do BIOSYS-1, que realiza análise de heterogeneidade em tabelas de contingência com $(M-1)(N-1)$ graus de liberdade, onde M é o número de populações e N, o número de alelos.

Tabela 1 – Caracterização das populações estudadas, classificadas pela raça, procedência, categoria e número de animais.

Espécie/Raça	Procedência Fazenda – Município	Sexo		TOTAL
		Macho	Fêmea	
<i>Bubalus bubalis</i>				
CARABAO				
	Irituia - Irituia	06	08	14
	Santa Terezinha - Santa Maria do Pará	21	19	40
	SUBTOTAL	27	27	54
JAFARABADI				
variedade GIR				
	Santana - Castanhal	10	01	11
	Agrotal - Mosqueiro	–	07	07
	Santa Terezinha - Santa Maria do Pará	01	08	09
	Matinadas - Ilha do Marajó	03	20	23
	SUBTOTAL	14	36	50
JAFARABADI				
variedade PALITANA				
	Santana - Castanhal	02	23	25
	Agrotal - Mosqueiro	05	06	11
	Santa Terezinha - Santa Maria do Pará	04	03	07
	Matinadas - Ilha do Marajó	01	05	06
	SUBTOTAL	12	37	49
MEDITERRÂNEO				
	Santa Terezinha - Santa Maria do Pará	05	26	31
	Miritueira - Nova Timboteua	08	11	19
	EMBRAPA/CPATU - Belém	00	10	10
	SUBTOTAL	13	47	60
MURRAH				
	Itaqui - Castanhal	05	25	30
	EMBRAPA/CPATU - Belém	10	13	23
	SUBTOTAL	15	38	53
<i>Bos taurus indicus</i>				
NELORE				
	Itaqui - Castanhal	08	43	51
	TOTAL	89	228	317

Nota: Sinal convencional

– Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente investigação foram observados 5 alelos: *ADA A*, *ADA B*, *ADA C*, *ADA D* e *ADA E*. Os búfalos d'água apresentaram três combinações alélicas: *ADA CD*, *ADA DD* e *ADA DE* e os bovinos Nelore cinco: *ADAAA*, *ADAAB*, *ADAAC*, *ADA BC* e *ADA CC* (Figura 1 e Tabela 2).

O alelo *ADA D* foi o mais freqüente em todas as raças bubalinas (variou de 0,740 a 1,000) seguido dos *ADA E* e *ADA C*. As duas subpopulações estudadas da raça Carabao foram monomórficas. Já para outras raças, só algumas populações se apresentaram monomórficas para o alelo *ADA D*, a saber: raça Jafarabadi (var. Gir e Palitana) das fazendas Agrotal e Santa Terezinha; e raça Mediterrâneo da EMBRAPA. A raça Murrah se apresentou polimórfica nas duas subpopulações estudadas (Tabela 3).

Até o presente momento, não foi constatado outro estudo eletroforético qualitativo de ADA em búfalos.

Larsen, Hyldgaard-Jensen e Aagaard (1978), estudando polimorfismo de ADA em raças puras de bovinos dinamarqueses (173

Vermelho Dinamarquês, 331 Preto e Branco Dinamarquês e 42 Jersey) observaram a presença de 10 fenótipos controlados por quatro alelos codominantes: *ADA A*, *ADA B*, *ADA C* e *ADA D*. O alelo *ADA A* foi o menos freqüente nas raças dinamarquesas Vermelho e Jersey, variando de 0,02 a 0,04, respectivamente, sendo que a raça Preto e Branco apresentou freqüência de 0,19. O alelo *ADA C* foi o mais freqüente nas três raças de bovinos dinamarqueses analisadas, com freqüência aproximada de 0,5. A freqüência do alelo *ADA B* variou de 0,11 a 0,18. Preto e Branco Dinamarquês, Jersey e Vermelho Dinamarquês apresentaram freqüências de 0,13, 0,30 e 0,32, respectivamente, para o alelo *ADA D*. Entretanto, como os autores não fizeram referência à mobilidade eletroforética das bandas, não foi possível determinar uma correlação entre os padrões obtidos no presente trabalho em Nelore, com os alelos descritos anteriormente. Com base apenas na maior freqüência observada em bovino Nelore (Tabela 3), sugere-se que o alelo *ADA A* corresponde ao *ADA C*, descrito por Larsen, Hyldgaard-Jensen e Aagaard (1978).

