

## Marcadores Genéticos como Indicadores de Resistência a Parasitos Gastrintestinais em Ovinos





ISSN 0103-376X

Janeiro, 2002

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Documentos31**

## **Marcadores Genéticos como Indicadores de Resistência a Parasitas Gastrointestinais em Ovinos**

Magda Vieira Benavides  
Ana Maria Sastre Sacco  
Tania de Azevedo Weimer  
Maria Elizabeth A. Berne  
Marcos Flávio S. Borba

Bagé, RS  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul  
BR 153, km 595 - Caixa Postal 242  
96401-970 - Bagé, RS  
Fone/Fax: (0XX53) 242-8499  
<http://www.cppsul.embrapa.br>  
[sac@cppsul.embrapa.br](mailto:sac@cppsul.embrapa.br)

#### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Roberto Silveira Collares*  
Secretário-Executivo: *Nelson Manzoni de Oliveira*  
Membros: *Klecius Ellera Gomes*  
*Sérgio Silveira Gonzaga*  
*Carlos Miguel Jaume Eggleton*  
*Ana Mirtes de Sousa Trindade*  
*Vicente Celestino Pires Silveira*

Supervisor editorial: *Sérgio Silveira Gonzaga*  
Tratamento editorial: *Ana Mirtes de Sousa Trindade*  
Tratamento de ilustrações: *Roberto Cimirro Alves*  
Editoração eletrônica: *Roberto Cimirro Alves*

#### **1ª edição**

1ª impressão (2001): 500 exemplares

#### **Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros. Marcadores Genéticos como Indicadores de Resistência a Parasitos Gastrointestinais em Ovinos [por] Benavides, M. V.; Sacco, A. M. S.; Weimer, T. de A.; Berne, M. E. A.; Borba, M. F. S. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2002.

20. (Embrapa Pecuária Sul, Documentos, 31)

1. Ovinos. 2. Resistência Genética. 3. Helminhos. 4. Benavides, M. V.; 5. Sacco, A. M. S.; 6. Weimer, T. de A. I. Título. II. Série.

CDD 570.28

# **Autores**

**Magda Vieira Benavides**

Pesquisador Visitante - CNPq  
magda@cppsul.embrapa.br

**Ana Maria Sastre Sacco**

Pesquisador III - Embrapa Pecuária Sul  
anasacco@cppsul.embrapa.br

**Tania de Azevedo Weimer**

Professor Titular - Departamento de Genética  
- UFRGS  
weimer@vortex.ufrgs.br

**Maria Elizabeth Aires Berne**

Professor Adjunto - Departamento de  
Microbiologia e Parasitologia - UFPel  
bernemea@ufpel.tche.br

**Marcos Flávio da Silva Borba**

Pesquisador II - Embrapa Pecuária Sul  
mborba@arrakis.es

# Sumário

Justificativa e revisão de literatura .....	9
Material e métodos .....	14
Resultados parciais .....	15
Conclusões .....	16
Referências .....	18

## **Apresentação**

A verminose é um dos principais entraves na produção ovina da Região Sul do Brasil. Tratamentos quimioterápicos têm solucionado o problema, no entanto a crescente resistência dos parasitas aos antihelmínticos utilizados exige novas alternativas de controle.

Uma das possíveis alternativas é o uso da variabilidade genética animal e sua associação com genes que determinam imunidade frente às parasitoses. A detecção destes genes ou marcadores genéticos relacionados a resposta imune possibilita a identificação e posterior seleção de indivíduos mais resistentes à verminose.

Ovinos geneticamente resistentes são de grande interesse dos produtores pois através deles é possível diminuir o nível de contaminação parasitária nas pastagens, aumentar a produtividade, reduzir número de dosificações e assim, a médio prazo, reduzir o custo de produção da ovinocultura.

