

ASSOCIAÇÃO DO GENE CANDIDATO BOLA-DRB3.2 COM RESISTÊNCIA A ECTOPARASITAS EM BOVINOS "1"

AUTORES

MÁRIO LUIZ MARTINEZ²", MARCOS VINICIUS G. BARBOSA DA SILVA²", MARCO ANTONIO MACHADO²",
CARLOS SOUZA DO NASCIMENTO³", ANA LÚCIA CAMPOS²", MARTA FONSECA MARTINS GUIMARÃES²",
JOHN FURLONG²", MARIA DE FÁTIMA ÁVILA PIRES²", ROBERTO LUIZ TEODORO²"

¹ Financiado parcialmente pelo CNPq e PRODETAB

² Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco – Juiz de Fora – MG, 36038-330

Tel.: (032) 3249-4700 Fax: (032) 3249-4721

E-mail: martinez@cnpqg.embrapa.br

³ Bolsista de Apoio Técnico da FAPEMIG

RESUMO

Nos países tropicais as infestações por ectoparasitas têm causado a redução na produtividade de animais susceptíveis e um alto uso de defensivos agrícolas. O uso de produtos químicos, além do custo, podem deixar resíduos e contaminar a carne, o leite e o meio ambiente. A variação genética entre *Bos taurus* e *Bos indicus* para resistência aos ectoparasitas juntamente com as técnicas da biologia molecular podem tornar possível o uso de marcadores associados a resistência como ferramenta auxiliar em programas de seleção. Este estudo teve como objetivo identificar associações de resistência a ectoparasitas e alelos do gene BoLA-DRB3.2, em 177 animais F₂, oriundos do cruzamento entre animais F₁ Gir:Holandês. Verificou-se associação significativa entre o log da contagem de bernes com os alelos 31 (P<0,05), 42 (P<0,10) e 51 (P<0,05) e, também do log da contagem de carrapatos (P<0,10) com os alelos 10 e 42. A identificação de marcadores genéticos poderá tornar possível a introgressão destes genes em raças leiteiras especializadas e subsequente uso na seleção assistida por marcadores, provendo maior eficiência econômica na produção de leite.

PALAVRAS-CHAVE

gado zebu, marcadores genéticos, resistência a bernes, resistência a carrapatos, BoLA-DRB3.2

TITLE

ASSOCIATION OF BOLA-DRB3.2 GENE WITH RESISTANCE TO ECTOPARASITES IN BOVINES

ABSTRACT

In tropical countries ectoparasites burdens cause a reduction in the productivity of susceptible animals. The use of chemical products, besides the cost, leaves residues that contaminate meat, milk and the environment. The genetic variation between *Bos taurus* and *Bos indicus* for parasites resistance and the current molecular biology techniques, make possible the use of associated genetic markers with resistance as auxiliary tool in selection programs. This study aimed to identify association between ectoparasite resistance and BoLA-DRB3.2 alleles in a F₂ population derived from the crosses of Gyr x Holstein. A significant association was detected between warbles log count with alleles 31 (P<0.05), 42 (P<0.10) and 51 (P<0.05). Tick log count also showed a significant association with alleles 10 and 42 (P<0.1). The identification of these genetic markers will make possible the introgression into specialized milk breeds and subsequent use for marker-assisted selection, providing larger economical efficiency of milk production.

KEYWORDS

genetic markers, tick resistance, warble resistance, zebu cattle, BoLA-DRB3.2

INTRODUÇÃO

Nos países tropicais, as infestações por parasitas têm provocado, além da redução na produtividade, a morte dos animais mais susceptíveis.

Os bovinos estão constantemente ameaçados por lesões causadas por carrapatos e bernes que passam um período no animal, favorecidas principalmente pelo seu ciclo evolutivo. Segundo Furlong et al. (1996), a queda da produção de leite por vaca pode ser de até 23%, quando a infestação média for de 105 carrapatos/vaca. Teodoro et al. (1998) estimaram perdas de 26% (529 kg) na produção de leite por lactação quando compararam vacas holandesas PC, banhadas e não banhadas com carrapaticidas.

