

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO GENÔMICO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR
***Babesia bovis* EM BOVINOS DA RAÇA ANGUS**

Clarissa Helena Santana

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO GENÔMICO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR
Babesia bovis EM BOVINOS DA RAÇA ANGUS**

**Clarissa Helena Santana
Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes Oliveira
Coorientadora: Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Genética e
Melhoramento Animal

2016

Santana, Clarissa Helena
S323e Estudo genômico do nível de infecção por *Babesia bovis* em
bovinos da raça angus / Clarissa Helena Santana. -- Jaboticabal,
2016
x, 52 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Henrique Nunes de Oliveira
Coorientador: Márcia Cristina de Sena Oliveira
Banca examinadora: Rodrigo Giglioti, Simone Cristina Méo Niciura
Bibliografia

1. Angus. 2. *Babesia bovis*. 3. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
4. Seleção genômica I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLARISSA HELENA SANTANA- Filha de Regina Helena Carlucci Santana e Marcos José Santana, nascida em 23 de maio de 1991, no município de Ribeirão Preto–SP. Segundo grau completo pela Escola Educativa no município de São Carlos–SP, em dezembro de 2008. Médica Veterinária, graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, em fevereiro de 2014. Em agosto de 2014, ingressou no programa de mestrado em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, com apoio financeiro da CAPES. Realizou a parte experimental de seu projeto de mestrado na Embrapa Pecuária Sudeste no município de São Carlos-SP.

”Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus maiores e melhores mestres de toda a vida: Meu PAI e minha MÃE.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer...

Primeiramente a Deus, por tudo que tem me destinado na vida, por ter me colocado na melhor família que eu poderia ter, ter me mandado os melhores amigos e destinados as melhores oportunidades.

Ao meu pai, Marcos, meu herói e espelho, e à minha mãe, Regina, minha melhor amiga e companheira. Obrigado aos dois, por me amarem incondicionalmente, por pensarem em mim antes mesmo de pensarem em si mesmos, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, até mesmo as mais malucas, e por me guiarem pelos melhores caminhos. Eu já disse isso em minha defesa de TCC, repito agora, e repetirei em todas as próximas conquistas. Vocês são TUDO na minha vida e eu não seria NADA sem vocês. Obrigado por serem exatamente quem vocês são: os melhores do mundo!

Ao meu irmão, André, meu protetor por toda a vida e hoje companheiro de profissão. Obrigada pelas brigas que me fizeram crescer muito, pelas risadas que fizeram dos meus dias mais felizes e leves e por, de alguma forma, ter me guiado nesta profissão maravilhosa que compartilhamos hoje. À Camila, por fazer de você uma pessoa mais feliz e por ser sua companheira na vida. Desejo aos dois as melhores coisas que a vida pode lhes dar.

Ao meu namorado, Igor, companheiro de todos os momentos, parceiro de todas as horas (boas e ruins) e meu incentivador de todos os meus sonhos. Você foi peça essencial nesta conquista. Obrigada pela paciência, pelo carinho e por cuidar tanto de mim. Eu te amo! Estaremos juntos em mais todas as próximas conquistas em nossas vidas.

À minha segunda mãe, Nena, que cuidou e cuida de mim como se fosse sua filha. Obrigada por me amar tanto e por se importar tanto comigo. Você faz parte do meu dia-a-dia, da minha família e da minha vida!

Às minhas “filhas” por me mostrarem a mais pura definição de amor e fidelidade. Aprendo a ser uma pessoa melhor todos os dias com elas.

Aos meus amigos de todas as horas (estes sabem quem são), por me trazerem alegria no dia-a-dia, por serem tão fiéis e parceiros e por sempre se preocuparem comigo.

Aos meus familiares (tios, tias, primos e primas), por serem tão carinhosos e próximos, e por todas as festas, risadas e comilanças que fazem a vida em família valer muito a pena!

À minha coorientadora Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade e por todo o aprendizado. Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira por ter aceitado me orientar e por todo ensinamento durante o meu mestrado.

Aos companheiros de trabalho Rodrigo, Talita, Thalita e Thuane, pela ajuda em todos os momentos necessários e pelas palhaçadas que renderam boas risadas no dia-a-dia. Com certeza fiz bons e grandes amigos aqui e vou leva-los por toda a vida comigo!

Aos membros da banca de qualificação Dr. Rodrigo Giglioti e Prof. Dr. Humberto Tonhati, muito obrigada pelos conselhos e correções. Aos membros da banca de defesa Rodrigo Giglioti e Simone Cristina Méo Niciura, muito obrigada por fazerem parte da banca e por todos os conselhos muito proveitosos para melhora do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carneiro pela ajuda com todas as análises genotípicas, pela paciência e pelos ensinamentos.

À CAPES pelo apoio financeiro dado através da bolsa de mestrado durante todo o período.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste por toda ajuda quando necessária e à Embrapa por me permitir realizar meu mestrado em uma de suas unidades.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, por ter me acolhido tão bem e ter sido minha casa desde o início da graduação. Eu tenho MUITO orgulho de dizer que sou Médica Veterinária formada pela Unesp de Jaboticabal. Aos professores e mestres da FCAV que, de alguma forma, muito importante, me guiaram ao sucesso profissional, deixo o meu muito obrigada.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretizasse, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE QUADROS	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Babesiose bovina.....	4
2.2 Prejuízos econômicos causados pela <i>B. bovis</i>	5
2.3 Diagnóstico das babesioses	6
2.4 Situação das babesiose no Brasil	7
2.5 Resistência e controle.....	8
2.6 Seleção Genômica e GWAS.....	10
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Animais e características avaliadas	14
4.1.1 <i>Contagem de carrapatos</i>	14
4.1.2 <i>Colheita de sangue</i>	14
4.2 Extração de DNA	15
4.3 Quantificação de <i>B. bovis</i> pela técnica de qPCR.....	15
4.3.1 <i>Padronização da técnica de qPCR para detecção de B. bovis.</i> 16	
4.3.1.1 Otimização da reação de qPCR.....	17
4.3.1.2 Cálculo da eficiência dos ensaios	18
4.3.1.3 Construção da curva de calibração a partir do gBlocks® Gene Fragments	19
4.3.1.4 Cálculo do número de cópias.....	21
4.4 Genotipagem	22

4.4.1	<i>Preparação das amostras para envio ao Laboratório de genotipagem</i>	22
4.4.2	<i>Genotipagem</i>	22
4.5	<i>Análise dos resultados da genotipagem</i>	22
4.5.1	<i>Controle de qualidade dos genótipos</i>	22
4.5.2	<i>Imputação</i>	23
4.5.3	<i>Obtenção dos parâmetros genéticos</i>	23
4.5.4	<i>Estudo de associação genômica ampla</i>	23
4.5.5	<i>Identificação de regiões cromossômicas significativas relacionadas às características de resistência a carrapato e infecção por B. bovis</i>	26
4.5.6	<i>Análise no banco de dados Animal QTLdb</i>	26
5	RESULTADOS	27
5.1	<i>Contagem de carrapatos Rhipicephalus (Boophilus) Microplus</i>	27
5.2	<i>Quantificação de B. bovis pela técnica de qPCR</i>	27
5.3	<i>Análises de correlação e repetibilidade dos dados</i>	30
5.4	<i>Genotipagem</i>	31
5.4.1	<i>Controle de qualidade dos genótipos</i>	31
5.4.2	<i>Imputação</i>	32
5.4.3	<i>Estudo de associação genômica ampla</i>	32
5.4.4	<i>Análise no banco de dados Animal QTLdb</i>	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÕES	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ESTUDO GENÔMICO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR *Babesia bovis* EM BOVINOS DA RAÇA ANGUS

RESUMO - A bovinocultura é um setor com importante destaque no agronegócio brasileiro. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas significativas aos pecuaristas e é vetor de hemoparasitoses como *Anaplasma* spp e *Babesia* spp. Sabe-se que os bovinos *Bos taurus taurus* são mais susceptíveis à infestação por carrapatos do que *Bos taurus indicus*. Acredita-se que o mesmo ocorra para a infecção por *Babesia bovis*. Neste trabalho, foram avaliados, em duas colheitas, 355 bovinos da raça Angus, pertencentes a uma fazenda de Uruguaiana-RS, nos quais foram realizadas contagens de carrapatos e colheitas de amostras de sangue para quantificação de *B. bovis*, pela técnica de qPCR, e genotipagem com chip de 150.000 marcadores SNP. Para qPCR utilizaram-se sequências iniciadoras que flanqueiam um fragmento do gene do citocromo B (mt-cytB), como oligonucleotídeos iniciadores. Após genotipagem dos bovinos com o chip *Gene Seek Genomic Profiler™* (GGP-HD) da *Illumina Infinium®*, foi realizado imputação de genótipos, para recuperação de genótipos faltantes, e controle de qualidade. Foi realizada análise de associação genômica ampla (GWAS), para cada uma das características, infecção por *B. bovis* e resistência a carrapatos, através do método denominado “Single Step Genomic BLUP” (ssGBLUP). Todos os animais apresentaram infestação por carrapatos e infecção por *B. bovis*, determinada pela qPCR, e altos valores médios para ambas as características. Algumas regiões cromossômicas foram identificadas como significativas para as características estudadas, sendo que, sete dos cromossomos identificados no presente estudo já haviam sido descritos em outros trabalhos. Neste sentido, o presente estudo corrobora com outros resultados indicando que a técnica de qPCR é um método sensível de detecção de *B. bovis* em animais Angus e que as regiões genômicas identificadas como significativas podem ser importantes para a variação das características estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Angus, *Babesia bovis*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, seleção genômica.

GENOMIC STUDY OF THE LEVEL OF INFECTION BY *Babesia bovis* IN ANGUS CATTLE

ABSTRACT - The cattle industry is a sector with importance in the Brazilian agribusiness. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is responsible for economic losses and is a vector for hemoparasitoses, such as *Anaplasma* spp and *Babesia* spp. It is known that the *Bos tauros* animals are more susceptible to infestation by ticks when compared with infestation in *Bos indicus* animals. It is believed that the same behavior keeps for infection by *Babesia bovis*. They were evaluated, in two collections, 355 Angus cattle, from a farm in Uruguaiana city, estate of Rio Grande do Sul, where were performed tick counts, quantification of *B. bovis* by qPCR and genotyping with a 150K chip. Were used as primers, in the qPCR, sequences that flanking the fragment of the cytochrome b gene. The technique was standardized and optimized using specimens of isolates of *B. bovis*. After genotyping, imputation was carried out, for recovery of missing genotypes, and quality control. Genome association analysis was performed (GWAS), to each of the characteristics, through the method called "Single Step Genomic BLUP" (ssGBLUP). All animals showed tick infestation and infection by *B. bovis* and high average values for both characteristics. Some regions on chromosomes were identified as significant to the characteristics tick infestation and infection by *B. bovis*, and seven chromosomes, identified in the present study, were already described in other studies. The present study agrees with other results indicating that the qPCR technique is a sensitive method to detecting *B. bovis* in Angus and genomic regions identified may be significant for the variation of these characteristics.

KEY WORDS: Angus, *Babesia bovis*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, genomic selection.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Ciclos de amplificação de <i>B. bovis</i> em amostras de DNA genômico diluídas e não diluídas. Observa-se que as amostras não diluídas apresentaram Cq antecipado com relação às amostras diluídas. A curva de dissociação de ambas as amostras foi semelhante (Temperatura de dissociação = 77,5°C).	17
FIGURA 2. Amplificação do controle positivo para <i>B. bovis</i> na reação de qPCR, com as amostras de DNA, comprovando a especificidade do teste. Observa-se que as curvas de dissociação foram semelhantes para as amostras e o controle positivo. Observa-se também que não houve amplificação do NTC (verde).	18
FIGURA 3. Curva de calibração, construída a partir do fragmento gBlocks®, utilizada nas reações de qPCR para quantificação de <i>B. bovis</i>	20
FIGURA 4. Reação com as amostras de DNA genômico e a curva de calibração (10^{-10} a 10^{-3}). As amostras estão dentro do intervalo da curva de calibração.	20
FIGURA 5. Curva de dissociação utilizada em cada uma das reações de qPCR com as concentrações máxima (5×10^{-12} grama/ μ L) e mínima (5×10^{-19} grama/ μ L), as quais equivalem a 300.000.000 e 3 cópias de <i>B. bovis</i> , respectivamente.	29
FIGURA 6. Distribuição das médias do número de cópias de <i>B. bovis</i> (NC) e da contagem de carrapatos (CC) do grupo de filhos de cada um dos 38 touros (T1-T38) que compunham o rebanho em estudo.	31
FIGURA 7. <i>Manhattan plots</i> gerados em de cada uma das iterações na análise de GWAS para a característica de contagem de carrapatos demonstrando os SNPs mais significativos. A= iteração 1; B= iteração 2; C=iteração 3.	34
FIGURA 8. <i>Manhattan plots</i> gerados em de cada uma das iterações na análise de GWAS para a característica de número de cópias de <i>B. bovis</i> demonstrando os SNPs mais significativos. A= iteração 1; B= iteração 2; C=iteração 3.	37

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1. Sequências que flanqueiam o fragmento do gene do citocromo B (mt-cyt B) de <i>Babesia bovis</i> , com 88 pares de bases, utilizadas como oligonucleotídeos iniciadores, direto (F Cbosg-1) e reverso (R Cbosg-2), na técnica de qPCR para quantificação de <i>Babesia bovis</i>	15
QUADRO 2. Ciclos padronizados na reação de qPCR para amplificação de <i>B. bovis</i> nas amostras de DNA genômico dos animais Angus.	16
QUADRO 3. Sequência fragmento de 308 pares de bases do gBloks® sintetizado para confecção da curva de calibração para <i>B. bovis</i> . Em negrito a sequência de 88 pares de bases de <i>B. bovis</i>	19
QUADRO 4. Médias, desvios padrão (DP) e os valores de máximo e mínimo das contagens de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> dos dados originais e transformados em $\text{Log}_{10}(n+1)$	27
QUADRO 5. Valores de Eficiência (E%), slope, r^2 e y-intercept (y-int) de cada um dos 25 ensaios de qPCR para quantificação de <i>B. bovis</i>	28
QUADRO 6. Médias, desvios padrão (DP) e valores de máximo e mínimo do número de cópias (NC) de <i>B. bovis</i> quantificadas pela técnica de qPCR, dados originais e transformados em $\text{Log}_{10}(n+1)$	30
QUADRO 7. Cromossomos, janelas (Mb) e a porcentagem de variação genotípica de infestação por <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> explicada pelos SNPs pertencentes a cada janela, identificados na iteração 1 (w1), iteração 2 (w2) e iteração 3 (w3). Cromossomo__Janela (% variação). (*) janelas em comum das iterações w1 e w2; (#) janelas em comum das iterações w2 e w3; (**) janelas em comum das iterações w1, w2 e w3.	33
QUADRO 8. Cromossomos, janelas (Mb) e a porcentagem de variação genotípica da infecção por <i>B. bovis</i> explicada pelos SNPs pertencentes a cada janela, identificados na iteração 1 (w1), iteração 2 (w2) e iteração 3 (w3). Cromossomo__Janela (% variação). (*) janelas em comum das iterações w1 e w2; (#) janelas em comum das iterações w2 e w3; (**) janelas em comum das iterações w1, w2 e w3.	36

QUADRO 9. Cromossomos e regiões onde foram relatados QTLs associados a característica resistência a carrapatos no <i>Animal QTLdb</i> (RNE= Região não especificada)	38
---	----

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um setor com destaque no agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de 50 bilhões de reais ao ano (CEPEA, 2010). Apesar disto, os pecuaristas enfrentam obstáculos quando buscam aumento de produtividade ou da qualidade do produto. As infestações pelo carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* representam um dos principais obstáculos. O carrapato é responsável por grandes perdas econômicas na bovinocultura, principalmente quando se trabalha com raças europeias, predominantes na região Sul do país (CAMILLO et al., 2009). Este ectoparasita causa prejuízos diretos decorrentes, por exemplo, da redução da produção de leite, redução do ganho de peso e danos ao couro dos animais. Além disso, causa prejuízos indiretos decorrentes da transmissão de hemoparasitoses como *Anaplasma* spp e *Babesia* spp, causadores da Tristeza Parasitaria Bovina (TPB) (CORDOVÉS, 1997).