Eduardo Salomoni  
Chefe Geral da Embrapa Pecuária Sul

# **Marcadores Genéticos como Indicadores de Resistência a Parasitos Gastrintestinais em Ovinos**

Magda Vieira Benavides  
Ana Maria Sastre Sacco  
Tania de Azevedo Weimer  
Maria Elizabeth A. Berne  
Marcos Flávio S. Borba

## **Justificativa e revisão de literatura**

A ovinocultura gaúcha tem enfrentado grandes dificuldades desde a queda nos preços da lã, na safra de 1988/1989. A crise no setor fez com que a maioria dos produtores tenha desviado a atenção para o potencial de produção de carne dos rebanhos de raças "duplo propósito" e "tipo carne" existentes no Estado. Nesta re-estruturação, outros índices produtivos como porcentagem de parição e de desmama e eficiência de ganho de peso passam a ter importância primordial uma vez que a lucratividade do sistema de produção passou a depender do número de indivíduos em condições de abate. Neste sentido, aspectos limitantes da produção ovina como nutrição e sanidade continuam sendo os principais gargalos no sistema. Dentre os aspectos sanitários, as perdas devidas à verminose variam dependendo das condições ambientais e do nível de infestação parasitária do rebanho. Trabalhos realizados na Austrália mostraram diminuições de até 49% no ganho de peso diário em animais não dosificados frente àqueles dosificados e perdas médias de 23% no crescimento de lã por dia (Johnstone, 1978). As parasitoses também retardam o desenvolvimento corporal das fêmeas que, conseqüentemente, sofrem um atraso no início da vida reprodutiva, aumentando assim os custos de produção. Nos casos mais extremos, as parasitoses podem causar a morte de ovinos jovens e adultos.

A verminose tem sido controlada através do tratamento com

anti-helmínticos, no entanto é cada vez maior o número de casos de resistência de parasitas aos princípios ativos utilizados em diversos países como Brasil (Echevarria *et al.*, 1996), Uruguai (Nari *et al.*, 1996), Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos (Beh & Maddox, 1996). A resistência dos helmintos aos princípios ativos faz com que novas drogas, mais eficientes, sejam desenvolvidas pela indústria farmacêutica, mas o descobrimento de novas drogas está se tornando cada vez mais difícil, o que diminui a possibilidade de encontrar uma solução a curto prazo para o problema da parasitose (Hennessy, 1997). Neste sentido a pesquisa tem apontado outras alternativas para combater o problema. Algumas das possíveis estratégias são:

(a) investigação de vacinas que estimulem as defesas naturais do hospedeiro e conseqüentemente diminuam a carga parasitária no ambiente,

(b) melhoramento genético quantitativo através da seleção de ovinos mais resistentes a parasitas gastrointestinais pela determinação da carga parasitária via contagem de ovos por grama de fezes (OPG), e, complementando esta ação,

(c) identificação de marcadores genéticos que classifiquem estes animais geneticamente resistentes a parasitas gastrointestinais para seu posterior uso em seleção.

Estudos demonstram que existem grandes potenciais de progresso nestas três áreas. Em relação ao item (a), o desenvolvimento de vacinas contra helmintos com base em organismos vivos mostra desvantagens no tocante a sua preparação e controle de qualidade e a potencial reversão à virulência (Cox, 1997). De modo a contornar estes inconvenientes de uma vacina viva, pesquisas com o objetivo de identificar, isolar e caracterizar antígenos para a produção de vacinas recombinantes estão sendo investigadas.

Quanto ao item (b), o melhoramento genético quantitativo através da seleção de indivíduos resistentes a parasitas gastrointestinais é possível. Trabalhos têm demonstrado que a herdabilidade da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) varia de 0,14 a 0,44 (Piper, 1987; Watson *et al.*, 1986; Baker *et al.*,

1991; McEwan *et al.*, 1992), permitindo progresso genético de baixo a moderado para esta característica.

O item (c), seleção de animais por marcadores genéticos, tem sido sugerido como um avanço no sistema tradicional de melhoramento genético em base a medidas fenotípicas. Marcador genético é todo aquele gene ou segmento de DNA que está situado perto ou faz parte do gene que determina a característica de importância e permita identificá-lo. O marcador pode não estar envolvido no gene que determina o efeito mas atua como um localizador pois se situa próximo a ele. O estudo de marcadores genéticos tem se utilizado de microssatélites - repetições curtas de nucleotídeos altamente polimórficos - para genotipar indivíduos e estudar possíveis ligações ou associações com a característica de interesse. Apesar das possíveis vantagens que as alternativas (a) e (b) tragam para solucionar o problema da parasitose ovina, a identificação de marcadores genéticos apresenta vantagens adicionais como redução do custo com mão-de-obra, com medicamentos ou com o uso da vacina (a) pois, uma vez identificado o marcador, não requer a exposição dos ovinos às condições de ambiente propícias para avaliar o OPG como ocorre nas provas de progênie (b). O uso de marcadores genéticos é a forma mais segura e econômica de identificar o genótipo animal. Atualmente não existem marcadores identificados para a resistência a parasitas gastrointestinais. Seu estudo e identificação são importantes passos para a gradual melhora de rebanhos animais em qualquer característica de produção e sanidade.