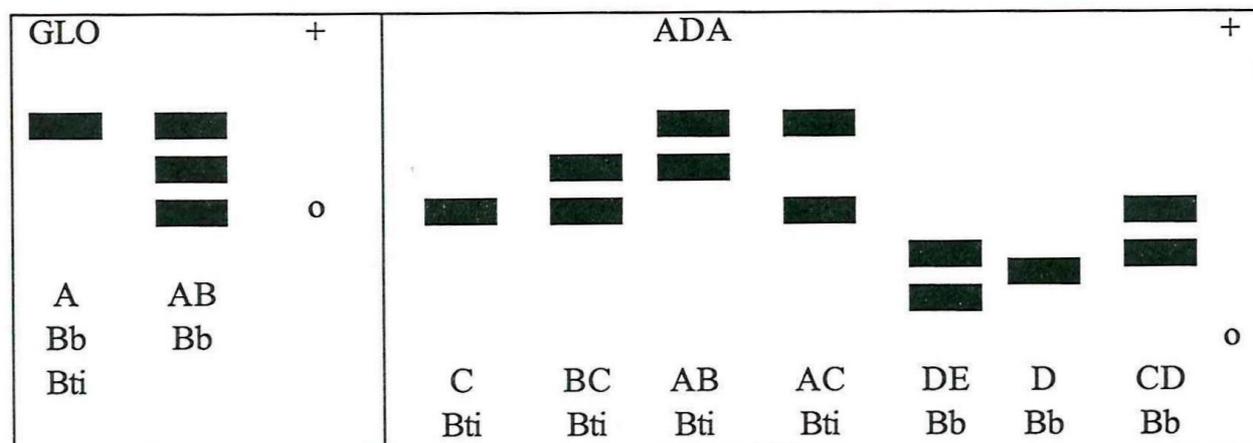


Figura 1 – Padrões eletroforéticos comparativos de ADA e GLO apresentados em dezesseis populações de Bovinae (Bti = *Bos taurus indicus*, Bb = *Bubalus bubalis*).

Tabela 2 – Classes fenotípicas de Adenosina deaminase, em 16 populações de Bovinae.

Raça/Fazenda	Classes fenotípicas							
	AA	AB	AC	BC	CD	CC	DD	DE
CARABAO								
Fazenda Irituia	–	–	–	–	–	–	–	–
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	–	–	–	–	–
JAFARABADI var. GIR								
Fazenda Santana	–	–	–	–	–	–	07	04
Fazenda Agrotal	–	–	–	–	–	–	–	–
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	–	–	–	–	–
Fazenda Matinadas	–	–	–	–	–	–	13	06
JAFARABADI var. PALITANA								
Fazenda Santana	–	–	–	–	–	–	12	13
Fazenda Agrotal	–	–	–	–	–	–	–	–
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	–	–	–	–	–
Fazenda Matinadas	–	–	–	–	–	–	05	01
MEDITERRÂNEO								
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	–	01	–	28	02
Fazenda Miritueira	–	–	–	–	–	–	18	01
Fazenda EMBRAPA/CPATU	–	–	–	–	–	–	–	–
MURRAH								
Fazenda Itaqui	–	–	–	–	–	–	23	07
Fazenda EMBRAPA/CPATU	–	–	–	–	–	–	15	08
NELORE								
Fazenda Itaqui	21	01	18	01	–	10	–	–

Nota: Sinal convencional

– Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Tabela 3 – Frequências gênicas estimadas e teste do qui-quadrado para o sistema da Adenosina deaminase, em 16 populações de Bovinae.

Raça/Fazenda	Frequências gênicas					χ^2
	ADA A	ADA B	ADA C	ADA D	ADA E	
CARABAO						
Fazenda Irituia	–	–	–	1,000	–	-0-
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	1,000	–	-0-
JAFARABADI var. GIR						
Fazenda Santana	–	–	–	0,818	0,182	0,392
Fazenda Agrotal	–	–	–	1,000	–	-0-
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	1,000	–	-0-
Fazenda Matinadas	–	–	0,087	0,783	0,130	1,571
JAFARABADI var. PALITANA						
Fazenda Santana	–	–	–	0,740	0,260	2,811
Fazenda Agrotal	–	–	–	1,000	–	-0-
Fazenda Santa Terezinha	–	–	–	1,000	–	-0-
Fazenda Matinadas	–	–	–	0,917	0,083	–
MEDITERRÂNEO						
Fazenda Santa Terezinha	–	–	0,016	0,952	0,032	0,053
Fazenda Miritueira	–	–	–	0,974	0,026	–
Fazenda EMBRAPA/CPATU	–	–	–	1,000	–	-0-
MURRAH						
Fazenda Itaqui	–	–	–	0,883	0,117	0,442
Fazenda EMBRAPA/CPATU	–	–	–	0,826	0,174	0,876
NELORE						
Fazenda Itaqui	0,598	0,020	0,382	–	–	2,848

Nota: Sinal convencional

– Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Se for considerado que os fenótipos eletroforéticos observados nos dois trabalhos são resultantes da ação dos mesmos alelos, pode-se supor que a discrepância quanto à frequência destes seja decorrente do fato de que Larsen, Hyldgaard-Jensen e Aagaard

(1978) investigaram bovinos taurinos, enquanto no presente estudo foram estudados bovinos zebuínos. Pode-se supor, também, que os lotes formadores dos rebanhos, assim como fatores seletivos ambientais, fossem diferentes em ambos os estudos.