As babesias, especialmente a *B. bovis*, podem causar altos índices de mortalidade em animais adultos não previamente infectados. Entretanto, nas áreas em que o carrapato *R. (B.) microplus* ocorre naturalmente durante todo ano, os animais são infectados quando bezerros, desenvolvem imunidade e são constantemente reinfectados ao longo da vida, permanecendo assim como portadores assintomáticos. Esta situação, conhecida como estabilidade enzoótica, acarreta baixa mortalidade pelas hemoparasitoses em animais adultos (MAHONEY & ROSS, 1972). Nestas condições a babesiose é mais comum nos bezerros, especialmente abaixo de quatro meses. Entretanto, quando ocorre redução drástica na população de carrapatos, quer por fatores climáticos ou por ações de manejo inadequadas por parte dos criadores, podem emergir surtos de babesiose com altas taxas mortalidade. Desta forma, as babesioses causam danos não apenas pela sua ação sobre os animais, causando mortalidade e gastos com medicamentos, mas também por impedir o controle de carrapatos mais efetivo nos rebanhos, já que existe a necessidade de manutenção da população dos carrapatos em um nível mínimo.

Uma das formas de diagnóstico das infecções por *B. bovis* que tem sido amplamente utilizada são as técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase

(PCR), com amplificação de um fragmento de DNA alvo de estudo para possibilitar sua detecção. A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica molecular com boa sensibilidade e especificidade e que permite a quantificação da infecção nos animais, podendo ser utilizada para diagnóstico, estudos genéticos quantitativos, estudos de respostas a medicamentos e estudos de prevalência, entre outros.

Sabe-se que os animais *Bos taurus* apresentam maior susceptibilidade à infestação por carrapatos quando comparados aos animais *Bos indicus*. Porém, com relação à infecção por *Babesia* spp, não se sabe ao certo qual a influência do grupo genético no nível de infecção pelo hemoparasita, mas acredita-se que os animais taurinos sejam também mais susceptíveis (BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que há maior resistência à babesiose em animais *Bos indicus* comparado aos animais *Bos taurus* (JONSSON et al., 2008; PIPER et al., 2010; AGUIRRE et al., 1990). Por outro lado, Oliveira et al. (2008) não observaram diferença na prevalência de *B. bigemina* entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus* criados no mesmo pasto, e Giglioti (2013) sugeriu que a resistência às babesioses não esteja relacionada apenas ao grupo genético dos animais.

Os métodos de controle de carrapatos e das babesioses nos rebanhos têm apresentado dificuldades devido principalmente ao surgimento de resistência dos carrapatos aos princípios usados no seu controle e as limitações no uso de premunicação, vacinação e quimioprofilaxia, para controle da babesiose. A seleção de animais de raças taurinas mais resistentes aos carrapatos e às babesioses pode ser uma interessante alternativa para aumentar a produtividade do rebanho nacional. Entretanto, a obtenção de dados fenotípicos sobre a resistência a estes parasitas é difícil e onerosa e, assim, são praticamente inexistentes os dados sobre estas características no Brasil.

Para reverter esta situação, é importante aumentar o número de animais controlados no país e aplicar técnicas que permitam seleção mais efetiva a partir de um conjunto de dados limitado. Dentre as possibilidades de aprimoramento, a seleção genômica e a identificação de polimorfismos ou regiões do genoma associados à QTLs (locos de características quantitativas, do inglês *Quantitative Trait Locus*) para as características de interesse, são técnicas bastante promissoras (MEUWISSEN et al., 2001). A utilização de seleção genômica em rebanhos nos quais a infestação por

carrapatos e a infecção por *B. bovis* é significativa, pode ser uma boa alternativa para redução de perdas de produtividade e perdas econômicas. Esse método pode aumentar a taxa produtiva do rebanho sem causar impactos ambientais negativos, pois permitirá substituir sistemas de produção muito intensificados por meio da seleção de animais superiores.

Considerando-se os problemas gerados pelos carrapatos e os agentes da TPB nos rebanhos bovinos no Brasil, a aplicação de ferramentas genômicas para a seleção de animais mais resistentes pode ser uma alternativa para aumentar a produtividade nos rebanhos. Sendo assim, é de grande importância a condução de estudos sobre a aplicação de ferramentas genômicas para seleção para resistência à infecção por *B. bovis* em bovinos da raça Angus, os quais acredita-se serem mais susceptíveis a infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A bovinocultura é um dos setores com maior destaque no agronegócio brasileiro. Estima-se que o setor de bovinocultura de corte gere, para o Brasil, um faturamento de mais de 50 bilhões de reais ao ano e cerca de 7,5 milhões de empregos (CEPEA, 2010). Cerca de um quarto do território nacional é ocupado pela pecuária (200 milhões ha) que apresenta um índice médio de produtividade de três arrobas/ha/ano (CNA, 2009). Este índice evoluiu significativamente nos últimos anos, porém, ainda é considerado baixo, indicando grande oportunidade de melhora na eficiência produtiva da atividade no país.

A bovinocultura enfrenta várias dificuldades devido às enfermidades infecciosas e parasitárias, que acometem os rebanhos causando redução na produtividade dos animais ou até morte destes e, conseqüentemente, prejuízos aos produtores. O carrapato *R. (B.) microplus* é o ectoparasita que causa o maior prejuízo aos pecuaristas brasileiros, principalmente quando se trata de raças européias criadas na região Sul do país (CAMILLO et al., 2009). Além da menor produtividade dos animais parasitados, como queda na produção de leite, no ganho de peso e danos ao couro, este parasita pode ainda ser vetor de homoparasitas, como *Anaplasma* spp e *Babesia* spp, causadores da Tristeza Parasitária Bovina - TPB (CORDOVÉS, 1997). No Brasil, a TPB é um complexo de doenças provocadas pelos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina* e pela rickettsia *Anaplasma marginale* (SACCO, 2001).

2.1 Babesiose bovina

A babesiose bovina é a doença de maior importância em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (SAHINDURAN, 2012). As fêmeas do carrapato infectam-se no momento do repasto sanguíneo, ao final do período parasitário. Os protozoários multiplicam-se em vários tecidos das teleóginas, inclusive nos ovários, estabelecendo a transmissão transovariana. *B. bovis* não persiste no carrapato como agente infeccioso além do estágio larval, já *B. bigemina* pode ser transmitida nos estágios de ninfas e adultos (RADOSTITS et al., 2008).

O ciclo de *B. bovis* compreende vários estágios que ocorrem tanto no carrapato, o qual atua como vetor para a infecção dos animais, quanto no bovino. Após a ingestão dos merozoítas junto com o sangue, inicia-se a fase sexuada do protozoário, ainda nos intestinos dos ácaros. As formas sexuadas podem invadir outras células, evoluindo para estágios uninucleados também considerados como gametas. Os gametas se unem, aos pares, para formar o zigoto, originando um cineto móvel, que se divide assexuadamente nas células epiteliais do intestino do carrapato, formando os esporocinetos. Estes invadem a hemolinfa e vários órgãos dos carrapatos, inclusive as glândulas salivares onde sofrem divisões assexuadas formando os esporozoítos (BOCK et al, 2004).

Os esporozoítos presentes na glândula salivar das larvas de carrapato, no momento do repasto sanguíneo, são transmitidos para os bovinos através da saliva. Estas formas evolutivas atingem a corrente sanguínea do bovino, penetrando nas hemácias sem que haja seu rompimento. Dentro da hemácia, os esporozoítos evoluem para trofozoítos, que se alimentam do conteúdo celular para, em seguida, multiplicarem-se assexuadamente originando os merozoítos. Estes rompem a hemácia parasitada e invadem outras íntegras para continuarem sua multiplicação (BOCK et al, 2004; UILENBERG, 2006).

Os sinais clínicos dos bovinos recém-infectados incluem prostração, seguida de febre e diarreia, levando o animal a um estado de desidratação. As mucosas tendem a ficar pálidas com o desenvolvimento da infecção, o pulso aumenta e a urina pode apresentar coloração escura (hemoglobinúria), principalmente na infecção por *B. bigemina*. Com o avanço da doença, a temperatura retal pode abaixar, no entanto, as mucosas apresentam-se esbranquiçadas e o animal permanece inapetente e com a frequência cardíaca acentuada (ANDREWS, et al 2013). Esse quadro clínico ocorre devido à anemia hemolítica desenvolvida no decorrer da infecção.

2.2 Prejuízos econômicos causados pela *B. bovis*

A infecção por *B. bovis* leva à debilidade dos animais infectados, culminando em redução da produção de leite, queda no ganho de peso e, pode-se observar ainda, abortos (RADOSTITS et al., 2000). Não só a queda de produção, mas os gastos com tratamentos dos animais com os sintomas clínicos e o controle do vetor, aumentam

os prejuízos causados por esta enfermidade. McLeod & Kristjanson (1999) desenvolveram um modelo com o qual calcularam, naquela época, que, a babesiose e a anaplasiose, custaram à pecuária bovina Australiana US\$16,9 milhões, com gastos com controle destas doenças, e US\$ 6,4 milhões, com as perdas, anualmente. O mesmo modelo demonstrou que no Quênia, Zimbábue, Tanzânia, África do Sul, China, Índia, Indonésia e nas Filipinas os custos foram, respectivamente, de 5,1, 5,4, 6,8, 21,6, 19,4, 57,2, 3,1 e 0,6 milhões de dólares, anualmente, demonstrando o quão impactante a babesiose pode ser na criação de bovinos em outras regiões do mundo.

2.3 Diagnóstico das babesioses

O diagnóstico da babesiose por meio de esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa é considerado como padrão ouro. No entanto, quando a parasitemia é baixa é difícil detectar os parasitas nas lâminas (BÖSE et al., 1995), tornando este método pouco eficiente. Ainda, tanto *B. bovis* quanto *B. bigemina*, apresentam considerável variação morfológica tornando difícil identificá-las e diferenciá-las nos esfregaços (CALLOW, 1984; DE VOS & POTGIETER, 1994). Como *B. bovis* possui predileção por capilares viscerais, é mais difícil encontrá-la nos esfregaços feitos com sangue dos vasos periféricos em comparação a *B. bigemina* (CALLOW et al., 1993).

Os testes mais comumente utilizados para detecção da infecção por babesias são o ELISA e os testes moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RADOSTITS, 2008).

Os testes sorológicos são ferramentas importantes para serem utilizadas em pesquisas epidemiológicas, pois indicam se os bovinos tiveram contato com os agentes de doença, por meio da detecção de anticorpos que são específicos e podem ser detectados no soro por longos períodos (MADRUGA et al., 2000). No entanto, os anticorpos não necessariamente indicam a situação atual da parasitemia, não sendo possível identificar se o título encontrado se refere a uma infecção atual ou prévia.

O diagnóstico molecular é realizado por técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), em que produzimos a amplificação de um fragmento específico de DNA. A PCR convencional e a Nested-PCR foram amplamente

utilizadas em estudos para detecção de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

A detecção molecular através da PCR em tempo real (qPCR) tem sido utilizada por ser uma técnica com boa especificidade e que permite a quantificação da infecção nos animais. Para o estudo da babesiose, a qPCR pode ser utilizada para diversas finalidades como diagnóstico, estudos genéticos quantitativos, de respostas a medicamentos e de prevalência. Bulling et al. (2007) desenvolveram uma técnica de qPCR para diagnóstico de *B. bovis* e *B. bigemina* e detectaram a infecção em equinos utilizando esta técnica. Em estudos com cães, esta técnica molecular foi utilizada para detecção de *Babesia* spp. (CAEIROS, 2012). Silva et al. (2013) utilizaram a qPCR para estudo de prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina* em búfalos na Ilha de Marajó-PA. Estudos quantitativos, com bovinos de diferentes raças têm utilizado a qPCR para quantificação de *B. bovis* e *B. bigemina* para comparação da taxa de infecção pelos parasitas e o grupo genético dos animais (BILHASSI et al., 2014; GIGLIOTI, 2013).

2.4 Situação das babesiose no Brasil

O Brasil é considerado um território de estabilidade enzoótica para a babesiose (KESSLER et al., 1983). No entanto, alguns estudos mostraram áreas de instabilidade enzoótica no país (PATARROYO et al., 1982; MADRUGA et al., 1984; MARTINS et al., 1994), como é o caso, por exemplo, da Região Sul.

As áreas com ocorrência de babesia são classificadas em áreas de estabilidade ou instabilidade endêmica, determinadas de acordo com a presença do carrapato *R. (B.) microplus* ao longo do ano (MAHONEY & ROSS, 1972). A estabilidade ocorre nas áreas onde a presença do carrapato é constante e, assim, a primeira infecção ocorre nos bezerros muito jovens e os adultos são constantemente infestados e infectados. A instabilidade ocorre nas regiões onde o carrapato não está presente nos meses frios e, portanto, os animais jovens não sofrem infecção e os adultos não reforçam sua imunidade com constantes infestações. Nas regiões com instabilidade endêmica a exposição dos animais a carrapatos infectados por babesia pode desencadear graves surtos (De WAAL, 1996), uma vez que esses não estão adequadamente imunizados.