Os métodos quantitativos têm sido amplamente aplicados em programas de melhoramento animal de forma a identificar indivíduos geneticamente superiores. Enquanto o progresso genético para aquelas características de alta herdabilidade e que podem ser medidas diretamente é satisfatoriamente rápido, características cuja expressão é dependente das condições do meio ambiente, portanto de baixa herdabilidade, normalmente necessitam de critérios indiretos de seleção. Estudos apontam a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) como o critério mais eficiente para se aumentar a resistência à parasitose em um

rebanho. Porém, existem outros indicadores fisiológicos como níveis de eosinófilos circulantes no sangue (Hohenhaus & Outteridge, 1995; Woolaston *et al.*, 1996) e níveis de anticorpos e de IgG1 (Douch *et al.*, 1995) que também podem ser usados como critérios de seleção.

Trabalhos de seleção de linhas divergentes de animais imunes e suscetíveis demonstraram que a característica OPG permite obter ampla variação genética entre duas linhas de seleção (Woolaston & Baker, 1996), o que, juntamente com a média herdabilidade da característica, determina um bom potencial para seleção de animais resistentes.

As estimativas de correlações genéticas entre OPG e características produtivas têm mostrado efeitos de diferente magnitude. Alberts *et al.* (1987) e Woolaston (1990) observaram que a seleção de ovinos Merino para baixo OPG provocaria uma pequena diminuição na produção de lã e peso vivo. No entanto os resultados para ovinos Romney apresentados por McEwan *et al.* (1992) mostraram que as respostas na produção de lã podem ser desfavoráveis. Os resultados contrastantes podem ser devidos a comparação de raças distintas testadas em ambientes também distintos. Correlações genéticas publicadas até o momento indicam estimativas baixas e negativas entre OPG e diâmetro médio de fibra e peso corporal (Woolaston, Piper & Le Jambre, *apud* Woolaston, 1990). Infelizmente não existem dados publicados na América Latina que sirvam como parâmetros para comparação.

Apesar dos pontos favoráveis que a seleção de indivíduos com baixo OPG mostra no aumento da resistência parasitária, as seguintes desvantagens são limitantes para a identificação segura do mérito genético dos ovinos:

a. Medição de OPG realizada sob sistema de infecção natural em áreas de baixa pluviosidade: condições climáticas adversas à sobrevivência das formas parasitárias fora do hospedeiro podem mascarar os resultados e aumentar "falsos-negativos". No entanto acredita-se que as condições climáticas, principalmente de pluviosidade, prevalentes no Rio Grande do Sul sejam suficientes para expor os ovinos à infecção natural e com isso ser possível de

medir OPG com segurança, e

b. Tempo prolongado para a execução de testes de progênes. Neste sentido a identificação de marcadores genéticos poderia ser utilizada como uma alternativa para a classificação do genótipo de animais resistentes a parasitas gastrointestinais sem a necessidade de expor os ovinos às condições de alta infestação ambiental, com isso reduzindo custos com mão-de-obra, facilitando o reconhecimento destes genótipos e agilizando o processo de seleção de indivíduos imunes.

Até o momento inexistem marcadores genéticos que identifiquem ovinos imunes a parasitoses gastrointestinais. Este fato estimula as investigações na área de biologia molecular dada a praticidade do uso destes marcadores genéticos nas populações e o rápido avanço genético esperado na característica desejada.

Algumas proteínas importantes na resposta imune, como as interleucinas que fazem parte do processo fisiológico para a obtenção da resposta humoral (Husband *et al.*, 1996), podem ser estudadas neste contexto. As interleucinas 4, 5 e 6 são responsáveis pela mudança da expressão isotípica de IgA e IgE, desenvolvimento clonal e maturação de IgA e maturação de eosinófilos, e desenvolvimento clonal e maturação de IgA, respectivamente. Igualmente importantes são os MHC, Classe I, responsáveis pela apresentação do antígeno às células CD8<sup>+</sup> para ativação da resposta celular e Classe II, responsáveis pela apresentação do antígeno às células CD4<sup>+</sup> para ativação da resposta humoral.