O fenótipo monomórfico GLO AA foi observado em búfalos de rio, sendo compartilhado por bovinos Nelore, estando de acordo com Vogel et al. (1982) e Del Lama (1992) para diferentes espécies de bovino.

A variante polimórfica GLO AB foi exclusiva de búfalos de pântano. A frequência observada em Carabao na Fazenda Irituia, para os alelos *GLO A* e *GLO B* foi de 0,714 e 0,286 e na Fazenda Santa Terezinha, de 0,887 e 0,112, respectivamente (Tabela 4).

Barker et al. (1997a) observaram polimorfismo da GLO em búfalos d'água, possivelmente com frequência maior para o alelo rápido, denominado no presente trabalho por *GLO A*, por ser o alelo mais comum na subfamília Bovinae. Porém, não foi possível determinar se tal polimorfismo foi detectado em búfalos de pântano e/ou de rio, uma questão relevante, uma vez que no presente trabalho só foi observado polimorfismo em búfalos Carabao.

Todas as subpopulações bubalinas, nas quais foram constatados polimorfismos de ADA e GLO, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Através da análise de contingência para o sistema da ADA (Tabela 5), verificou-se que não existe diferença quanto à frequência dos alelos detectados dentro das subpopulações de bubalinos das raças Mediterrâneo e Murrah. Já nas variedades Gir e Palitana da raça Jafarabadi, a heterogeneidade é devida à variação da frequência dentro de cada variedade e não

entre as variedades Gir e Palitana. Isto pode ser decorrente da variação no tamanho amostral, pois as duas subpopulações discrepantes em termos de frequências gênicas (Tabela 3) são as da Fazenda Santana, onde foram amostrados apenas 11 indivíduos da variedade Gir e da Fazenda Matinadas, onde foram amostrados apenas 6 animais Palitana. Eliminando estas duas amostras, as diferentes subpopulações poderiam ser consideradas como única, concordando com a A.B.C.B. (Associação Brasileira de Criadores de Búfalos) que, a partir de 1990, não distingue mais a raça Jafarabadi em variedades (GONDIM⁶, informação verbal).

A análise de contingência, para o sistema da GLO na raça Carabao, detectou que as subpopulações eram heterogêneas (Tabela 5), indicando claramente que os rebanhos das duas fazendas diferem significativamente quanto à estrutura genética. Tal heterogeneidade genética entre as subpopulações pode também ser explicada pelo tamanho populacional pequeno em cada rebanho (Fazenda Irituia= 14 animais e Fazenda Santa Terezinha= 40 animais) e por outros fatores, tais como estrutura de cruzamento, deriva genética ou seleção.

Como o alelo *GLO B* só foi observado na raça Carabao, pode-se sugerir que ele seja um marcador genético específico para essa raça bubalina.

⁶ GONDIM, Abnor Gurgel. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., ex-Professor Titular da UFRA.

Tabela 4 – Distribuição dos fenótipos observados, freqüências gênicas estimadas e teste do qui-quadrado para o sistema da GLO na raça Carabao.

Fazendas	Fenótipos observados			Freqüências gênicas		
	AA	AB	BB	<i>GLO A</i>	<i>GLO B</i>	χ^2
Irituia	06	08	00	0,714	0,286	1,916
Santa Terezinha	31	09	00	0,887	0,112	0,565

Tabela 5 – Análise de contingência para os locos da ADA e da GLO, nas quatro raças bubalinas.

Locos	Número de alelos	\div^2	G.L.	Probabilidade
CARABAO				
GLO	2	4,692	1	0,03031*
JAFARABADI				
ADA	3	33,047	14	0,00284**
MEDITERRÂNEO				
ADA	3	1,608	4	0,80731
MURRAH				
ADA	2	0,702	1	0,40198

*P < 5%; **P < 1%

Essas observações estão de acordo com muitos autores que reportaram que búfalos de rio e de pântano podem ser distinguidos pelos seus números cromossômicos (CHOWDHARY et al., 1989; PEARY, 1990; LUZ et al., 1995), pelas características fenotípicas (FONSECA, 1987) e pelo polimorfismo de DNA microsatélite (BARKER et al., 1997b).

