Documentos

ISSN 0103-376X Dezembro 2004 **54**

Marcadores genéticos como indicadores de resistência a parasitos gastrintestinais em ovinos-Resultados finais em rebanhos comerciais



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio Presidente

Clayton Campanhola Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast Alexandre Kalil Pires Sérgio Fausto Urbano Campos Ribeiral Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca Herbert Cavalcante de Lima Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa Diretores-Executivos

Embrapa Pecuária Sul

Ana Mirtes de Souza Trindade Chefe-Geral

Rita Helena Teixeira Garcia Chefe-Adjunto de Administração

Fernando Flores Cardoso Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pasquisa de Pacuária dos Campos Subvasileiros Ministério da Agricultura, Pacuária e Abastecimento

Documentos 54

Marcadores genéticos como indicadores de resistência a parasitos gastrintestinais em ovinos -Resultados finais em rebanhos comerciais

Magda Vieira Benavides Ana Maria Sastre Sacco Marcos Flávio da Silva Borba 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

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Magda Vieira Benavides

Secretário-Executivo: Ana Maria Sastre Sacco

Membros: Carlos José Hoff de Souza

Renata Wolf Suñé Rosângela Costa Alves

Teresa Cristina Moraes Genro

Supervisor editorial: Teresa Cristina Moraes Genro / Ana Maria Sastre Sacco

Tratamento editorial: Maria Bartira Nunes Costa Taborda

Editoração eletrônica: Oscar Castro

1ª edição

1ª impressão (2004): 100 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).

Benavides, Magda Vieira.

Marcadores genéticos como indicadores de resistência a parasitos gastrintestinais em ovinos: resultados finais em rebanhos comerciais. / Ana Maria Sastre Sacco, Marcos Flávio da Silva Borba. -- Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2004.

19 p. -- (Embrapa Pecuária Sul. Documentos, 54).

ISSN - 0103 - 376X

 Ovinocultura - Doença. I. Sacco, Ana Maria Sastre. II. Borba, Marcos Flávio da Silva. III. Título. IV. Série.

CDD 636.3

Autores

Magda Vieira Benavides Zoot., PhD. Embrapa Pecuária Sul E-mail: magda@cppsul.embrapa.br

Ana Maria Sastre Sacco Méd. Vet., Dr. Embrapa Pecuária Sul E-mail: anasacco@cppsul.embrapa.br

Marcos Flávio da Silva Borba Méd. Vet., PhD. Embrapa Pecuária Sul E-mail: mborba@cppsul.embrapa.br

Sumário

a parasitos gastrintestinais em ovinos - Resultados	
finais em rebanhos comerciais	7
Justificativa	7
Materiais e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões	15
Referências Bibliográficas	15
Glossário	17

Marcadores genéticos como indicadores de resistência a parasitos gastrintestinais em ovinos - Resultados finais em rebanhos comerciais

Magda Vieira Benavides Ana Maria Sastre Sacco Marcos Flávio da Silva Borba

Justificativa

A verminose ovina vem sendo apontada como um sério entrave à ovinocultura. O elevado número de dosificações incrementa custos e, ainda aliado ao problema da crescente resistência antihelmíntica, torna o problema da verminose ainda mais limitante ao desenvolvimento da ovinocultura no País. Uma alternativa para contornar este panorama é a seleção de animais geneticamente resistentes a helmintos, que tem levado vários institutos de investigação e produtores de rebanhos comerciais a investir nesta perspectiva.

A estratégia de ação que vem sendo utilizada em alguns países é a seleção artificial de ovinos mais resistentes via métodos tradicionais onde, anualmente, ovinos são desafiados para identificar o grau de resistência/susceptibilidade (fenótipo) e os animais são testados com base nos dados de contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Esta estratégia tem servido para reduzir o número de dosificações nos rebanhos, porém ela ainda possui o limitante de que os animais têm que ser desafiados para identificar seu fenótipo.