Com o objetivo de identificar fenótipos resistentes e suscetíveis com base na contagem de ovos por grama de fezes (OPG), foi iniciado na Embrapa Pecuária Sul um projeto de pesquisa utilizando ovinos da raça Corriedale, mantidos em poteiros naturalmente infestados. A abordagem utilizada na busca de marcadores moleculares para resistência a parasitas gastrointestinais está sendo a de testar animais resistentes e suscetíveis com marcadores de genes candidatos. Proteínas envolvidas na resposta imune e codificada por genes localizados nos cromossomos 5 (interleucinas) e 20 (proteínas do complexo

MHC) foram os genes candidatos escolhidos para este estudo.

## **Material e métodos**

### *Metodologia de campo*

Cordeiros (7 meses de idade) da raça Corriedale oriundos da Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros da EMBRAPA em Bagé, RS foram utilizados no experimento. A metodologia de monitoramento seguida (McEwan, 1994) consistiu em zerar o OPG e monitorar esta característica semanalmente com amostras de fezes de 5% dos animais do rebanho. Quando o OPG chegou a 800-1500 todos os animais foram amostrados individualmente e foram realizados exames de OPG para se obter o primeiro resultado (OPG1). Esta metodologia foi repetida por mais duas vezes para se obter os valores de OPG2 e OPG3. Ao final do experimento, de cada animal, foi extraído 5ml de sangue com anticoagulante (EDTA) por punção jugular para a extração de DNA.

### *Metodologia de laboratório*

O OPG foi determinado pela técnica de McMaster modificada (Whitlock, 1948). O DNA foi extraído das amostras de sangue no Departamento de Genética da UFRGS. O DNA foi amplificado com primers de microsatélites RM006, CSRD2134, McM108, OarHH56 e TGLA137 em máquina de PCR e os resultados visualizados em gel de poliacrilamida não desnaturante e corados com brometo de etídeo.

Cada microsatélite foi amplificado utilizando 80ng de DNA, 2,5U de Taq DNA polimerase (Pharmacia, Uppsala), 0,4 $\mu$ M de cada primer, 250 $\mu$ M de dNTPs e 10% do volume final da reação (25 $\mu$ l de volume total) em tampão de PCR 10X. As concentrações de MgCl<sub>2</sub> variaram de 1,5 a 4,5mM conforme cada par de primer específico.

Condições gerais de PCR para os microsatélites: desnaturação inicial a 94°C por 3min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento à temperaturas específicas para cada par de primer por 30seg, extensão a 72°C por 1min, seguida de

extensão final a 72°C por tempos variando de 3 a 7min. Para o microsatélite McM108, foi realizado PCR "touch-down" com temperaturas de anelamento variando de 66 a 55 °C.

A visualização dos produtos de PCR foi feita em géis não desnaturantes de poliácridamida (1,2mm de espessura) de 13% (marcador TGLA176) e 10% (para os demais marcadores) corrido a 700V, 50mA e 30W por períodos que variaram de 7 a 16 horas dependendo do tamanho dos fragmentos. Os géis foram corados com brometo de etídio e os tamanhos dos fragmentos avaliados contra marcadores de peso molecular gerados a partir de digestão de vetores como pBR322 e ØX174 (digerido com *HinfI*) com enzimas de digestão.

#### *Análises estatísticas*

As freqüências alélicas e genotípicas foram calculadas em função do número total de animais genotipados. Os valores de PIC ("*Polymorphism Information Content*") foram calculados para determinar a variabilidade genética entre os animais. Estes valores podem variar de 0 a 1, sendo que 1 indica máxima variabilidade genética na população. Análises de associação entre os genótipos estudados e a característica de OPG foram realizadas pelo cálculo dos "excessos médios" (Templeton, 1985), que analisa o efeito de cada alelo na característica estudada. Os dados de OPG sofreram transformação logarítmica e as análises foram realizadas considerando a média dos 3 valores de OPG.