O combate a esses parasitas é normalmente realizado com o uso de produtos químicos, os quais, na grande maioria, deixam resíduos na carne, no leite, e nas fezes, trazendo vários riscos para a saúde humana e/ou contaminando o meio ambiente. Assim, o melhoramento genético é uma alternativa que pode contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção.

Dentre os fatores genéticos ligados a resistência, a variação existente está baseada primariamente na variabilidade da expressão da resposta imune, cujas associações com polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2 já foram identificadas. Assim, objetivou-se, com este estudo, verificar a possível existência de associações entre os alelos do gene BoLA-DRB3.2 e a resistência a carrapatos e bernes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais experimentais, da geração F2, foram provenientes dos cruzamentos entre animais F1 Gir:Holandês. Os animais F1 foram produzidos por meio do cruzamento entre Holandês e Gir, usando técnicas de superovulação e transferência de embriões (TE), produzindo-se um total de 150 animais F1. Desses 150 indivíduos F1 (machos e fêmeas), apenas 4 machos foram escolhidos baseados no vigor para serem pais da nova geração de F2. Sessenta e oito fêmeas F1 foram acasaladas com quatro touros F1, constituindo quatro famílias, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas.

Amostras de sangue dos animais foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite para extração de DNA e genotipagem para o gene BoLA-DRB3.2 pela técnica de PCR-RFLP.

Utilizou-se a avaliação absoluta para determinação do nível de resistência de cada um dos 177 animais F2, que foi feita pela contagem das fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo após a infestação artificial com número conhecido de larvas. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas infestações artificiais por animal com 10.000 larvas cada, e as contagens sendo feitas no dia modal de queda dos carrapatos, que, de acordo com a literatura, ocorre no 21º dia após a infestação.

As larvas foram preparadas no laboratório da Embrapa Gado de Leite, incubando-se meio grama de ovos por frasco (equivalente a 5.000 larvas). Dois frascos contendo as larvas infectantes foram inseridos em colar adaptado que foi colocado na região cervical do animal, de modo que as larvas pudessem atingir ambos os lados do corpo.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, na idade de 10 a 14 meses, em torno de 20 a 30 animais por grupo e mantidos a pasto, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações foram feitas durante a primavera, verão e outono, possibilitando que alguns grupos fossem mensurados mais de uma vez.

Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro, de um lado do animal, multiplicando-se o resultado por dois para se obter o número total de carrapatos por animal. As contagens foram feitas pela manhã, até aproximadamente 9 horas, quando a maioria dos carrapatos se desprendiam dos animais. Os mesmos animais foram mantidos sem tratamentos para infestação por bernes, sendo realizada a contagem dos nódulos no mesmo período que a contagem de carrapatos.

Nas análises, foi utilizado o seguinte modelo

$$y = Xh + Za + Mm + ?$$

em que y = vetor de registro do log da contagem +1; X e Z = matrizes incidência relativas aos

efeitos fixos e aleatórios; e h , a , e e = vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo, permanente de ambiente e residual, respectivamente. Ainda, m = vetor incluindo os efeitos fixos de substituição gênica para alelos do BoLA representados por coeficientes de regressão e M = matriz contendo 0, 1 ou 2, representando o número de cópias de determinado alelo presente em cada indivíduo.

Os efeitos de ano-estação de contagem, grupo contemporâneo e sexo do animal foram assumidos como fixos e os efeitos genético aditivo e residual foram assumidos como aleatórios, tendo distribuição normal, médias iguais a zero e variâncias σ_a^2 e σ_e^2 , respectivamente.