Segundo estimativas de Mahoney (1974) se pelo menos 75% dos animais com idade entre 6 a 9 meses forem expostos a infecção por *B. bovis* a incidência da doença será baixa e uma situação de estabilidade endêmica poderá ser determinada.

A região Sul do Brasil apresenta invernos mais rigorosos, com temperaturas mínimas mais baixas que as demais áreas do país. As populações de carrapatos encontram-se baixas nesta época do ano e, em temperaturas abaixo de 20°C, os ovos postos pelas teleóginas não apresentam infecção pelas babesias, pois ocorre inibição da multiplicação desse agente no carrapato (GONÇALVES, 2000).

2.5 Resistência e controle

Sabe-se que os animais *Bos taurus* apresentam maior susceptibilidade à infestação por carrapatos quando comparado aos animais *Bos indicus*. Dessa forma, em animais de raças cruzadas, quanto maior a proporção de *Bos taurus* no cruzamento, maior a susceptibilidade deste rebanho ao carrapato (LEMOS et al., 1985; OLIVEIRA & ALENCAR, 1987; OLIVEIRA et al., 1989; OLIVEIRA & ALENCAR, 1990; SILVA et al., 2007). Essa maior resistência dos animais zebuínos motivou a substituição de animais puros taurinos por bovinos *Bos indicus* e cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus* em locais com alta infestação de carrapatos na Austrália (JONSSON, 2006).

Com relação à babesiose, ainda não se sabe ao certo qual a influência da raça no nível de infecção pelo hemoparasita, mas acredita-se que segue o mesmo comportamento da resistência aos carrapatos, com animais taurinos apresentando maior susceptibilidade à infecção (BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999). Foi verificada maior resistência a babesiose em animais zebuínos e animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*), quando comparado aos animais taurinos puros, gerando grande interesse sobre quais fatores estão envolvidos nestas diferenças (JONSSON et al., 2008). Estudos desenvolvidos mostraram que há maior resistência, tanto a carrapatos, quando à babesiose, em animais *Bos indicus* quando comparado aos animais *Bos taurus* (JONSSON et al., 2008; PIPER et al., 2010). Aguirre et al. (1990) também observaram menor parasitemia em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, ambos criados nas mesmas condições de pasto.

Oliveira et al. (2008), em um estudo com *B. bigemina*, avaliaram três grupos bovinos, *Bos indicus* e os demais cruzamentos de *Bos indicus* x *Bos taurus*, e não verificaram diferenças na frequência do parasita nos diferentes grupos genéticos e categorias dos animais. Bilhassi et al. (2014) trabalharam com bovinos de três grupos de genéticos: Nelore, Angus e o cruzamento das duas raças e observaram prevalências de infecção por *B. bovis* de 96%, 100% e 98% respectivamente, não tendo sido verificada diferença significativa na frequência da infecção entre os grupos. No entanto, neste mesmo estudo, os autores verificaram que o nível de parasitemia detectado pela qPCR nos animais Angus era maior que os observados para os animais Nelore e os cruzados, sugerindo a influência da raça. Giglioti (2013) verificou em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos (Angus, Senepol, Senepol x Nelore, Simangus e Simental) que a variação da parasitemia por *B. bovis* foi independentemente do grupo genético ao qual os animais pertenciam, levando à suposição de que esta variação esteja relacionada não apenas à raça, mas também ao manejo dos animais, condições ambientais e clima.

O controle da infecção por babesia nos rebanhos bovinos pode ocorrer através de vacinação dos animais, premunicação, quimioprofilaxia ou utilização de carrapaticidas para o controle do vetor. A vacinação encontra-se em fase experimental no Brasil, portanto não é ainda comercializada. Apesar dos trabalhos já realizados apresentarem sucesso limitado, alguns pesquisadores acreditam que a vacina só será produzida através de clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, ou pela síntese bioquímica de polipeptídeos (GONÇALVES, 2000). Machado et al. (1999) observaram que antígenos purificados a partir de proteínas de roptrias de *B. bigemina* poderiam induzir imunidade protetora nos animais. No entanto, encontra-se dificuldade em se obter estas proteínas nativas em quantidades suficientes para produzir vacinas para comercialização.

A premunicação consiste em inocular sangue de um animal portador de *B. bovis* em animais susceptíveis e, em seguida, submetê-los a tratamento utilizando-se drogas específicas (GONÇALVES, 2000). A finalidade desta prática é promover o desenvolvimento de imunidade contra a hemoparasitose. No entanto, a variabilidade da infectividade dos parasitas recuperados, a severidade da infecção produzida por algumas amostras e a dificuldade de se controlar os sinais clínicos por meio de

medicamentos foram alguns dos problemas relatados com relação ao uso deste tipo de imunização (CALLOW & TAMMEMAGI, 1967).

A quimioprofilaxia consiste na aplicação estratégica de subdoses de medicamentos permitindo que o animal adquira a infecção sem desenvolver sinais clínicos graves. Este procedimento mantém a infecção por babesias em níveis subclínicos, persistindo assim o estado de portador. Um dos problemas é que todo medicamento pode gerar o desenvolvimento de resistência a antibióticos e a seleção de outros patógenos mais resistentes, por exemplo, a *Escherichia coli* (HIRSH et al., 1974). Com as dificuldades encontradas no uso de vacinas, premunição e profilaxia, o uso de carrapaticidas é o método mais empregado para controle do vetor e consequentemente da babesia. Os agentes químicos dos carrapaticidas podem deixar resíduos na natureza, causando impactos ambientais, e seu uso indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de resistência pelos carrapatos.

As dificuldades para se obter o controle da babesiose nas criações de bovinos, os problemas com resistência aos agentes químicos utilizados para controle do carrapato e a possibilidade de variação genética quanto à resistência aos hemoparasitas colocam a seleção como um interessante método de controle desta hemoparasitose. As características que indicam a resistência a ectoparasitas são de difícil e onerosa mensuração, e, portanto, seleção pelo fenótipo torna-se difícil e demorada. Nestas situações, para o melhoramento, as ferramentas genômicas podem ter um papel fundamental.(MEUWISSEN et al., 2001).

2.6 Seleção Genômica e GWAS

A seleção genômica é feita utilizando-se painéis de marcadores moleculares na forma de polimorfismos de único nucleotídeo, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs). A maioria dos SNPs geralmente não exerce efeito direto na característica em estudo. No entanto, um polimorfismo que afete a característica estudada estará localizado próximo a um ou mais SNPs, uma vez que para a formação dos painéis, são selecionados SNPs distribuídos por todos os cromossomos com moderada a alta densidade. Polimorfismos localizados próximos um ao outro podem segregar juntos formando haplótipos e, devido à estrutura populacional, em muitos casos encontram-se em desequilíbrio de ligação (DL). Assim, para cada polimorfismo

que possa influenciar uma característica é provável que haja um ou mais SNPs localizados próximos, em DL com este polimorfismo, que possam ser associados ou correlacionados com a característica (GODDARD et al., 2009).

As tecnologias de genotipagem com painéis de marcadores moleculares de alta densidade têm como finalidade possibilitar a identificação de marcadores SNP associados a cada QTL (locos de características quantitativas) envolvido em uma determinada característica baseado no princípio de que ao menos um SNP esteja em DL com cada QTLs (VAN EENENNAAM et al., 2014). Essa pressuposição só é válida quando a probabilidade de recombinação entre marcador e QTL é muito baixa. Quanto maior o DL entre marcador e QTL, mais os marcadores conseguem explicar a variabilidade genética devida aos QTLs na característica de interesse. Os efeitos estimados dos marcadores são válidos para toda a população avaliada e não apenas dentro de famílias como ocorre em esquemas de seleção assistida por marcadores baseados em análises de ligação (GODDARD & HAYES, 2007).

Experimentos para testar a associação entre uma característica e painéis compostos por SNPs em alta densidade são chamados de “Estudos de associação genômica ampla” (GWAS) (GODDARD et al., 2009). Nestes estudos não é necessário conhecimento prévio profundo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na manifestação da característica investigada (HAYES, 2011). A técnica de GWAS pode ser utilizada para vários propósitos, como encontrar genes e polimorfismos que afetam uma determinada característica, prever o valor genético e fenotípico para a característica ou prever o risco de desenvolvimento de doenças, baseado na identificação por marcadores genéticos (GODDARD et al., 2009). O diagnóstico precoce de doenças ou a identificação precoce de polimorfismos que prejudiquem uma determinada característica de interesse podem simplificar o manejo dos animais evitando perdas de produção.

A resistência a carrapatos ou a resistência a infecção por *B. bovis* são características de difícil e onerosa mensuração e estão relacionadas a adaptação dos animais ao clima do país. Animais taurinos são menos adaptados ao clima e aos ectoparasitas no Brasil do que os animais zebuínos (CUNDIFF, 2004), exigindo maiores cuidados com as condições de criação. A seleção convencional para resistência a carrapatos e, conseqüentemente, às parasitoses transmitidas por eles,

requer que os animais sejam desafiados por infestação natural ou artificial para que seja avaliada a variabilidade de infestação entre os bovinos. No entanto, a infestação por carrapatos leva a prejuízos econômicos, tornando-se difícil a condução da seleção convencional. Outro fator limitante da seleção convencional é a baixa herdabilidade dessa característica (CARDOSO et al., 2006), resultando em baixa acurácia de predição dos valores genéticos.

A GWAS pode ser uma boa alternativa para identificação de regiões do genótipo que afetam a resistência ao carrapato ou a *B. bovis* e, através do uso de informações moleculares, acelerar o progresso genético destas características. Em estudos realizados com seis diferentes raças de gado de leite, diversas regiões genômicas, localizadas em mais de 13 cromossomos foram identificadas com a utilização de um chip de 10000 SNPs e associadas à infestação por carrapatos. No entanto, a maioria dos SNPs explicavam uma baixa proporção da variação da característica nos animais, provavelmente, pelo uso de um chip de baixa densidade de marcadores, sugerindo que os estudos sejam conduzidos com chips de maior densidade (BARENDSE, 2007; TURNER et al., 2010).

Considerando-se o impacto econômico na pecuária bovina e as dificuldades de controle da babesiose e seu vetor, o estudo da viabilidade de utilização de métodos de diagnóstico sensíveis como a qPCR é importante para o controle da doença nos rebanhos. Diante da dificuldade de selecionar animais por métodos de seleção convencionais, utilizando apenas informações fenotípicas, para resistência ao carrapato *R. (B.) microplus* e para as características associadas ao nível de infecção por *B. bovis* considera-se como boa alternativa a utilização de informações moleculares para acelerar o progresso genético destas características, sendo de grande importância a condução de projetos de estudo genômico do nível de infecção por *B. bovis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a variação genética e identificar regiões do genoma bovino com efeito sobre o nível de infecção por *Babesia bovis* e contagem de carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) em bovinos da raça Angus visando auxiliar a seleção para resistência ao carrapato e à babesiose.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar pela técnica molecular de q PCR o número de cópias de DNA de *B. bovis* em amostras de sangue de bovinos da raça Angus;
- Quantificar a infestação por carrapatos por meio de contagem em bovinos da raça Angus sob infestação natural.
- Estimar parâmetros genéticos para a característica infecção por *B. bovis* e contagem de carrapatos na raça Angus;
- Conduzir estudos de associação genômica ampla visando identificar regiões do genoma que contribuam para a variação do nível de infecção por *B. bovis*, e da contagem de carrapatos em bovinos da raça Angus;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e características avaliadas

Os animais utilizados no presente trabalho eram fêmeas bovinas da raça Angus, pertencentes ao rebanho da “Fazenda Santa Helena” da empresa “GAP Genética” localizada na cidade de Uruguaiana no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Os 355 animais estudados nasceram em janeiro de 2013 e eram filhos de 38 touros.

O Rio Grande do Sul é uma região de instabilidade endêmica para a ocorrência de babesiose bovina, devido aos períodos de baixa ou nenhuma infestação por carrapatos, decorrentes do clima subtropical predominante na região. Dessa forma, o manejo de controle parasitário dos animais é moldado para tentar contornar a ausência de infestação nos períodos de outono e inverno, quando o frio é muito intenso na região. Periodicamente, teleóginas são colhidas em animais de outras propriedades da Empresa, onde a infestação é maior. Essas fêmeas de carrapatos são distribuídas nas pastagens para compensar os baixos níveis de infestação, realizando, desta forma, um controle estratégico da babesiose.

Foram realizadas duas colheitas, tanto de sangue quanto de contagem de teleóginas, com intervalo de dois meses entre elas. Na primeira colheita realizada nos dias 15 e 16 de janeiro, no período da manhã e da tarde, os animais estavam com 12 meses de vida. Na segunda colheita, realizada nos dias 6, 7 e 8 de março, apenas no período da manhã, os animais estavam com 14 meses. Essas fases compreendem o período de sobreano dos animais, momento que estão iniciando a vida reprodutiva.

4.1.1 Contagem de carrapatos

As contagens de carrapatos *R. (B.) microplus* foram realizadas seguindo a metodologia de Utech et al. (1978) e Hermans et al. (1994), contando-se todos os carrapatos com tamanho superior a 4,5 milímetros (mm) presentes no lado esquerdo de cada animal.

4.1.2 Colheita de sangue

Foram obtidas amostras de sangue da veia caudal de cada animal, em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), com agulhas

acopladas a sistema a vácuo, simultaneamente às contagens de carrapatos. Os tubos foram identificados com o número de cada animal, acondicionados em isopor com gelo e transportados ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos – São Paulo (SP) para desenvolvimento das análises.

4.2 Extração de DNA

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA usando o Easy – DNA™ Kit - For genomic DNA isolation (catalog no. K1800-01Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, com pequenas modificações. O DNA foi obtido a partir de 300 µL de sangue de cada animal. As modificações foram nos volumes de cada uma das soluções utilizadas, sendo 400 µL de solução A, 800 µL de clorofórmio, e após adição de etanol absoluto (-20°C), as amostras foram mantidas *overnight* (18 horas) em freezer a -4°C. Por fim, cada amostra de DNA foi ressuspensa em 200 µL de Tris-EDTA (TE).

4.3 Quantificação de *B. bovis* pela técnica de qPCR

As quantificações de DNA de *B. bovis* foram feitas empregando-se a técnica de qPCR de acordo com a descrição de Buling et al. (2007). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a quantificação do DNA de *B. bovis* foram sequências que flanqueiam o fragmento do gene do citocromo B (mt-cyt B), que produz *amplicons* com 88 pares de bases. As sequências são mostradas no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências que flanqueiam o fragmento do gene do citocromo B (mt-cyt B) de *Babesia bovis*, com 88 pares de bases, utilizadas como oligonucleotídeos iniciadores, direto (F Cbosg-1) e reverso (R Cbosg-2), na técnica de qPCR para quantificação de *Babesia bovis*.