### **Resultados Parciais**

#### *Genotipagens*

Os animais que receberam desafio a campo segundo a metodologia descrita por McEwan (1994) foram genotipados com os microsatélites RM006, CSRD2134, McM108, OarHH56 e TGLA137. Os marcadores mostraram ser polimórficos, com número de alelos variando entre 3 e 12. Os valores de PIC podem ser observados na Tabela 1. Há uma tendência de que os marcadores com maior número de alelos apresentem maior diversidade no entanto o marcador TGLA137, apesar de ter 6 alelos,

apresentou baixo valor de PIC devido a predominância do alelo 137bp, com 62,5% de frequência na população (dados não tabulados).

Os efeitos dos alelos para cada marcador testado se encontra na Figura 1. Nesta pode ser observado o efeito de cada alelo na característica de OPG, expresso como desvio em relação à média de OPG da população. Embora os alelos McM108\*114bp, TGLA137\*145bp, TGLA137\*141bp e TGLA137\*147bp tenham mostrado efeitos de -22,5%, +41,9%, 25,1% e -32,7%, respectivamente, tais diferenças não foram significativas.

**Tabela 1.** Marcadores genéticos testados, localização no genoma ovino, número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

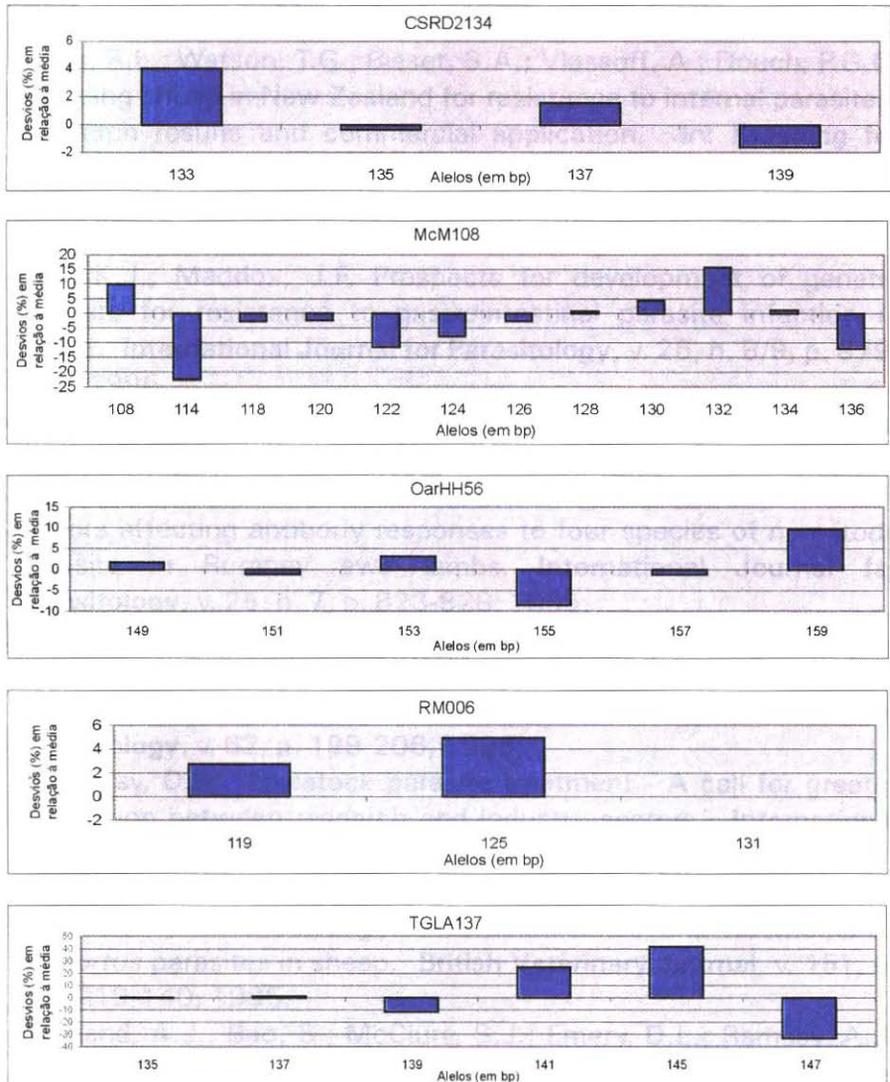
Marcadores	Cromossomo ovino	No. de alelos	PIC
CSRD2134	5	4	0,459
McM108	5	12	0,867
RM006	5	3	0,462
OarHH56	20	6	0,689
TGLA137	5	6	0,208

### Conclusões

Os resultados obtidos até o momento mostram que há diversidade genética da população estudada para os marcadores analisados, sendo este um ponto primordial para a avaliação de associações entre genótipos e característica de interesse.