Outra estratégia de ação é a identificação de animais resistentes/ susceptíveis sem o problema dos desafios anuais dos ovinos frente aos helmintos. Neste sentido, a Embrapa Pecuária Sul vem trabalhando desde 1997 em testes para identificar marcadores genéticos associados a parasitas gastrintestinais. Esta estratégia inicia com desafios de campo, assim como na seleção quantitativa, porém possibilita associar o fenótipo de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) a marcadores genéticos. Isto permite que o fenótipo seja não mais determinado pelo OPG de cada indivíduo mas sim através de marcadores genéticos associados a resistência. Isto também possibilitará ao produtor uma seleção precoce dos animais de genótipos desejados, redução de custos com o controle sanitário do rebanho e auxiliará a pesquisa na descoberta dos mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência ovina aos helmintos.

Pesquisas em outros países têm focalizado suas atenções nos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), localizados no cromossomo 20 ovino, que estão envolvidos na regulação e desencadeamento de respostas imunológicas e têm sido particularmente estudados devido a sua alta variabilidade genética (alto polimorfismo). Schwaiger et al. (1995) encontraram associações entre uma variante (alelo) de um gene do MHC (o gene DRB1) e reduções de OPG em cordeiros da raca Scottish Blackface naturalmente infectados por Teladorsagia circumcincta. Mais tarde Buitkamp et al. (1996) também encontraram associação entre algumas variantes de dois outros genes do MHC (os genes MHC de classe I e DY) e redução de OPG neste mesmo rebanho. Outteridge et al. (1985) observaram associações entre resistência a Trichostrongylus colubriformis e o gene do MHC de classe I em animais resultantes de seleção divergentes (seleção para alto OPG e seleção para baixo OPG). No entanto, em um estudo posterior não foi encontrada associação entre este mesmo gene e animais selecionados para baixo OPG (Outteridge et al., 1986). Da mesma forma Cooper et al. (1989) e Crawford et al. (1997) não encontraram efeitos entre o MHC e a susceptibilidade de ovinos a parasitos gastrintestinais. Ainda que alguns resultados tenham sido contraditórios, estes estudos são importantes uma vez que indicam a possibilidade real de uma futura seleção de animais resistentes a parasitos gastrintestinais assistida por marcadores.

O estudo de genes que codificam proteínas envolvidas com mecanismos imunológicos outros que aqueles do complexo de imunocompatibilidade principal (MHC) e resistência às infecções por helmintos têm sido escassamente realizados. É conhecido que a resistência animal frente aos parasitos depende de mecanismos imunológicos complexos e é improvável que exista somente um gene principal que afete a resistência do hospedeiro. Estudos em camundongos têm sugerido que respostas tais como eosinofilia, mastocitose e altos níveis de imunoglobulina E (IgE) são os principais mecanismos para a defesa do hospedeiro contra o parasitos gastrintestinais (Finkelman et al., 1991; Finkelman & Urban, 1992; Finkelman et al., 1997). Estes fatores são dependentes da expressão das interleucinas 3, 4 e 5 (IL-3, IL-4 e IL-5), que são citocinas localizadas no cromossomo 5 ovino (http://www.theark.org/anubis).

Com base nesta informação, foi realizado na Embrapa Pecuária Sul um projeto de pesquisa utilizando rebanhos comerciais das raças Corriedale e Ideal com o objetivo de identificar ovinos resistentes e suscetíveis para a característica de OPG. Todos os animais foram caracterizados para marcadores localizados nos cromossomos 5 e 20, indicados pela literatura como sendo cromossomos onde se localizam genes importantes que codificam proteínas envolvidas na resposta imune.

Material e Métodos

Cordeiros (sete meses de idade) das raças Corriedale e Ideal oriundos da Embrapa Pecuária Sul em Bagé, RS, foram monitorados durante três procedimentos sucessivos chamados de ´desafio de campo´ (McEwan, 1994). Este desafio consistiu em:

- (a) dosificação para zerar OPG,
- (b) monitoramento semanal de OPG em 5% dos animais do rebanho,
- (c) coleta de amostra de fezes individual quando o grupo atingiu OPG acima de 800 e
- (d) nova dosificação.

Ao final do experimento de campo foram coletadas amostras de sangue (5ml de sangue em tubo com anticoagulante) de cada animal para extração de DNA.