	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
<i>B. bovis</i>	F Cbosg-1(direto)	TGTTCTGGAAGCGTTGATTC	88
	R Cbosg-2(reverso)	AGCGTGAAAATAACGCATTGC	

O equipamento utilizado para as quantificações de qPCR foi o “CFX™ Real – Time PCR Detection Systems” da BioRad e o reagente utilizado nas reações foi o “SsoFast™ EVAGREEN® Supermix da BioRad™. Este reagente contém todos os reagentes necessários para a qPCR, exceto os oligonucleotídeos iniciadores da sequência alvo, o DNA da amostra e a água (água miliQ autoclavada). Foram utilizadas tiras de tubos brancos (Low-Profile 0,2 ml 8-Tube Strips without Caps ref. TLS-0851, BioRad) e tampas óticas transparentes (Optical Flat 8-Cap Strips, ref. TCS-0803, BioRad) para as reações de qPCR.

4.3.1 Padronização da técnica de qPCR para detecção de *B. bovis*

A padronização da técnica de qPCR utilizada neste trabalho, a mesma utilizada por Giglioti (2013), foi realizada utilizando-se amostras de isolados de *B. bovis* cedidas pela Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado, responsável pelo laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da Unesp – Jaboticabal-SP. Os isolados são mantidos por meio da passagem em bezerros esplenectomizados, por aproximadamente 26 anos, a partir de uma amostra fornecida pelo instituto Desiderio Finamor. Os ciclos adotados nas reações foram os indicados pelo fabricante com algumas modificações e são mostrados no Quadro 2.

Quadro 2. Ciclos padronizados na reação de qPCR para amplificação de *B. bovis* nas amostras de DNA genômico dos animais Angus.

Etapa do Ciclo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação Enzimática	1	98°C	2 minutos
Desnaturação	44	98°C	8 segundos
Anelamento/Extensão		60°C	30 segundos
Curva de Dissociação	1	65°C a 95°C (Incremento 0,5°C)	5 segundos/passos

Todas as reações foram preparadas no volume final de 12 µL (5,0 µL do reagente EVAGREEN®, 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores

(concentração de 0,25 μ M cada), 4,4 μ L de H₂O ultrapura autoclavada e 2 μ L de DNA do animal).

4.3.1.1 Otimização da reação de qPCR

Foram realizados testes para verificar se as amostras de DNA deveriam ou não ser diluídas. Verificou-se que as amostras não diluídas apresentavam C_q antecipado, ou seja, um número menor de ciclos é necessário para detecção da amplificação de *B. bovis* na amostra, e tanto as amostras diluídas quanto as não diluídas apresentaram curva de dissociação semelhantes (Figura 1). Assim, todas as reações de qPCR desse experimento foram feitas usando o DNA genômico total, extraído de 300 μ L de sangue.

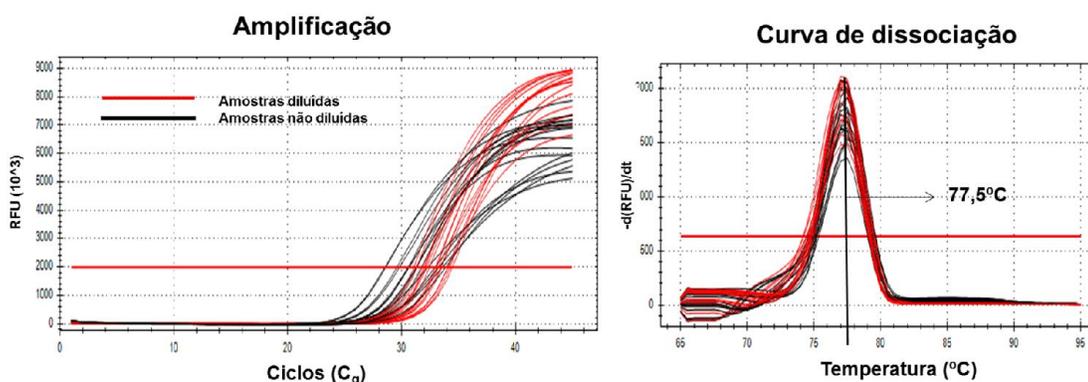


Figura 1. Ciclos de amplificação de *B. bovis* em amostras de DNA genômico diluídas e não diluídas. Observa-se que as amostras não diluídas apresentaram C_q antecipado com relação às amostras diluídas. A curva de dissociação de ambas as amostras foi semelhante (Temperatura de dissociação = 77,5°C).

Para comprovação da especificidade do teste, em todos os ciclos de amplificação foi utilizado um controle positivo para *B. bovis*, certificando que o fragmento amplificado era deste agente. Em todas as reações houve amplificação do controle positivo e a curva de dissociação foi semelhante para todas as amostras. Utilizaram-se controles negativos (NTC) em todos os ciclos de amplificação para verificar a ocorrência de contaminação por *B. bovis* em algum dos compostos ou materiais utilizados. O NTC era composto por todos os componentes da reação, com

exceção das amostras de DNA. Em todas as reações não houve amplificação do NTC. Está apresentado na Figura 2 a amplificação do controle positivo e a não amplificação do NTC em uma reação de qPCR.

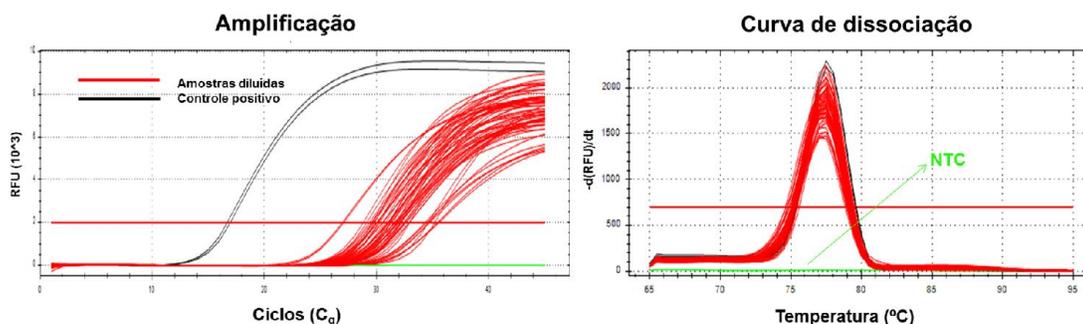


Figura 2. Amplificação do controle positivo para *B. bovis* na reação de qPCR, com as amostras de DNA, comprovando a especificidade do teste. Observa-se que as curvas de dissociação foram semelhantes para as amostras e o controle positivo. Observa-se também que não houve amplificação do NTC (verde).

4.3.1.2 Cálculo da eficiência dos ensaios

Descrita por Pfaffl (2001) e Vandesompele et al. (2002), a eficiência da reação (E) demonstra o quanto de DNA alvo está sendo produzido após cada ciclo da reação de amplificação. Uma eficiência de 100% determina que o DNA está sendo duplicado a cada ciclo e é o ideal que se busca em uma reação.

Nas reações, a eficiência foi definida através da curva de calibração, montada a partir de diluições seriadas de uma amostra representativa (G-BLOCK®). O software do equipamento CFX96 da BioRad realiza o cálculo da eficiência, automaticamente, em cada uma das reações. O cálculo é feito através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

- slope: inclinação da linha derivada da curva de calibração

Em seguida a eficiência é convertida em porcentagem:

$$\%E = (E-1) \cdot 100$$

Os resultados foram definidos com base nos valores de C_{qs} obtidos para cada amostra nas reações. O C_q determina o momento da reação em que a amplificação do fragmento alvo atinge a fase exponencial. Assim, neste ponto, é possível

quantificar a taxa de infecção por *B.bovis* no animal. O ponto exato do C_q no gráfico, tanto das amostras quanto da curva de calibração, é definido pela linha de *threshold*. A linha *threshold* para as reações deste trabalho, com os reagentes e equipamentos utilizados, foi padronizada no valor de 2000 para todas as reações.

Nas reações de qPCR cada amostra de DNA genômico foi quantificada em duplicata. Foram utilizadas as médias entre os C_{qs} das duplicatas nas quais a diferença de C_q , entre uma e outra, foi menor que 0,5 ciclos. As amostras com diferença de C_q maior que 0,5, entre uma duplicata e outra, foram repetidas em uma nova reação.

4.3.1.3 Construção da curva de calibração a partir do gBlocks® Gene Fragments

A curva de calibração foi construída a partir da amostra representativa de gBlocks® Gene Fragments da Integrated DNA Technologies® (IDT). O gBlocks® contém a sequência alvo de *B. bovis* e, ainda, as extremidades aumentadas possibilitando um melhor cálculo do número de cópias. O fragmento possui 308 pares de bases com uma sequência parcial igual a do gene do citocromo b de *B. bovis* descrito por Buling et al. (2007). A sequência do fragmento de 308 pares de bases do gBlocks® sintetizado está representada no Quadro 3. A solução “mãe” foi obtida a partir de diluição do gBlocks®, seguindo as recomendações do fabricante, para obter uma solução de 5ng/μL.

Quadro 3. Sequência fragmento de 308 pares de bases do gBlocs® sintetizado para confecção da curva de calibração para *B. bovis*. Em negrito a sequência de 88 pares de bases de *B. bovis*.

Sequência do fragmento gBlocs® sintetizado
5' – TAC TAT CAG GAC TTT TGT TGA CAT TTT ATT ATG TTC CTG GAA GCG TTG ATT CTT TTG AAT GTG TAA TTA GAG TGC TTG CTG AAG TCA ATA TGG GTT GGC CAA TGC GTT ATT TTC ACG CTC AAT GTG TTT CTT TTT GCT TCT TTT TCA TGA TTT TTT TTA CCA GCG GGT GAG GAG CAA GAA TTT GGC AAG GCA GCA GCT TGG GGT CTA GCA GGC TTC AAG CGT ACA GTG GAT GAA AGC CTG GAG ATG TTA GAC CGA GGC ATG CAC ATG CTC GCG GAA GGC CAG GCA CAG ATA TCA CAG GGG ATT GAA GC – 3'

Para definir qual intervalo de curva seria adequado para as amostras, as diluições foram testadas em uma reação, observando-se que as diluições 10^{-10} ($5 \cdot 10^{-10}$ ng/ μ L) a 10^{-3} ($5 \cdot 10^{-3}$ ng/ μ L) eram as adequadas para as reações deste experimento. Com estas diluições os valores de C_q ficaram entre os ciclos 15 e 38. Em todas as reações foi utilizada esta curva de calibração, que está representada na Figura 3.

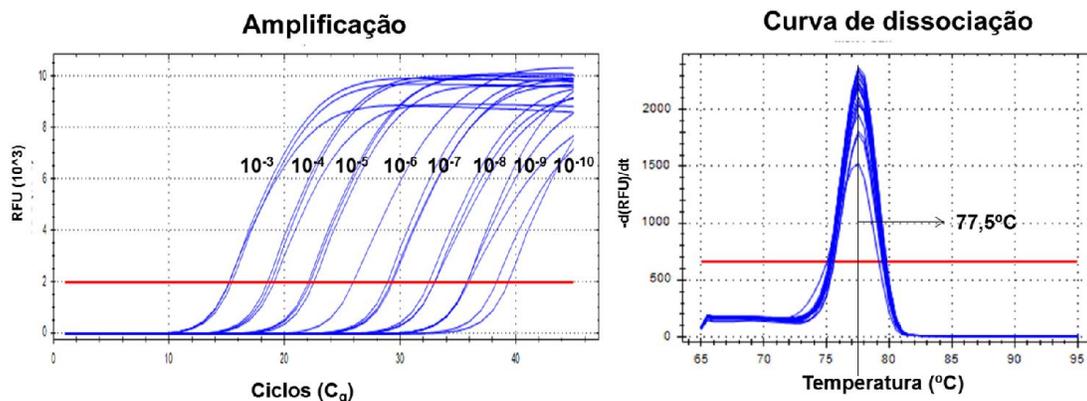


Figura 3. Curva de calibração, construída a partir do fragmento gBlocks®, utilizada nas reações de q PCR para quantificação de *B. bovis*.

As amostras de DNA genômico dos animais, em todas as reações realizadas, apresentavam-se dentro do intervalo 10^{-3} a 10^{-10} da curva de calibração. Na Figura 4 está representada uma das reações com as amostras e a curva de calibração.

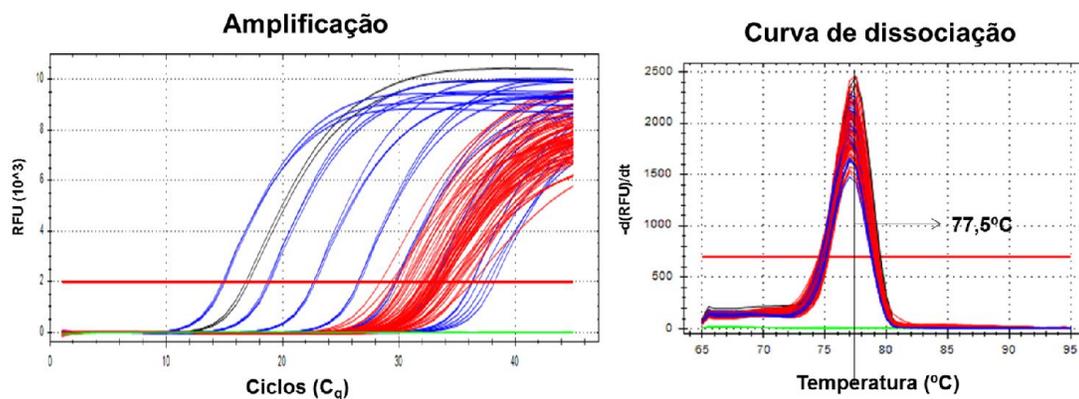


Figura 4. Reação com as amostras de DNA genômico e a curva de calibração (10^{-10} a 10^{-3}). As amostras estão dentro do intervalo da curva de calibração.