4 CONCLUSÃO

a) O alelo *GLO B* é um marcador genético para a raça Carabao.

b) Com base nas freqüências gênicas e na distribuição fenotípica, sugere-se que os sistemas de ADA e GLO, assim como CA2 (NAKAYAMA et al., 1997) podem ser considerados muito eficientes para o controle de parentesco e como marcadores em análises genéticas.

c) Em vista dos alelos *ADA C* e *GLO A* terem sido detectados em bubalinos e bovinos Nelore, sugere-se que estes estiveram presentes no ancestral comum dos dois gêneros.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, E.; BROAD, T.; DI STASIO, L.; DOLLING, C.H.S.; HILL, D.; HUSTON, K.; LARSEN, B.; LAUVERGNE, J.J.; LEVÉZIEL, H.; MALHER, X.; MILLAR, P.; RAE, A.L.; RENIERI, C.; TUCKER, E.M. Guidelines for gene nomenclature in ruminants. *Genet. Sel. Evol.*, v.23, p.461-466, 1991.
- BARKER, J.S.F.; TAN, S.G.; SELVARAJ, O.S.; MUKHERJEE, T.K. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Genet.*, v.28, p.1-13, 1997a.
- ; MORE, S.S.; HETZEL, D.J.S.; EVANS, D.; TAN, S.G.; BYRNE, K. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Anim. Genet.*, v.28, p.103-115, 1997b.
- COCKRILL, W.R. The water buffalo: a review. *Brit. Vet. J.*, v.137, p.8-16, 1981.
- CHOWDHARY, B.P.; GUSTAVSSON, I.; KUNAVONGKRIT, A.; LOHACHIT, C.; MAKINEN, A. Detailed mitotic description of the tandem fusion translocation differentiating river and swamp buffalo. *Buffalo J.*, v.1, p.41-49, 1989.
- DEL LAMA, S.N. *Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos*. 1992. 207p. Tese (Doutorado em Genética Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 1992.
- FONSECA, W. *Búfalo: estudo e comportamento*. São Paulo: Icone, 1987. 213p.
- LARSEN, B.; HYLDGAARD-JENSEN, J.; AAGAARD, L. Studies on adenosine deaminase (ADA) polymorphism in Danish cattle. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, v.9, p.191-193, 1978.
- ; DI STASIO, L.; TUCKER, E.M. COGNOSAG workshop report: list of alleles for blood and milk polymorphisms in cattle, sheep and goats. *Anim. Genet.*, v.23, p.1188-1192, 1992.
- LUZ, R.S.; SOUZA, H.E.M.; AMORIM, M.I.M.; SOUSA, J.S.; VALE, W.G. A reliable method of preparing buffaloes chromosomes by using a rapid culture of chorionic villi cells. *Buffalo J.*, v.2, p.171-177, 1995.
- MARTIN, M.; BERNDT, H.; OTT, A. Cellogel folien zur bestimmung der sauren erythrozyben-phosphatase-vergleichende untersuchungen zur darstellung instarkelgel. *Arztz. Lab.*, v.21, p.435-436, 1975.
- NAKAYAMA, L.; VALE, W.G.; SAMPAIO, M.I.C.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.P.C. Carbonic anhydrase 2 Polymorphism in buffalo (*Bubalus bubalis*) and Nellore cattle (*Bos taurus indicus*) from Amazon Valley-Brazil. *Buffalo J.*, v.1, p.33-41, 1997.
- PANEPUCCI, L.L. *Importância dos marcadores genéticos bioquímicos e sua aplicação ao melhoramento animal e a pesquisa em geral*. São Carlos: EMBRAPA. DDT, 1986. 26p.

PEARY, J.Y. Revision of buffaloes position on the zoological scale. *Buffalo Bull.*, v.9, p.9-17, 1990.

RANZANI, Z.; ANTONINI, G.; SANTACHIARA-BENERECETTI, S. Red cell glyoxalase I polymorphism initalians. *Hum. Hered.*, v.29, p.261, 1979.

ROWE, A.W.; EYSTER, E.; KELLNER, A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. A low glycerol rapid freeze procedure. *Cryobiology*, v.5, p.119-122, 1968.

SPENCER, N.; HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H. Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature*, v.204, p.742-745, 1964.

SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. *BIOSYS-1 A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematic*. Campaign, Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.

VOGEL, I.; MAYR, B.; WEIRATHER, G.; MAYR, W. GLO-I studies on cattle and pig breeds in Austria. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, v.13, p.63-64, 1982.