A determinação de OPG foi realizada pela técnica de McMaster modificada (Whitlock, 1948). O DNA¹ de cada animal foi extraído dos leucócitos das amostras de sangue e foi amplificado com primers dos

marcadores BM1815, CRSD226, CRSD2134, CSRD2138, IL2RA, McM108, OarAE129, OarHH56, OMHCI, RM006, TGLA137, e TGLA176. Este processo foi realizado através da técnica de PCR e os resultados visualizados em gel de poliacrilamida corados com brometo de etídeo.

Análises de associação entre as variantes de cada um dos marcadores utilizados e a característica de OPG médio (média de OPG dos três desafios) foram realizadas através de metodologia descrita por Templeton (1985). Valores de OPG transformados em logaritmo foram utilizados na análise estatística, no entanto os resultados serão aqui demonstrados com base no OPG para melhor compreensão.

1. Considerando os seguintes resultados como exemplo:

Animal	Variantes para o marcador 'X'	OPG médio do animal
001	AA ¹	200
002	AB	300
003	BB	400
004	GG	1200
005	GH	700
006	HH	200
007	AH	?

¹ Também chamado de genótipo. Cada animal recebe uma variante (alelo) do pai e outra da mãe.

- As análises estatísticas agrupam os resultados de OPG por variante e verificam o efeito que cada variante tem sobre a característica de OPG.
- 3. No caso da Tabela acima poderíamos propor que:
 - a cada variante A herdada (do pai ou da mãe) também seria herdado um OPG de 100, portanto o animal 001 herdou uma variante A do pai e outra A da mãe e apresentou um OPG médio de 200;
 - a cada variante B herdada acompanha um OPG médio de 200, portanto o animal 002 (AB) herdou 100 da variante A (repassada

ou do pai ou da mãe) + 200 da variante B (repassada ou do pai ou da mãe);

- a cada variante G herdada é também herdado um OPG de 600, portanto o animal 004 possui OPG de 1200 [600 (G) + 600 (G)];
- Assim sendo qual seria o OPG esperado para o animal 007?

Estes exemplos são hipotéticos e somente servem como esclarecimento geral. Não levam em consideração efeitos ambientais nem efeitos de combinação genética que normalmente afetam as características fenotípicas.

Resultados e Discussão

Os resultados de média de OPG para os dois rebanhos (Tabela 1) são bastante altos e demonstram claramente a necessidade de buscar alternativas para o problema da verminose. Estas médias são mais altas do que normalmente o produtor encontra no seu rebanho, pois a metodologia utilizada teve por objetivo propiciar que os animais sofressem uma efetiva infecção. Além disto os animais retornaram ao mesmo potreiro pós dosificação. Em situações de rebanho comercial o produtor é recomendado a dosificar seu rebanho quando a média de OPG do rebanho está acima de 500 e a fazer rodízios para ajudar no controle da verminose.

Entre os marcadores genéticos testados, somente os microsatélites CSRD2138, OarAE129 e TGLA176 mostraram diferenças significativas para o rebanho Corriedale. Sete variantes destes marcadores foram associadas com OPG dos animais do rebanho Corriedale, sendo que seus efeitos variaram de -28 a +20%, com relação a média da população.

Para o rebanho Ideal, quatro variantes do CSRD2138 e TGLA176 tiveram associações significativas com logOPG e seus efeitos variaram de -22 a -5%, com relação a média da população.

Tabela 1. Médias (± desvio padrão) de OPG dos três desafios de campo sucessivos nas duas populações estudadas.

	No. animais	OPG (ovos/gra	ma de fezes)
		Média ± DP	Amplitude
Corriedale	48	3.317±1.736	567 - 10.366
Ideal	82	2.714±1.005	733 - 7.266

Os efeitos das variantes para os marcadores CSRD2138, OarAE129 e TGLA176, por raça, estão apresentados nas Tabelas 2-4. Nesta pode ser observado o efeito de cada variante na característica de OPG, expresso como desvio em relação à média de OPG da população.

Tabela 2. Médias de OPG para cada variante do marcador CSRD2138 para os rebanhos Corriedale e Ideal e efeito de cada variante na característica de OPG (medido como desvio em % da média geral do rebanho).