4.3.1.4 Cálculo do número de cópias

Para calcular o número de cópias (NC) de moléculas foi utilizada a fórmula descrita por Ke et al. (2006):

$$\frac{6 \times 10^{23} \times [] \text{ produto (g/ } \mu\text{L)}}{\text{Peso molecular (g/mol)}}$$

- 6×10^{23} : refere-se ao número de Avogadro;

- [] produto: refere-se a qual concentração se encontra o produto (neste caso, o gBlocks®) utilizado para sintetizar a curva de calibração, na diluição determinada como referência;

- Peso molecular: refere-se ao peso molecular médio da molécula do nucleotídeo fita dupla, multiplicado pelo tamanho do fragmento do produto utilizado para sintetizar a curva de calibração (neste caso, o gBlocks®);

Utilizou-se a diluição de 10^{-10} (menor diluição da curva de calibração) para determinar o número de cópias de moléculas na reação. Nesta diluição a concentração do produto gBlocks® foi de 5×10^{-19} g/ μ L. O peso molecular foi definido multiplicando-se 660 (peso molecular do nucleotídeo de fita dupla de *B. bovis*) por 308 (tamanho do fragmento sintetizado do gBlocks®). A fórmula final está descrita a seguir:

$$\frac{6 \times 10^{23} \times 5 \times 10^{-19} \text{ (g/ } \mu\text{L)}}{660 \times 308 \text{ (g/mol)}} = 1,475 \text{ cópias/} \mu\text{L}$$

Determinou-se que há 1,475 cópias da molécula, em um microlitro de DNA genômico, na diluição de 10^{-10} da curva de calibração. Como foi utilizado neste experimento, dois microlitros de DNA genômico, por reação, por amostra, multiplicou-se esse valor por dois. Desta forma, obteve-se o valor de, aproximadamente, 3 cópias da molécula.

O número de cópias determinado foi utilizado pelo software do equipamento CFX96 da BioRad para calcular o NC inicial de cada uma das amostras analisadas.

4.4 Genotipagem

Todos os animais do experimento foram genotipados com o chip Gene Seek™ Genomic Profiler Bovine150K da Illumina®.

4.4.1 Preparação das amostras para envio ao Laboratório de genotipagem

As amostras de DNA genômico foram enviadas ao Laboratório Neogen do Brasil®, para genotipagem, em microplacas tampadas. Cada amostra de DNA genômico, extraída segundo a metodologia descrita na seção 4.2, de cada animal, foi pipetada em um respectivo poço da microplaca em um volume que totalizasse a concentração de 300ng de DNA genômico. Para certificar que haveria esta quantidade, quantificou-se o DNA total presente em cada amostra em um espectrofotômetro e, a partir dos valores observados, calculou-se qual volume de amostra seria necessário colocar em cada poço da microplaca.

Pipetado todo o DNA, as placas foram levadas para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal, para serem liofilizadas. Após a liofilização as microplacas foram tampadas e encaminhadas ao Laboratório Neogen do Brasil®.

4.4.2 Genotipagem

A genotipagem dos animais foi realizada com o chip *Gene Seek Genomic Profiler™* (GGP-HD) da Illumina Infinium® de 150000 SNPs pelo Laboratório Neogen do Brasil®.

4.5 Análise dos resultados da genotipagem

4.5.1 Controle de qualidade dos genótipos

O controle de qualidade dos genótipos foi feito com o software estatístico R *studio*, utilizando-se o pacote *snpStats*. Após o controle de qualidade dos genótipos o arquivo modificado foi utilizado para o estudo de seleção genômica.

Para controle de qualidade das amostras foi definido o limiar de *Call rate das amostras threshold* (>0,9) e, aquelas abaixo deste valor, foram excluídas. Para o

controle de qualidade dos SNPs foram definidos os seguintes limiares: *Call rate* (>0,92), *MAF* (frequência do alelo menos frequente) (>0,02) e os SNPs em que o teste para equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi significativo ($p < 0,00001$). O controle de qualidade dos genótipos foi realizado de forma iterativa pelo *software* estatístico *R studio*, tendo sido definida a quantidade de cinco iterações.

4.5.2 Imputação

Com a finalidade de minimizar a perda de SNPs que, por deficiência no processo de genotipagem não foram lidos em alguns animais, foi realizada imputação de genótipos faltantes, baseando-se nos genótipos lidos nos demais animais. Os arquivos foram preparados para imputação com o *software* estatístico *R studio*, utilizando-se os comandos dos pacotes *snpStats* e *stringr*, e a imputação de genótipos foi feita com o *software Fimpute*.

4.5.3 Obtenção dos parâmetros genéticos

Para estimação dos parâmetros genéticos necessários para as análises de associação genética ampla, aplicou-se a inferência bayesiana em uma análise bi-característica sob modelo animal, com medidas repetidas (nas duas colheitas) que incluiu como efeito sistemático de ambiente o grupo de contemporâneos. Como os animais eram todas fêmeas nascidas e criadas na mesma fazenda e na mesma safra e época, apenas as diferenças relativas ao grupo de manejo foram consideradas para definição do grupo de contemporâneos. O *software* GIBBS2F90 (MISZTAL et al, 2009) foi utilizado.

4.5.4 Estudo de associação genômica ampla

O estudo de associação genômica ampla foi conduzido separadamente para cada característica (infestação por *R. (B.) microplus* e infecção por *B. bovis*), utilizando o método denominado “Single Step Genomic BLUP” (ssGBLUP), proposto por WANG et al. (2012), sob o seguinte modelo:

$$y = X\beta + Z_a a + e$$

- y : vetor de observações fenotípicas (contagem de carrapatos e nível de infecção por *B. bovis* em escalas transformadas em $\text{Log}_{10}(n+1)$);
- X : matriz de incidência que relaciona os fenótipos aos efeitos fixos;
- β : vetor de efeitos fixos
- Z_a : matriz de incidência que relaciona os animais aos fenótipos;
- a : vetor de efeitos genéticos aditivos diretos de cada animal;
- e : vetor de resíduos;

As variâncias de a e e foram consideradas como $H\sigma_a^2$ e $I\sigma_e^2$, respectivamente e a covariância foi assumida como sendo zero. Assim, a matriz foi montada segundo descrito por AGUILAR et al., 2010:

$$\text{var} \begin{bmatrix} a \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} H\sigma_a^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

- σ_a^2 : variâncias genética aditiva direta;
- σ_e^2 : variância residual;
- H : matriz que combina as informações de pedigree e genotípicas;
- I : matriz de identidade;

O modelo utilizado para o ssGBLUP equivale a aplicar as equações de modelos mistos da análise genética tradicional substituindo a matriz A^{-1} pela matriz H^{-1} (AGUILAR et al., 2010; CHRISTENSEN & LUND, 2010), sendo:

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

- A^{-1} : inversa da matriz de numeradores do coeficiente de parentesco genético aditivo;
- G^{-1} : inversa da matriz de parentesco genômico dos animais genotipados;
- A_{22}^{-1} : bloco da matriz A^{-1} referente aos animais genotipados;

As soluções dos efeitos dos SNPs (\hat{u}) foram obtidas com os seguintes passos (VANRADEN et al., 2009; STRANDEN E GARRICK, 2009):

- 1) Determinando que: $t = 0$; $D_{(t)} = I$, $G_{(t)} = ZD_{(t)}Z'\lambda$;

- 2) Computar \hat{a}_g com o ssGBLUP;
- 3) Calcular $\hat{u}_{(t)} = \lambda D_{(t)} Z' G_{(t)}^{-1} \hat{a}_g$;
- 4) Calcular $d_{i(t+1)}^* = \hat{u}_{i(t)}^2 2p_i(1-p_i)$ para todos os SNPs (Zhang *et al.*, 2010);
- 5) Normalizar $D_{(t+1)} = (\text{tr}(D_{(0)}) / \text{tr}(D_{(t+1)}^*)) D_{(t+1)}^*$;
- 6) Calcular $G_{(t+1)} = Z D_{(t+1)} Z' \lambda$
- 7) $t = t + 1$;

A análise foi desenvolvida utilizando-se os *softwares* RENUM, preGSf90, blupf90 e postGSf90, nesta ordem, sendo que cada software realizou um ou mais dos passos para obtenção de \hat{u} . Cada uma das análises gerou um cartão de parâmetros, que foi utilizado na análise seguinte, e os dados e resultados para realização e conclusão da análise de associação. Com o software RENUM foi organizado o arquivo com os dados.

Na análise do software preGSf90 (passo 1) as matrizes necessárias para o cálculo da matriz inversa H^{-1} , que são as matrizes inversas G^{-1} e A_{zz}^{-1} , foram montadas. Com o *software* Blupf90 foram obtidas as soluções dos valores genéticos dos animais, que são β e \hat{a} (passo2). Com o *software* postGSf90 o valor genético dos animais foi convertido em soluções de SNPS e os efeitos de cada SNPS foram calculados (passo 3). Nos passos de 4 a 6 foi desenvolvida uma iteração onde uma nova matriz inversa G^{-1} é calculada. Ao final dos cinco passos obteve-se os arquivos de dados utilizados para determinação das janelas mais significativas e montagem dos *manhattan plot*.

Foram realizadas três iterações (w_1 , w_2 , w_3) das análises sendo que, na primeira iteração, os SNPs não foram ponderados, ou seja, foram considerados igualmente importantes dentro da análise. Ao final da primeira iteração (w_1) foram gerados ponderadores, para cada um dos SNPs, os quais foram utilizados para calcular o *wei*, no programa estatístico *R studio*, gerando um cartão de parâmetros que foi utilizado na iteração seguinte (w_2). O mesmo ocorreu da iteração w_2 para w_3 . Com o *wei* dos SNPs foram repetidas as análises a partir da análise do programa preGSf90.

Ao final das três iterações, foram gerados os *Manhattan plot* de cada uma delas, com as janelas mais significativas da variação genotípica de cada uma das características analisadas (contagem de carrapatos e número de cópias de *B. bovis*).

Esta análise foi realizada com o *software* estatístico *R studio*, com os comandos dos pacotes *gtools* e *Cairo* e as janelas analisadas foram janelas de 1Mb.

4.5.5 Identificação de regiões cromossômicas significativas relacionadas às características de resistência a carrapato e infecção por *B. bovis*

Os SNPs com efeitos mais significativos nas características estudadas foram utilizados para a identificação de regiões significativas em cromossomos.

A análise foi realizada com a inspeção das janelas (1 Mb) com os SNPs mais significativos de cada pico, observadas nos *Manhattan plots* de cada uma das iterações.

4.5.6 Análise no banco de dados *Animal QTLdb*

Os cromossomos e janelas identificados nas três iterações foram analisados utilizando-se o banco de dados *Animal QTLdb*. Em cada janela foi observado se já foram relatados QTLs de características relacionadas às estudadas ou de outras características relacionadas às estudadas no presente trabalho.

Foi observado se haviam QTLs, em outras regiões cromossômicas, descritos no banco de dados relacionados à resistência ao *R. (B.) microplus* ou à infecção por *B. Bovis*, como infestação por outros ectoparasitas ou infecções por outros hemoparasitas.

5 RESULTADOS

5.1 Contagem de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*

Para a realização das análises estatísticas os dados das contagens de *R. (B.) microplus* foram transformados em $\log_{10}(n+1)$, visando aproximar a distribuição dos dados da Normal.

Quadro 4. Médias, desvios padrão (DP) e os valores de máximo e mínimo das contagens de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dos dados originais e transformados em $\text{Log}_{10}(n+1)$.

Carrapatos			
Dados originais			
	Colheita 1	Colheita 2	Total
Médias	50,5	140,6	95,7
DP	28,8	54,8	62,8
Máximo	186	306	306
Mínimo	4	10	4
Dados transformados			
	Colheita 1	Colheita 2	Total
Médias	1,6	2,1	1,9
DP	0,2	0,2	0,3
Máximo	2,27	2,48	2,48
Mínimo	0,69	1,04	0,69

As médias das contagens de carrapatos foram maiores na segunda colheita (Quadro 4).

5.2 Quantificação de *B. bovis* pela técnica de qPCR

Foram realizados 25 ensaios de qPCR para determinação do número de cópias para *B. bovis*. As eficiências de todas as placas, calculadas automaticamente pelo software do equipamento CFX96 da BioRad, apresentaram-se entre 95-105% (intervalo adequado para este parâmetro), ficando próximas de 100%, que é a eficiência ideal para a análise de quantificação. O slope de cada corrida ficou próximo do valor de 3,32 e todos os valores de R^2 foram maiores que 0,98. Estão

representados no Quadro 5 os valores de eficiência, slope, r^2 e o *y-intercept* de cada uma das placas de qPCR.

Quadro 5. Valores de Eficiência (E%), slope, r^2 e y-intercept (y-int) de cada um dos 25 ensaios de qPCR para quantificação de *B. bovis*.

Placa qPCR	E (%)	Slope	r^2	y-int
Placa 1	96,7	-3,403	0,995	41,026
Placa 2	101,8	-3,280	0,980	41,158
Placa 3	102,7	-3,259	0,988	41,536
Placa 4	95,7	-3,430	0,998	40,855
Placa 5	98,2	-3,367	0,990	40,907
Placa 6	97,4	-3,386	0,990	41,158
Placa 7	96,9	-3,399	0,981	42,048
Placa 8	102,9	-3,254	0,988	42,009
Placa 9	103,8	-3,235	0,976	40,138
Placa 10	102,0	-3,274	0,988	40,255
Placa 11	97,1	-3,394	0,998	40,878
Placa 12	99,4	-3,360	0,997	40,469
Placa 13	100,4	-3,312	0,994	40,310
Placa 14	99,4	-3,336	0,990	40,455
Placa 15	100,4	-3,312	0,991	40,364
Placa 16	100,3	-3,316	0,993	40,429
Placa 17	102,0	-3,275	0,985	40,253
Placa 18	98,2	-3,365	0,994	40,724
Placa 19	99,7	-3,330	0,994	40,691
Placa 20	100,5	-3,310	0,996	40,297

Placa 21	98,6	-3,356	0,998	40,663
Placa 22	100,2	-3,318	0,994	40,491
Placa 23	100,8	-3,303	0,996	40,236
Placa 24	99,9	-3,325	0,995	40,496
Placa 25	99,4	-3,336	0,997	40,632

Em todas as reações de qPCR foi utilizada curva de calibração com concentração máxima de $5 \cdot 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ de solução de gBlocks® e mínima de $5 \cdot 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$. Nestas concentrações os limites de cópias detectadas foram de, no mínimo, 3 cópias e, no máximo, 300.000.000 cópias. Dessa forma, quando a eficiência da reação é de 100%, para cada, aproximadamente, 3,32 ciclos (slope) há 10 vezes mais cópias de *B. bovis*. Está representado na Figura 5 a curva de calibração utilizada em todas as reações de qPCR com as concentrações máxima e mínima de detecção.