Até o momento, com os marcadores testados, não houve associação entre os mesmos e a característica de OPG.

**Figura 1.** Efeito alélico dos marcadores testados na característica de OPG, valores expressos como desvio em relação à média populacional





## Referências

- Alberts, G.A.A.; Gray, G.D.; Piper, L.R.; Barker, J.S.F.; Le Jambre, L.F.; Barger, I.A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in young Merino sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 17, p. 1355-1363, 1987.
- Baker, R.L.; Watson, T.G.; Bisset, S.A.; Vlassoff, A.; Douch, P.G.C. Breeding sheep in New Zealand for resistance to internal parasites: Research results and commercial application. In: **Breeding for Disease Resistance in Sheep**. (Gray, G.D.; Woolaston, R.R. eds.), p. 19-32. Wool Research and Development Corporation, Melbourne, 1991.
- Beh, K.J.; Maddox, J.F. Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8/9, p. 879-897, 1996.
- Cox, F.E.G. Designer vaccines for parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1147-1157, 1997.
- Douch, P.G.C.; Green, R.S.; Morris, C.A.; Hickey, S.M. Genetic factors affecting antibody responses to four species of nematode parasite in Romney ewe lambs. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 823-828, 1995.
- Echevarria, F.; Borba, M.F.S.; Pinheiro, A.C.; Waller, P.J.; Hansen, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199-206, 1996.
- Hennessey, D.R. Livestock parasite treatment - A call for greater interaction between research and industry sectors. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1129-1133, 1997.
- Hohenhaus, M.A.; Outteridge, P.M. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus columbriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 2, p. 119-140, 1995.
- Husband, A.J.; Bao, S.; McClure, S.J.; Emery, D.L.; Ramsay, A.J. Antigen delivery strategies for mucosal vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8/9, p. 825-834, 1996.

Johnstone, I.L. The comparative effect of parasites on liveweight and wool production in maturing Merino wethers in two environments. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, v. 12, p. 273, 1978.

McEwan, J.C.; Mason, P.; Baker, R.L.; Clarke, J.N.; Hickey, S.M.; Turner, K. Effect of selection for productive traits on internal parasite resistance in sheep. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 52, n. 53-56, 1992.

McEwan, J. **WormFEC - Breeding sheep resistant to roundworm infection: Breeders' Manual**. AgResearch Invermay, Mosgiel, New Zealand, 1994.

Nari, A.; Salles, J.; Gil, A.; Waller, P.J.; Hansen, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 213-222, 1996.

Piper, L.R. Genetic variation in resistance to internal parasites. In: **Merino Improvement Program in Australia**. (McQuirk, B.W. ed.), p. 351-363. Australian Wool Corporation, 1987.

Templeton, A.R. The general relationship between average effect and average excess. **Genetics Research**, v. 49, p. 69-70, 1987.

Watson, T.G.; Baker, R.L.; Harvey, T.G. Genetic variation in resistance or tolerance to internal nematode parasites in strains of sheep at Rotomahana. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 46, p. 23-26, 1986.

Whitlock, H.V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting techniques and apparatus. **J. Council Sci. Indust. Res.**, v. 21, p. 177-180, 1948.

Woolaston, R.R.; Baker, R.L. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8/9, p. 845-855, 1996.

Woolaston, R.R. Genetic improvement of resistance to internal parasites in sheep. **Wool Technology and Sheep Breeding**, March/April, p. 1-6, 1990.

Woolaston, R.R.; Manuelli, P.; Eady, S.J.; Barger, I.A.; Le Jambre, L.J.; Banks, D.J.D.; Windon, R.G. The value of circulating eosinophil count as selection criterion for resistance of sheep to *Trichostrongyle* parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 123-126, 1996.