Variante do marcador CSRD2138	OPG médio de cada variante		Efeito de cada variante do marcador (desvio em % da média geral do rabanho)	
	Corriedale	Ideal	Corriedale	Ideal
Α	2011*	1900*	-28.42	-22.19
В	2033	2544	-5.93	-13.37
C	3715	2803	0.67	1.22
D	3758	3233	2.10	3.65
E	3956*	2354*	4.45	-4.56
F	2983	3242	-2.58	2.13
G	2592	3112	-1.11	3.95
Н	3622	1931*	5.45	-10.33
1	n.o.	3458	n.o.	10.33
Média geral	3364	2835		

^{*} Efeito significativo ao nível de 5%; n.o. = variante não observada na população.

Tabela 3. Médias de OPG para cada variante do marcador OarAE129 para os rebanhos Corriedale e Ideal e efeito de cada variante na característica de OPG (medido como desvio em % da média geral do rebanho).

Variante do marcador OarAE129	OPG médio de cada variante		Efeito de cada variante do marcador (desvio em % da média geral do rabanho)	
	Corriedale	Ideal	Corriedale	Ideal
Α	3278	2512	0.93	-4.57
В	3050	3317	1.24	2.74
C	3353	3154	-0.52	1.52
D	3495	2657	3.72	-0.91
E	3033	2361	-0.12	-4.88
F	2400*	n.o.	-16.09	n.o.
G	3818	3933	4.27	8.84
Н	3161	2596	0.54	-0.91
1	1217*	2697	-19.79	1.52
J	n.o.	2533	n.o.	3.05
Média geral	3280	2783		

^{*} Efeito significativo ao nível de 5%; n.o. = variante não observada na população.

Tabela 4. Médias de OPG para cada variante do marcador TGLA176 para os rebanhos Corriedale e Ideal e efeito de cada variante na característica de OPG (medido como desvio em % da média geral do rebanho).

Variante do marcador TGLA176	OPG médio de cada variante		Efeito de cada variante do marcador (desvio em % da média geral do rabanho)	
	Corriedale	Ideal	Corriedale	Ideal
Α	3642	2224*	5.17	-9.27
В	3735	2385	4.00	-5.37
C	2033*	2556	-10.38	-2.06
D	3873	2524	-3.00	-0.44
E	n.o.	2540	n.o.	-5.43
F	1800	n.o.	-1.19	n.o.
G	2833	3542	-9.32	7.13
Н	3433	2915	3.55	5.64
1	5833*	3033	20.09	4.77
J	2663	3000	-7.82	5.52
K	4104*	3169	9.35	1.67
L	1967	2466	-10.23	-1.37
Média geral	3338	2748		

^{*} Efeito significativo ao nível de 5%; n.o. = variante não observada na população.

A variante CSRD2138*A foi a única associada com reduções de OPG nos dois rebanhos. Como os animais testados eram na maioria não aparentados, estes resultados devem ser validados em um rebanho com várias famílias de genealogia conhecida.

Recentemente foram identificadas regiões cromossômicas associadas com OPG em seis famílias de meio-irmãos (Beh et al., 2002) originários a partir de cruzamentos entre duas linhas de seleção divergente (resistentes x suscetíveis para Trichostrongylus colubriformis). Uma região no cromossomo 6 foi associada com a resposta à infecção inicial: desafio com 20000 larvas de T. colubriformis e no cromossomo 3 para a reação à segunda infecção com o mesmo parasito. Neste trabalho que usou 133 marcadores dispersos em todos os 26 cromossomos autossômicos do ovino, o cromossomo 5 ovino foi representado por somente dois marcadores: McM527 e McM108, e não houve diferença significativa para o OPG. Estes dois marcadores estão situados próximos ao marcador OarAE129 mas estão distantes do CSRD2138 e TGLA176 (as distâncias entre os marcadores dentro do cromossomo ovino 5 são: Tala176 13.9 cM: CSRD2138 34.6 cM e OarAE129 115.4 cM: fonte: www.thearkdb.org/anubis). O marcador McM108 também foi analisado nos dois rebanhos estudados, porém não houve efeito significativo de nenhuma variante deste marcador e os dados de OPG, o que concorda com os dados obtidos por Beh et al. (2002). Apesar do trabalho de Beh et al. (2002) não ter encontrado diferença significativa entre o OPG e os marcadores testados para o OAR5 (McM527 e McM108), é impossível excluir a existência de associação entre alguma região do OAR5 e OPG.