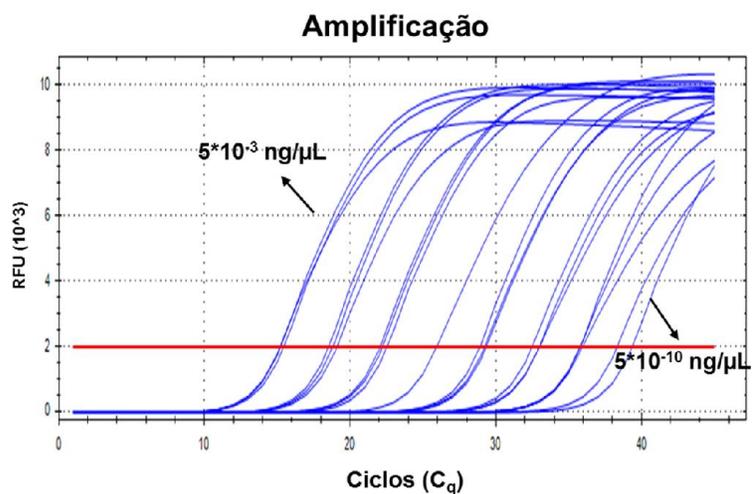


Figura 5. Curva de dissociação utilizada em cada uma das reações de qPCR com as concentrações máxima ($5 \cdot 10^{-12} \text{ grama}/\mu\text{L}$) e mínima ($5 \cdot 10^{-19} \text{ grama}/\mu\text{L}$), as quais equivalem a 300.000.000 e 3 cópias de *B. bovis*, respectivamente.

A temperatura da curva de dissociação das amostras foi de $77,5^\circ\text{C}$, assim como a temperatura de dissociação do isolado de *B. bovis*, utilizado como controle positivo,

e das amostras diluídas da curva de calibração montada a partir do gBlocks®, demonstrando a especificidade da reação para o agente.

O animal com maior número de cópias, na colheita 1, apresentou 375000 cópias de *B. bovis*, enquanto que, na colheita 2, o animal com maior número de cópias apresentou 9330 cópias. O animal com menor número de cópias apresentou 0,271 e 0,302 cópias, na colheita 1 e 2, respectivamente. A maior média de quantificação obtida foi de 2409,3 cópias referente à média do NC quantificada na colheita 1. As médias do NC do DNA alvo da *B. bovis* foram menores na primeira colheita (Quadro6).

Quadro 6. Médias, desvios padrão (DP) e valores de máximo e mínimo do número de cópias (NC) de *B. bovis* quantificadas pela técnica de qPCR, dados originais e transformados em $\text{Log}_{10}(n+1)$.

NC <i>B. bovis</i>			
Dados originais			
	Colheita 1	Colheita 2	Total
Média	2409,3	275,7	1342,5
DP	20203,1	673,3	14323,5
Máximo	375000	9330	375000
Mínimo	0,271	0,302	0,271
Dados transformados			
	Colheita 1	Colheita 2	Total
Média	2,6	2,0	2,3
DP	0,6	0,6	0,7
Máximo	5,57	3,97	5,57
Mínimo	0,10	0,11	0,10

5.3 Análises de correlação e repetibilidade dos dados

Estão representados na Figura 6 a distribuição das variáveis contagem de carrapatos e NC nos 38 grupos de animais que se referem aos descendentes de cada um dos touros. Pode-se observar que para contagem de carrapatos os filhos de apenas três touros (T20, T22 e T28) destacaram-se em relação aos demais e, para NC de *B. bovis*, os filhos de três touros (T20, T28 e T36) também se destacaram.

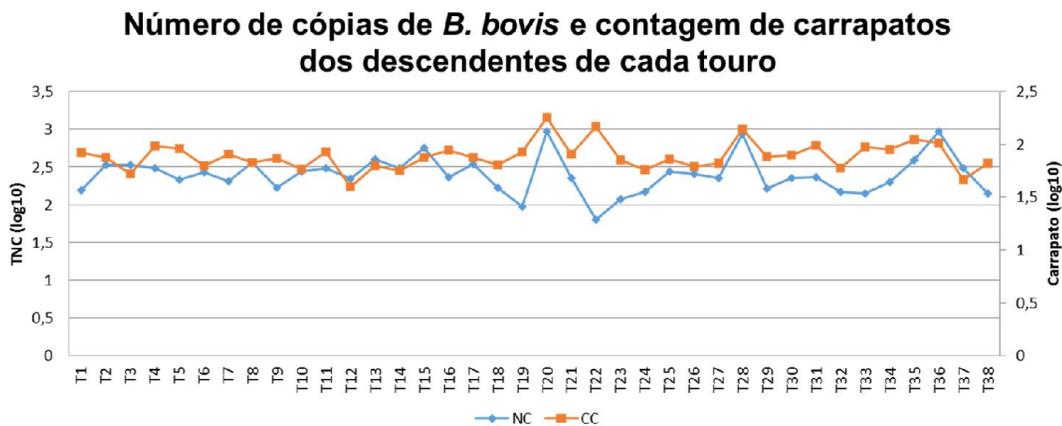


Figura 6. Distribuição das médias do número de cópias de *B. bovis* (NC) e da contagem de carrapatos (CC) do grupo de filhos de cada um dos 38 touros (T1-T38) que compunham o rebanho em estudo.

Os coeficientes de repetibilidade foram de 0,255 para contagem de carrapatos e 0,125 para número de cópias de *B. bovis*. A herdabilidade estimada para as duas características foram de baixa magnitude, sendo de, 0,207 para contagem de carrapatos e 0,059 para número de cópias de *B. bovis*. Também foram próximas de zero as estimativas dos coeficientes de correlação genética (0,079), efeitos permanentes de ambiente (-0,060), dos resíduos (0,031) e fenotípico (0,030), entre as duas características.

5.4 Genotipagem

5.4.1 Controle de qualidade dos genótipos

Após o controle de qualidade, duas amostras foram removidas por não atingirem o limiar de 0,9 para *Call Rate*. Foram removidos todos os SNPs sem posição definida no genoma (14351), os que eram do cromossomo y (8), os mitocondriais (78) e os duplicados (37), sendo que, neste último caso, o segundo SNP identificado como repetido foi o removido. Foram removidos, ainda, os SNPs que não se enquadraram nos critérios de controle definidos para *Call Rate*, *MAF* e teste do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Dessa forma, dos 138892 SNPs originais permaneceram 114924.

5.4.2 Imputação

O *Call rate* médio das amostras foi de 99,48%, ou seja, em média para 0,52% dos SNPs não foi possível realizar a leitura, o que significa, em valores, que em média 598 SNPs foram perdidos por amostra. A amostra com maior perda de SNPs apresentou 8,45% de SNPs faltantes, enquanto que a com menor perda apresentou 0,04%. Após o procedimento de imputação todos os genótipos faltantes foram estimados e imputados.

5.4.3 Estudo de associação genômica ampla

Para cada característica, a cada iteração, foram identificadas as dez janelas do genoma contendo os SNPs que explicavam a maior parte da variação genética da característica. Para a contagem de carrapatos estas dez janelas explicaram, aproximadamente 2,27%, 9,84% e 36,82% da variação genética na característica, nas iterações w1, w2 e w3, respectivamente. Quatro janelas apareceram tanto em w1 quanto em w2, seis janelas apareceram tanto em w2 quanto em w3 e uma janela esteve presente nas três iterações (Quadro 7). Na Figura 7 encontram-se os *Manhattan plots* gerados, em de cada uma das iterações, na análise de GWAS para a característica de contagem de carrapatos.

Quadro 7. Cromossomos, janelas (Mb) e a porcentagem de variação genotípica de infestação por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* explicada pelos SNPs pertencentes a cada janela, identificados na iteração 1 (w1), iteração 2 (w2) e iteração 3 (w3). Cromossomo_Janela (% variação). (*) janelas em comum das iterações w1 e w2; (#) janelas em comum das iterações w2 e w3; (**) janelas em comum das iterações w1, w2 e w3.

W1	W2	W3
6_40 (0,424)	30_59# (1,443)	22_5 (8,448)
3_53 (0,336)	12_20# (1,122)	12_20# (5,958)
20_5 (0,264)	29_19# (1,081)	19_32# (4,312)
16_21* (0,218)	4_34# (0,990)	29_19# (3,648)
5_86* (0,192)	10_3** (0,989)	30_59# (3,326)
25_39 (0,185)	19_32# (0,973)	4_34# (2,808)
5_87* (0,170)	5_86* (0,843)	10_3** (2,447)
10_3** (0,162)	5_87* (0,810)	6_47# (2,362)
7_94 (0,160)	16_21* (0,800)	4_99 (1,836)
20_72 (0,159)	6_47# (0,791)	1_9 (1,676)

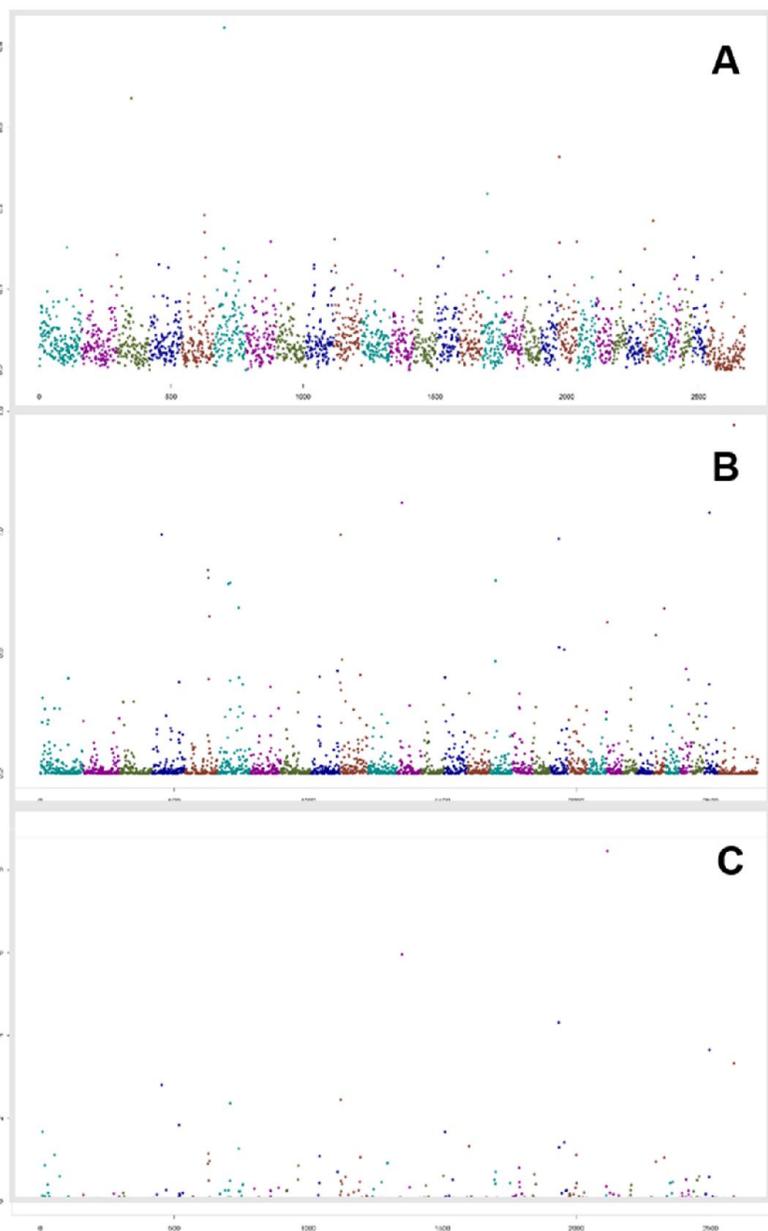


Figura 7. *Manhattan plots* gerados em de cada uma das iterações na análise de GWAS para a característica de contagem de carrapatos demonstrando os SNPs mais significativos. A= iteração 1; B= iteração 2; C= iteração 3.

Para a característica nível de infecção por *B. bovis*, as dez janelas, em cada iteração explicaram, aproximadamente, 2,91%, 12,074% e 44,51% da variação genética na característica. Duas janelas apareceram tanto em w1 quanto em w2, três janelas apareceram tanto em w2 quanto em w3 e duas janelas estiveram presentes nas três iterações (Quadro 8). Na Figura 8 encontram-se os *Manhattan plots* gerados, em de cada uma das iterações, na análise de GWAS para a característica de número de cópias de *B. bovis*.

Quadro 8. Cromossomos, janelas (Mb) e a porcentagem de variação genotípica da infecção por *B. bovis* explicada pelos SNPs pertencentes a cada janela, identificados na iteração 1 (w1), iteração 2 (w2) e iteração 3 (w3). Cromossomo__Janela (% variação). (*) janelas em comum das iterações w1 e w2; (#) janelas em comum das iterações w2 e w3; (**) janelas em comum das iterações w1, w2 e w3.