Todas as análises foram realizadas por meio do PROC MIXED do sistema SAS (SAS, 2000), resultando em maior flexibilidade na modelagem não somente das médias, mas também das (co)variâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os efeitos médios da substituição dos alelos BoLA para as características de contagem de carrapatos e bernes, expressos em escala logarítmica. Os resultados indicam associações significativas entre o log da contagem de bernes com os alelos BoLA-DRB3.2*31 ($P < 0,05$), *42 ($P < 0,10$) e *51 ($P < 0,05$) e também do log da contagem de carrapatos ($P < 0,10$) com os alelos *10 e *42. Embora significativas ao nível de 10%, a associação observada entre os alelos 10 e 42 com o nível de infestação de carrapatos indica um aumento da carga parasitária, ou seja, menor resistência à infestação por carrapatos quando esses alelos estão presentes nos animais. Isto sugere que a seleção negativa (eliminação dos animais portadores desses alelos) pode levar ao aumento da resistência aos carrapatos na população. Da mesma forma, os alelos 31 e 42 mostram uma associação negativa com a carga parasitária de bernes, o que significa que o aumento da frequência desses alelos, por meio da seleção dos animais portadores destes, aumentaria a resistência à infestação aos bernes. Todavia, os resultados, embora preliminares, indicam efeitos conflitantes em relação ao alelo 42, pois a seleção para se eliminar esse alelo da população poderia levar ao aumento de resistência ao carrapato, mas estaria eliminando animais que são mais resistentes à infestação com bernes. Contudo outros alelos, 31 e 51 mostraram associações com a infestação por bernes, e não com a de carrapatos, podendo assim serem utilizados de forma não conflitantes na seleção ou eliminação dos indivíduos portadores destes alelos, em função de estarem relacionados com o aumento (alelo 51) ou diminuição (alelo 31) da carga de bernes. Assim o conhecimento do efeito da associação com as cargas parasitárias pode ser utilizado para se aumentar a resistência a infestações nas populações. Possíveis explicações para essas associações, segundo Schleger et al. (1976), são que os animais altamente resistentes mostram desgranulação de mastócitos e acúmulo de eosinófilos na lesão, sendo o nível de proteção relacionado ao grau de hiperemia seguida da infestação larval, ao número de anastomose abaixo da glândula sebácea e a concentração e desgranulação de eosinófilos no local onde a larva está aderida.

Por sua vez, Brossard (1976) mostrou aumento significativo na concentração de gamma-globulina sérica após a infestação. As imunoglobulinas, comumente chamadas de anticorpos, são produzidas pelos linfócitos B. Por sua vez, as moléculas da Classe II, onde há predominância do loco DR, apresentam peptídeos derivados a partir de patógenos extracelulares que estimulam as células $CD4^+T$, as quais ativam os macrófagos e células B a gerarem respostas inflamatórias e anticorpos. Deste modo, é razoável supor que alguns dos alelos do BoLA estejam relacionados a maior ativação dos anticorpos. Associações do BoLA com níveis baixos e altos de infestação foram relatadas por Stear et al. (1989).

A seleção direta para resistência a doenças é pouco efetiva, tanto pela baixa herdabilidade dessas características quanto pela dificuldade e/ou complexidade de sua mensuração e avaliação. Deste modo, a aplicação da seleção assistida por marcadores e de técnicas de manipulação usando genes do complexo BoLA podem auxiliar a seleção para maior resistência a doenças, tendo como consequência indireta o aumento da produção de leite em virtude das melhores

condições gerais de saúde dos animais. As associações não são influenciadas pela recombinação, esperando-se que os efeitos dos genes candidatos sejam estáveis através das gerações e, conseqüentemente, não necessitem ser reestabelecidos em cada geração. Assim, quando identificado e verificado o efeito de um gene candidato, este pode ser imediatamente utilizado na seleção assistida por marcadores, com resultados satisfatórios, como os encontrados por Maillard *et al.* (2003), que observaram redução acentuada na prevalência de dermatofilose, doença causada pela bactéria *Dermatophilus congolensis*, ao selecionarem animais contra os alelos 9 e 45 do BoLA-DRB3.2, em um rebanho Brahman, na Martinica.