W1	W2	W3
14__27 (0,403)	8__6** (1,875)	27__39# (7,470)
7__24 (0,399)	14__54** (1,674)	8__6** (5,870)
3__53* (0,374)	8__89 (1,271)	8__90# (5,498)
5__107 (0,347)	27__39# (1,204)	20__70# (5,325)
8__6** (0,267)	3__53* (1,191)	1__97 (5,208)
24__27 (0,261)	8__90# (1,159)	17__13 (3,834)
7__1 (0,240)	20__70# (1,135)	15__39 (3,792)
14__54** (0,239)	11__68* (0,952)	7__4 (2,785)
11__68* (0,193)	7__11 (0,830)	14__54** (2,706)
6__39 (0,191)	1__105 (0,782)	16__32 (2,024)

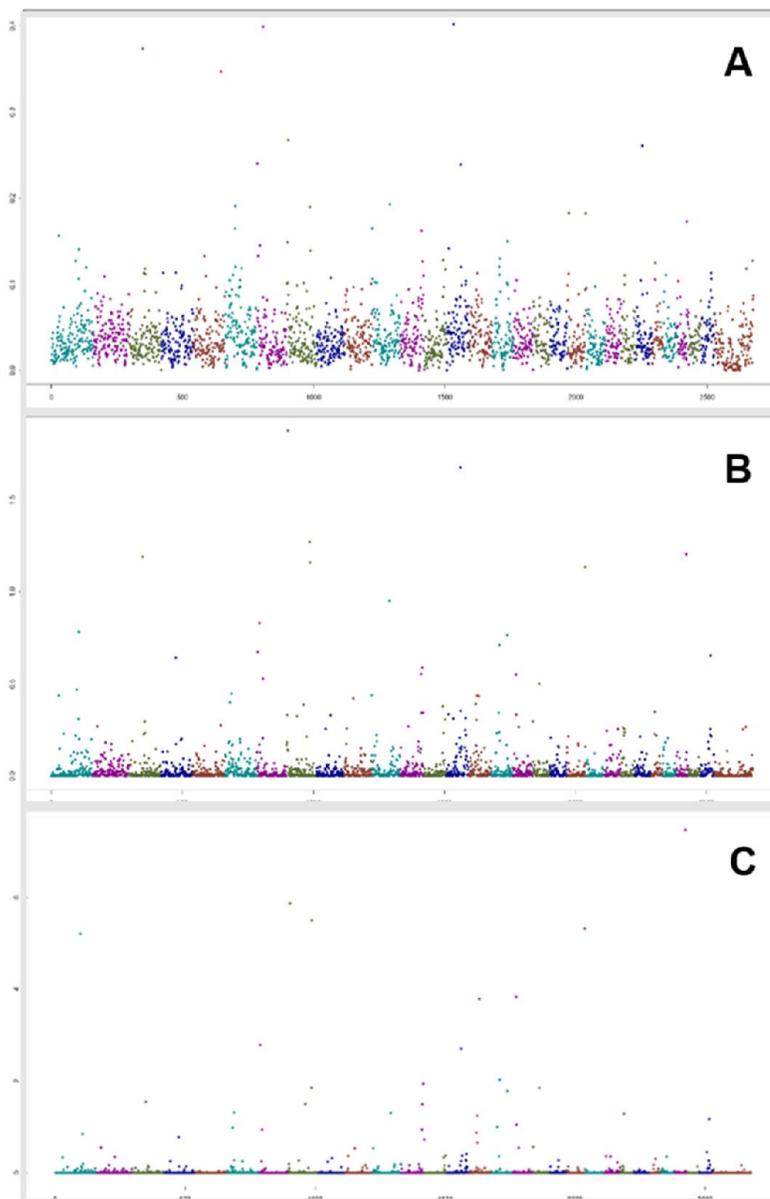


Figura 8. *Manhattan plots* gerados em de cada uma das iterações na análise de GWAS para a característica de número de cópias de *B. bovis* demonstrando os SNPs mais significativos. A= iteração 1; B= iteração 2; C=iteração 3.

5.4.4 Análise no banco de dados *Animal QTLdb*

Analisando-se o banco de dados *Animal QTLdb*, não foram encontradas regiões, de outros estudos, relacionadas à característica infecção por *B. bovis*, nas janelas dos cromossomos identificados. Foram identificados QTLs associados a

característica resistência a carrapatos (Quadro 9). As regiões onde foram encontrados esses QTLs não condizem com as regiões encontradas no presente estudo.

Quadro 9. Cromossomos e regiões onde foram relatados QTLs associados a característica resistência a carrapatos no *Animal QTLdb* (RNE= Região não especificada)

Cromossomo	Região (cM)	Número de QTLs	Referência
BTA2	58,4	1	Machado et al., 2010
BTA 3	69	4	Porto et al., 2011
BTA 5	92,9	2	Gasparinet al., 2007
	93,1		Machado et al., 2010
BTA7	42,8	1	Gasparinet al., 2007
BTA10	NE	1	Machado et al., 2010
BTA11	57,4	1	Machado et al., 2010
BTA14	20,5	6	Gasparinet al., 2007
BTA14	99,57		Porto et al., 2012
BTA14	99,59		
BTA14	99,59		
BTA14	99,62		
BTA14	99,67		
BTA23	46,2	2	Machado et al., 2010
	56,6		
BTA27	NE	1	

Outros QTLs relacionados a resistência a infecção por tripanossomas foram identificados no banco de dados *Animal QTLdb*, sendo estes localizados nos cromossomos BTA4, BTA7, BTA13 e BTA23.

6 DISCUSSÃO

Todos os animais deste experimento apresentaram infestação por carrapatos e resultados positivos nos testes para diagnóstico de infecção por *B. bovis*. Esses resultados já eram esperados tendo em vista que os animais utilizados no experimento foram animais *Bos taurus*, os quais são descritos pela literatura como animais mais susceptíveis à infestação por carrapatos e hemoparasitas, quando comparados aos animais *Bos indicus* ou aos cruzamentos de ambos (JONSSON et al., 2008; PIPER et al., 2010) As altas contagens de carrapatos podem ter sido influenciadas pelo período de colheita, janeiro e março, quando o frio ainda não é intenso na região. O manejo adotado na fazenda também pode ter influenciado o número de carrapatos encontrados nos animais, já que lá é rotineira a prática de distribuir pelas pastagens carrapatos coletados em outras propriedades. Esta prática visa compensar o baixo número desse ectoparasita nos períodos frios. Mahoney & Ross (1972) estabeleceram três situações epidemiológicas possíveis para a ocorrência da babesiose bovina: regiões indenes, onde o vetor não ocorre, estabilidade endêmica, quando o carrapato ocorre durante todo o ano, e instabilidade endêmica quando as condições climáticas não são favoráveis ao desenvolvimento do carrapato durante alguns meses do ano. Este último padrão é o comumente observado na região estudada (KESSLER & SCHENK, 2000) e não é desejável, já que os animais que não entram em contato com as babesias durante nos primeiros meses de vida, não desenvolvem imunidade protetora e tendem a desenvolver quadros agudos.

Com relação às médias das contagens de carrapatos obtidas nesse experimento, observou-se que foram maiores que aquelas obtidas em outros estudos realizados com animais Angus nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (GIGLIOTTI, 2013). Este trabalho observou médias de contagem de carrapato, em valores transformados, de 1,6 e 2,1 na primeira e segunda colheita respectivamente. Enquanto que Gigliotti (2013) observou médias de 0,81 e 0,92, na primeira e segunda colheita, respectivamente, nos animais de Minas Gerais e de 0,42 e 0,41, na primeira e segunda colheita, nos animais de São Paulo.

Sabe-se que a prática de distribuição de carrapatos no pasto produz a constante inoculação de *B. bovis* nos animais mantendo a situação de estabilidade endêmica. No entanto diferentes fatores podem influenciar a efetividade desta prática, como a carga de carrapatos distribuídos e a infecção destes pelas babesias. A parasitemia dos bovinos situados no local onde o carrapato foi colhido é um fator importante na taxa de infecção das teleóginas (FORERO et al., 1986; GUGLIELMONE et al., 1988; GUGLIELMONE et al., 1989; MELENDEZ & FORLANO, 1996). A cepa de *R. (B.) microplus* também interfere na taxa de infecção, pois, cepas altamente susceptíveis à babesia, independentemente do nível de infecção do bovino que elas parasitaram, podem se infectar em 100% dos casos (HODGSON, 1992).

Observou-se diferença significativa das médias, tanto de contagem de carrapatos (CC) quanto de quantificação de *B. bovis* (NC), de uma colheita para outra. A CC aumentou da primeira para a segunda colheita enquanto que o NC diminuiu, sugerindo que possivelmente ocorra oscilação da carga parasitária tanto de carrapatos quanto de babesias ao longo do ano. Flutuações na população de carrapatos já foram observadas e influenciam, junto com outros fatores como o manejo dos animais, os níveis de infecção por babesia (MAHONEY & ROSS, 1972). Como apenas duas colheitas foram realizadas no experimento e não há a informação de com que frequência e quantos carrapatos foram jogados ao pasto, não se pode afirmar com certeza qual a causa do aumento e queda da CC e NC, respectivamente.

A técnica de qPCR utilizada para quantificação de *B. bovis* neste experimento mostrou-se eficiente para detecção do parasita em todas as amostras de DNA avaliadas. Bilhassi et al. (2013) também trabalharam com animais Angus e verificaram que a técnica de qPCR possibilitou estimar o nível de infecção por *B. bovis* de maneira precisa. Giglioti (2013) também obteve precisão na estimativa de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em diferentes raças bovinas.

Foi observada baixa correlação genética (0,079) entre NC e CC, o que significa que a seleção para uma das características não acarretará resposta correlacionada na outra. Analisando a Figura 7, que mostra as medias de CC e NC de cada grupo de filhos dos 38 pais, verifica-se que o comportamento de NC e CC não segue um mesmo padrão, havendo grupos com aumento de ambas variáveis, por exemplo, os filhos do animal T20 e grupos onde elas se comportam de maneira inversa, por

exemplo os filhos do animal T22. A correlação fenotípica encontrada também foi baixa (0,03), o que mostra que animais com maior contagem de carrapato não necessariamente terão em maior número de cópias de DNA de *B. bovis*.

Foi observada baixa repetibilidade tanto de NC (0,125) quanto de CC (0,25) nos animais em estudo. Isso mostra que para cada animal uma medida da característica não é suficiente para indicar com acurácia razoável, o seu valor, em uma medida futura. Outros estudos encontraram maior coeficiente de repetibilidade para a contagem de carrapatos, que o observado neste estudo, trabalhando com infestação artificial por *R. (B.) microplus* em bovinos de diferentes grupos genéticos (MACKINNON et al., 1991; SILVA et al., 2007). Fraga et al. (2003) estudando resistência a carrapatos no Brasil, através de infestação natural, em animais Caracu, observaram coeficientes de repetibilidade de 0,29 e 0,21, para contagem e escore, respectivamente, valores próximos ao obtido no presente estudo.

Um fator limitante da seleção convencional para resistência a carrapatos é a baixa herdabilidade dessa característica (CARDOSO et al., 2006), resultando em baixa acurácia de predição do valor genético dos animais. Estudos relacionados à resistência a carrapatos encontraram valores de herdabilidade de 0,15 (PRAYAGA et al., 2009), 0,37 (TURNER et al., 2010) e 0,21 (MACHADO et al., 2010). A herdabilidade para CC encontrada neste trabalho foi também baixa, (0,21) condizendo com o que já foi descrito pela literatura. Neto et al. (2011) concluíram que a herdabilidade para a característica “carga de carrapatos” é de aproximadamente 0,30, valor próximo ao encontrado para a mesma característica neste estudo. Para o nível de infecção por *B. bovis*, a estimativa de herdabilidade é ainda mais baixa (0,06). Desta forma, para ambas as características, é difícil prever o valor genético do animal, mesmo com várias medidas na mesma característica. Assim, uso de informações moleculares para seleção de animais resistentes pode ser importante para que se aumente a resposta.

Alguns dos cromossomos onde foram identificadas regiões significativas no presente trabalho estão também publicados no banco de dados *Animal QTLdb*, identificados em diferentes trabalhos, como importantes para resistência a carrapatos. Em um estudo com 382 animais cruzados Gir x Holandes, avaliados na época das águas e da seca, foram mapeados QTLs sugestivos de serem importantes

para a característica resistência a carrapatos, utilizando-se 23 microssatélites (GASPARIN et al., 2007). No estudo, identificaram um QTL nos cromossomos BTA5 e BTA7, na época das águas, e um QTL em BTA7 e BTA14 na época da seca. No presente estudo, duas janelas (1Mb) no cromossomo BTA5 foram identificadas, nas iterações w1 e w2, como de efeito significativo para a característica infestação por carrapatos, tendo elas explicado 0,36% e 1,65%, da variação genética da característica, respectivamente. O cromossomo BTA7 apresentou uma janela significativa, para a mesma característica, na iteração w1, explicando 0,16% da variação. Desta forma, sugere-se a importância destes cromossomos na característica resistência a carrapato.

Com relação à infecção por *B. bovis*, foram identificadas neste trabalho janelas nos três cromossomos estudados por Gasparin et al. (2007). Uma janela no cromossomo BTA5 foi identificada, na iteração w1, explicando 0,35% da variação. Em BTA7 diferentes janelas foram identificadas nas iterações w1, w2 e w3, explicando 0,40/ 0,24%, 0,83% e 2,79%, respectivamente. No cromossomo BTA14 não foi encontrada janela significativa para característica infestação por carrapatos, porém para a infecção por *B. bovis* duas janelas foram identificadas como significativas, uma em w1 e outra em w2 e w3, explicando 0,40%, 1,67% e 2,70% da variação genética, respectivamente, sugerindo que possam haver QTLs em cromossomos que expliquem tanto a característica de resistência a carrapato quanto a de infestação por *B. bovis*. Porto Neto et al. (2012) também identificaram QTLs significativos em 4 regiões, próximas uma da outra, do cromossomo BTA14.

Porto Neto et al. (2011) estudando bovinos de corte e leite identificaram 4 QTLs significativos na região 69 cM do cromossomo BTA3. Neste estudo foi identificada uma janela (53 Mb) na iteração w1 da característica infestação por carrapatos, explicando 0,03%, e nas iterações w1 e w2 da característica infecção por *B. bovis*, explicando 0,37% e 1,19%, respectivamente. Machado et al, 2010, utilizando 180 microssatélites, identificaram QTLs significativos nos cromossomos BTA2, BTA10, BTA23 em animais avaliados na época da seca e QTLs significativos nos cromossomos BTA5, BTA11, BTA23 e BTA27 em animais avaliados na época das águas, para a característica resistência a carrapatos. Neste estudo foi identificada uma janela significativa no cromossomo BTA27, nas iterações w2 e w3, explicando

1,20% e 7,47%, respectivamente. Assim, mais uma vez, sugere-se que possa haver QTLs em cromossomos que expliquem tanto a característica de resistência a carrapato quanto a de infestação por *B. bovis*.

Alguns dos cromossomos, com os SNPs mais significativos, identificados neste estudo, foram também relatados no estudo de Sollero et al. (2015), mas não estão publicados no banco de dados do *Animal QTLdb*, no momento da redação desta dissertação. Estes autores, estudando 3455 animais Braford e Hereford, identificaram 48 janelas as quais explicavam 22% da variância da característica resistência a carrapatos nos bovinos. Dentre os cromossomos envolvidos, BTA10, BTA11 e BTA15 foram aqueles que possuíram as maiores porcentagens de explicação dos SNPs neles contidos, sendo estas 1,13%, 1,19% e 1,67%, respectivamente. Neste trabalho foi identificada uma janela (1Mb) no cromossomo BTA10, explicando 0,16%, 0,99% e 2,45% da variância da característica infestação por *R. (B.) microplus*, nas iterações w1, w2 e w3, respectivamente, evidenciando a importância do cromossomo nesta característica. Nos cromossomos BTA15 e BTA11 não foram identificadas janelas significativas para a característica infestação por carrapatos, porém, para a característica infecção por *B. bovis*, foram encontradas janelas nesses cromossomos, em w3 de BTA15 explicando 3,79%, e em w1 e w2 de BTA11 explicando 0,19% e 0,95%, respectivamente. Estes resultados sugerem, mais uma vez, que pode haver cromossomos com QTLs que expliquem tanto uma característica quanto a outra.