As análises por meio do modelo misto indicaram que os efeitos fixos de ano-estação da contagem e grupo estavam influenciando significativamente ($P < 0,05$) o log da contagem de carrapatos e bernes, enquanto o sexo do animal não teve efeito sobre essas duas características. Neste estudo, na qual possíveis associações entre BoLA-DRB3.2 e as contagens de bernes e carrapatos foram examinadas, confirmou-se o potencial desses alelos como marcadores para características associadas a saúde animal; entretanto, os efeitos particulares dos alelos não devem ser considerados como conclusivos, principalmente em função do tamanho da amostra. As frequências dos alelos do gene BoLA-DRB3.2 para toda a população (raças parentais, F1 e F2), calculadas por meio de contagem direta, foram relatadas por Machado *et al.* (2004).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos por este estudo, pode-se verificar o potencial do uso do gene BoLA como marcador para características relacionadas à saúde animal; entretanto, os efeitos particulares dos alelos não devem ser considerados como conclusivos, principalmente em função do tamanho da amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BROSSARD, M. 1976. Relations immunologiques entre bovins et tiques, plus particulièrement entre bovins et *Boophilus microplus*. *Acta Tropica*, v.33, n.1, p.15-36.
2. FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L.L. de; *et al.* 1996. . The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on feed intake and milk yield of Holstein x Zebu crossbred cows. In: Congresso Panamericano de Veterinária, XV., 1996, Campo Grande. p. 340.
3. MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B. *et al.* 2004. Associação do gene BoLA-DRB3.2 com características de crescimento em bovinos F2. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande, MS. Anais... Campo Grande: SBZ, 2004. (No prelo)
4. MAILLARD, J.C.; BERTHIER, D.; CHANTAL, I.; *et al.* 2000.. . Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet. Sel. Evol.* v.35 (Suppl. 1): S193-S200
5. SAS. *SAS User's guide: Basic and Statistics* . SAS® INST. INC., Cary, NC, 2000.
6. SCHLEGER, A.V.; LINCOLN, D.T.; MCKENNA, R.V. *et al.* 1976. *Boophilus microplus*: cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. *Australian Journal of Biological Science*, v. 29, p. 499-512.
7. STEAR, M.J.; NICHOLAS, F.W.; BROWN, S.C. *et al.* 1989. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*) assessed in three different seasons. *Veterinary Parasitology*, v. 31, n. 3-4, p. 303-315.
8. TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. 1998. . Effects of ticks *Boophilus microplus* infestations on milk yield of *Bos taurus/Bos indicus* crosses. In *Proceeding of the 6th World Congress Genetics Applied to Livestock Production*. v.27, p.137-180.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1 – Efeito de substituição dos alelos BoLA e respectivos erros-padrão ($\hat{b} \pm EP$) para as características de log da contagem de bernes (LOG_BERNE) e de carrapatos (LOG_CARRAPAT)

Alelos	LOG_BERNE		LOG_CARRAPATO	
	$\hat{b}$	EP	$\hat{b}$	EP
3	-0,214	0,336	-0,165	0,272
5	0,286	0,355	-0,054	0,305
6	-1,035	0,631	-0,840	0,643
10	-0,054	0,787	1,251 [†]	0,690
11	0,064	0,445	0,225	0,425
15	0,533	0,434	-0,134	0,369
16	0,431	0,347	-0,352	0,265
18	-0,047	0,567	-0,373	0,435
20	-0,165	0,313	-0,277	0,262
23	0,276	0,314	-0,018	0,256
27	0,431	0,322	-0,107	0,253
31	-1,068*	0,474	-0,665	0,433
35	-0,653	0,676	-0,623	0,672
42	-0,948 [†]	0,520	0,974 [†]	0,510
51	1,289*	0,641	0,314	0,471

[†](P<0,10);*(P<0,05)