O cromossomo BTA2 relatado por Sollero et al. (2015) como relacionado à característica de resistência a carrapatos também apresentou efeito significativo, nessa característica, em outros estudos (TURNER et al., 2010; MACHADO et al., 2010). No entanto, no presente trabalho não foi identificado efeito significativo deste cromossomo em nenhuma das duas características.

O tripanossoma é um protozoário transmitido através do sangue, que também acomete as células sanguíneas do seu hospedeiro e desencadeia sintomatologia bem parecida com a observada na babesiose. Nos bovinos, a tripanossomíase cursa com febre e anemia crônica e progressiva, mas os sinais podem variar de acordo com a patogenicidade do tripanossomo envolvido na infecção (ANDREWS et al., 2013). Hanotte et al. (2003) relataram QTLs relacionados à resistência à infecção pelos tripanossomas, em bovinos, nos cromossomos BTA4, BTA7, BTA13 e BTA23. O

presente estudo identificou duas regiões significativas na iteração w1 e uma região significativa na iteração w2, no cromossomo BTA7, para a característica infecção por *B. bovis*. Considerando que tanto os tripanossomos quanto as babesias são parasitas sanguíneos, sugere-se que o cromossomo BTA7 pode estar envolvido em algum mecanismo de resistência às hemoparasitoses.

A identificação de cromossomos, neste estudo, relacionados à característica infestação por carrapatos, em comum com outros estudos já realizados sugere que possa haver grande influência desses cromossomos na variação da característica, ainda que, as regiões, destes cromossomos, identificadas não sejam as mesmas. Como não há, ainda, outros estudos de associação genômica para a característica infecção por *B. bovis*, podemos afirmar que o presente trabalho é inédito no estudo genômico desta característica. No entanto, alguns cromossomos significativos para esta característica, foram relatados em estudos anteriores como importantes para a resistência a carrapatos.

7 CONCLUSÕES

- Todos os bovinos da raça Angus do estudo apresentaram infecção por *B. bovis* detectada pela técnica de qPCR mostrando ser esta uma técnica viável e sensível de detecção;
- Todos os bovinos da raça Angus do estudo apresentaram infestação por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e as medias de contagem de carrapato foram altas;
- As estimativas de herdabilidade das características estudadas indicam que a seleção pelo fenótipo trará respostas apenas a longo prazo;
- Foram encontradas importantes janelas, em cromossomos, que possivelmente parte importante da variação genética à infecção por *B. bovis* e a resistência a carrapatos;
- Nos cromossomos onde foram identificadas regiões significativas neste estudo também foram relatados efeitos sobre a característica de resistência a carrapatos em outros estudos, sugerindo uma possível importância deles na característica de infestação por carrapatos;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, I.; MISZTAL, I.; JOHNSON, D. L.; LEGARRA, A.; TSURUTA, S.; LAWLOR, T. J. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. **J. Dairy Sci.**, 93 (2):743, 2010.

AGUIRRE, D.H.; BERMÚDEZ, A.C.; MAGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Infecção natural com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de raça Hereford, Criolla y Nelore em Tucumán, Argentina. **Rev. Med. Vet.**, v. 71, p. 54-60, 1990.

ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Medicina Bovina, Doenças e Criação de Bovinos**. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2013.

BARENDSE, W. Assessing Tick Resistance in a Bovine Animal for Selecting Cattle for Tick Resistance by Providing a Nucleic Acid from the Bovine Animal and Assaying for the Occurrence of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP). **Patent application**, p. 1–146, 2007.

BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; BRESSANI, F. A.; MALAGÓ JÚNIOR, W.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, M. C. S. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks Tick borne dis.**, 2013.

BOCK, R. E.; de VOS, A. J.; KINGSTON, T. G.; McLELLAN, D. J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. **Aust. Vet. J.**, v.75, n.5, p.337-40, 1997.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v.77, n.7, p.461-464, 1999.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DEVOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 2004, v. 129, p. 247–269.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K.T.; DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61–74, 1995.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J. C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *B. bovis* and *B. bigemina*. **Vet. Parasitol.**, v.147, p.16-25, 2007.

CAEIROS, A. P. S. **Deteção de babesia spp. E de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal**. 2012. 111 f. Dissertação (mestrado integrado em medicina veterinária) - faculdade de medicina veterinária. Universidade técnica de Lisboa, Lisboa.

CALLOW, L. L. Protozoan and rickettsial diseases, In: Australian Bureau of Animal Health (ed.), **Animal Health in Australia**, v.5, p.121-216,1984.

CALLOW, L. L.; ROGERS,R.J.; DE VOS, A.J. Tick-borne diseases : cattle-pathology and serology. In: **Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases** (ed. Corner, L.A. & Bagust, T. J.), pp. 1–16. East Melbourne, CSIRO Information Services, 1993.

CALLOW, L. L.; TAMMEMAGI, L. Vaccination against bovine babesiose. Infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to *B. argentina*. **Australian Veterinary Journal**, 43: 249-256, 1967.

CAMILLO, G.; VOGEL, F. F.; SANGIONI, L. A.; CADORE, G. C.; FERRARI, R. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, **Brasil Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.490-495, 2009.

CARDOSO, V.; FRIES, L. A.; ROSO, V. M.; BRITO, F. V. Estimates of heritability for resistance to *Boophilus microplus* tick evaluated by an alternative method in a commercial Polled Hereford x Nelore population in Brazil. In: 8TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2006, Belo Horizonte, Brasil, **Proceedings....**, 2006.

CEPEA. **Centro de Estudos Avançados de Economia Aplicada**. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br. Acesso em: 05/04/2015.

CHRISTENSEN O.; LUND M. Genomic prediction when some animals are not genotyped. **Genet. Sel. E**, v.42, 2, 2010.

CNA. Confederação Nacional da Agricultura. **Fórum nacional permanente da pecuária de corte - balanço da pecuária bovina de corte**, 1994 a 2009.

CORDOVÉS, C.O. Carrapato: controle ou erradicação. **Porto Alegre: Guaíba Agropecuária**, p. 197, 1997.

CUNDIFF, L. V. Breeds and Genetics. In: POND, W. G.; BELL, A. W. (Ed.) **Encyclopedia of Animal Science**. Ithaca: Cornell, p. 800, 2004.

DE VOS, A. J.; POTGIETER, F. T. (1994). **Bovine babesiosis. In Infectious Diseases of Livestock** (ed. Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R. & Tustin, R. C.), pp. 278–294. Capetown, Oxford University Press.

De WAAL, D.T.. Vaccination against Babesiosis. **Acta Parasitol. Turcica**. v. 20, p. 487-516, 1996.

FORERO, S. H.; VERGEL, B. N.; CARDONA, H.; VISCINO, G. O. Observación de vermículos de *Babesia* spp. en hemolinfas y huevos de *Boophilus microplus*. **Rev. Acoves**. v.10, p.4-9, 1986.

FRAGA, A. B.; ALENCAR M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO J. N. S. G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapato (*Boophilus microplus*). **Rev Bras Zootec**, 32, p.1578-1586, 2003.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L. L.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; MACHADO, M.A.; SILVA, M., SONSTEGARD, T. S.; REGITANO, L. C. A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetic** 38, 453–459, 2007.

GIGLIOTI, R. **Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos**. 2013. Tese (Doutorado em genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. **J. Anim. Breed. Genet.**, 124:323, 2007.

GODDARD, M. E.; WRAY, N. R.; VERBYLA, K.; VISSCHER, P. M. Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data, **Stat. Sci.**, v. 24, p. 517–529, 2009.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D.H. El diagnóstico de micro-organismos en la hemolinfa de la garrapata *Boophilus microplus* y su aplicación en la epizootiología de la babesiosis bovina. Mem. 3rd. **Reunión Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag.** Balcarce, 1988. p. 18-19.

GUGLIELMONE, A. A., MANGOLD, A. J., AGUIRRE, D. H., GAIDO, A. B., De OLSEN, A .A. The effect of infection by *Babesia* sp. on the some biological parametres of engorged females of *Boophilus microplus*. **Folia Parasitol.**, v.36, p.1-6, 1989.

HAYES, B. J. Whole Genome Association and Genomic Selection. **Course notes**, Toulouse, p. 110, 2011.

HERMANS, P.; DWINGER, R. H.; BUENING, G. M.; HERRERO, M. V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, v.42, p.623-32, 1994.

HANOTTE, O.; RONIN, Y.; AGABA, M.; NILSSON, P.; GELHAUS, A.; HORSTMANN, R.; SUGIMOTO, Y.; KEMP, S.; GIBSON, J.; KOROL, A.; SOLLER, M.; TEALE, A. **Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle** Communicated by James E. Womack, Texas A&M University, College Station, TX, April 22, 2003.

HIRSH, D. C., BURTON, G. C., BLENDEN, D. C. The effect of tetracycline upon establishment of *Escherichia coli* of bovine origin in the enteric tract of man. **Journal Application Bacteriology**, v. 37, n. 3, p. 327-333, 1974.

HODGSON, J. H. Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 653, p. 42-51, 1992.

JONSSON, N. N.; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Vet. Parasitol.**, v. 155, p. 1-9, 2008.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses, **Vet. Parasitol.** V.137, p. 1-10, 2006

KE, G. M.; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W. T.; CHULU, J. L.C.; LIAO, M. H.; CHANG, T. J.; LIU, H. J. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **J. Virol. Methods**, 133, p.6-13, 2006.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. Quando e como vacinar contra tristeza parasitária, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD40.html>>.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes 1888 Starcovici 1893) em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n.8, p. 931-935, 1983.

LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Anim.Prod.**, v. 41, p. 187-191, 1985.

MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. D.; PEIXOTO, M. G.; DE FREITAS, C.; PRATA, M. C.; FURLONG, J.; DA SILVA, M. V.; GUIMARAES, S. E.; REGITANO, L. C.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*). **BMC Genomics** 11, 280, 2010.

MACHADO R. Z.; MCELWAIN T. F.; PANCRÁSIO, H. P.; FRESHI C. R.; PALMER G. H. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. **Exp. Parasitol.** 93, p.105-108, 1999.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.**, v.48, p.292-8, 1972.

MAHONEY, D. F. **The application of epizootiological principals in the control of Babesiosis in cattle**. Bulletin of Office International Des Epizooties 81, 1974, p. 123–138.

MACKINNON, M. J.; MEYER, K.; HETZEL, D. J. S. Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. **Livestock Production Science**, v.27, p.105-122, 1991.

MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; CERESÉR, V. H.; ARTECHE, C. C. P.; GUGLIELMONE, A. A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 3, n. 2, p. 75-78, 1994.

MCLEOD, R.; KRISTJANSON, P. (1999).Final report of joint esys/ILRI/ACIAR TickCost project – **Economic impact of ticks and tick-borne diseases to livestock in Africa, Asia and Australia**. International Livestock Research Institute, Nairob.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, **157**:1819, 2001.

MISZTAL, I.; LEGARRA, A.; AGUILAR, I. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. **J. Dairy Sci.**, 92(9):4648, 2009.

MELENDEZ, R. D.; FORLANO, M. Incidence and Intensity of *Babesia* spp. Sporokinetes in Engorged *Boophilus microplus* from a Dairy Herd in Venezuela. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.791, p.148-56, 1996.

NETO, L. R. P.; JONSSON, N. N.; D'OCCHIOIA, M. J.; BARENDSE, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary Parasitology**, 165– 172, 2011.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R. Resistance of cattle to the tick *Boophilusmicroplus*.II Natural infestation. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 24, p. 1267-1271, 1989.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilusmicroplus*. I Infestação Artificial. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 22, p. 433-438, 1987.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 42, p. 127-135, 1990.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; NÉO, T. A.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA H. N. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Vet. Parasitol.**, 155:281, 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JÚNIOR, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.35, p. 105-111, 2005.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; BICUDO, P. L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, n.4, p. 301-308, 1982.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; JONSSON, N. N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus*. **Int. J. Parasit.**, 40, p.431-441, 2010.

PORTO NETO, L. R.; JONSSON, N. N.; INGHAM, A.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARENDSE, W. The RIPK2 gene: a positional candidate for tick burden supported by genetic associations in cattle and immunological response of knockout mouse. Cooperative Research Centre for Beef Genetic Technologies. **Immunogenetics**, 64(5):379-88, 2012.

PORTO NETO, L. R.; JONSSON, N. N.; D'OCCHIO, M. J.; BARENDSE, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary Parasitology**, 180 (2011) 165–172.

PRAYAGA, K. C.; CORBET, N. J.; JOHNSTON, D. J.; WOLCOTT, M. L.; FORDYCE, G.; BURROW, H. M. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. **Anim. Prod. Sci.** 49, 413–425, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary Medicine. In: **A Text book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses**, 9 th Ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2000.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. Diseases associated with protozoa. 10th Ed. In: **Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Saunders Elsevier; pp: 1483-1540, 2008.

SAHINDURAN, S. Protozoan Diseases in Farm Ruminants. **A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine**. Ed. Intech., p.473-500, 2012.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO; L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI-JÚNIOR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Gen. Mol. Biol.**, v. 30, 1150-1155, 2007.

SILVA, J. B.; LOPES, C. T. A.; PINHEIRO, C. P.; LIMA, D. H. S. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 847-850, 2013.

SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, K. S. V.; SANTIAGO, G. G.; CARDOSO, F. F. Seleção de Marcadores a partir do Estudo de Associação Genômica Ampla para Resistência ao Carrapato em Bovinos das Raças Hereford e Braford. In: XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, Santa Maria, RS, 2015, **Anais...**, 2015.

STRANDEN, I.; GARRICK, D. J. Technical note: Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. **J. Dairy Sci.**, 92(6):2971, 2009.

TURNER, L. B.; HARRISON, B. E.; BUNCH, R. J.; PORTO NETO, L. R.; LI, Y. T.; BARENDSE, W. A genome wide association study of tick burden and milk composition in cattle. **Anim. Prod. Sci.** 50, 235–245, 2010.

UILENBERG, G. Babesia: a historical overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, May 2006.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 29, p.885-895, 1978.

VAN EENENNAAM, A. L.; WEIGEL K. A.; YOUNG A. E.; CLEVELAND, M. A.; DEKKERS, J. C. M. Applied animal genomics: Results from the field, **Annual Review of Animal Biosciences**, 2:105–39, 2014.

VANRADEN, P. M.; VAN TASSELL, C. P.; WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD T. S.; SCHNABEL R. D.; TAYLOR J. F.; SCHENKEL F. S. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **J. Dairy Sci.**, 92(1):16, 2009.

WANG, H.; MISZTAL, I.; AGUILAR, I.; LEGARRA A.; MUIR W. M. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics Research**, 94(2):73, 2012.