Os resultados aqui encontrados são interessantes pois os marcadores CSRD2138 e TGLA176 estão situados próximos às regiões que codificam as proteínas interleucinas 3, 4 e 5. Estas proteínas são importantes uma vez que elas atuam como moduladoras do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasitos gastrintestinais (Finkelman et al., 1997) e são excelentes candidatos para um estudo de resistência genética.

Embora promissores, os resultados obtidos devem ser objeto de validação em um modelo experimental mais amplo, com famílias de

ascendência conhecida e com um maior número de observações para poder comprovar a utilidade das informações observadas no presente trabalho.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que o marcador CSRD2138 é um potencial marcador a ser utilizado na seleção de ovinos geneticamente resistente a parasitas gastrintestinais. O efetivo uso desse marcador depende de sua confirmação em análises de ligação com famílias de ovinos com pedigree conhecido.

Referências Bibliográficas

Beh, K.J.; Hulme, D.J.; Callaghan, M.J.; Leish, Z.; Lenane, I.; Windon, R.G.; Maddox, J.F. A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to Trichostrongylus colubriformis in sheep. **Animal Genetics**, v.33, p.97-106, 2002.

Buitkamp, J., Filmether, P., Stear, M.J., Epplen, J.T. Class I and class II major histocompatibility complex alleles are associated with faecal egg counts following natural, predominantly Ostertagia circumcincta infection. **Parasitology Research**, v.82, p.693-696, 1996.

Cooper, D.W., Van Oorschot, R.A.H, Piper, L.R., Le Jambre, L.F. No association between the ovine leukocyte antigen (OLA) system in the Australian Merino and susceptibility to Haemonchus contortus infestation. International Journal for Parasitology, v.15, p.101-109, 1989.

Crawford, A.M., McEwan, J.C., Dodds, K.G., Wright, C.S., Bisset, S.A., Macdonal, P.A., Knowler, K.J., Greer, G.J., Shaw, R.J., Paterson, K.A., Cuthbertson, R.P., Vlassof, A., Squire, D.R., West, C.J., Phua, S.H. Resistance to nematode parasites in sheep: how important are the MHC genes? Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet., v.12, p.58-62, 1997.

Finkelman, F.D.E., Pearce, E.J., Urban, J.F., Sher, A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses.

Parasitology Today, v.7, p.A62-A66, 1991.

Finkelman, F.D.E., Urban, J.F. Cytokines: making the right choice. **Parasitology Today**, v.8, p.311-314, 1992.

Finkelman, F.D.E., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C.A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., Urban, J.F. Cytokine regulation of host defence against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Ann. Rev. Immunol.**, v.15, p.505-533, 1997. http://www.theark.org/anubis

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

Outteridge, P.M., Windon, R.G., Dineen, J.K. An association between a lymphocyte antigen in sheep and the response to vaccination against the parasite Trichostrongylus colubriformis. International Journal for Parasitology, v.15, p.121-127, 1985.

Outteridge, P.M., Windon, R.G., Dineen, J.K., Smith, E.F. The relationship between ovine lymphocyte antigens and faecal egg count of sheep selected for responsiveness to vaccination against Trichostrongylus colubriformis. **International Journal for Parasitology**, v.16, p.369-374, 1986.

Schwaiger, F.W., Gostomski, D., Stear, M.J., Duncan, J.L., McKellar, Q.A., Epplen, J.T., Buitkamp, J. An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly Ostertagia circumcincta infection. International Journal for Parasitology, v.25, p.815-822, 1995.

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

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.

Glossário

Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) - Região do DNA que informa (codifica) proteínas que são diretamente responsáveis pela rápida rejeição de transplante entre indivíduos e que atuam na sinalização entre linfócitos e células apresentadoras de antígeno. Muito estudadas devido ao seu alto polimorfismo.

Cromossomo - Estrutura portadora dos genes, visível ao microscópico óptico.

Fenótipo - Toda a característica observada no animal.

Gene - Região do DNA que codifica a composição de uma determinada proteína.

Interleucinas - Grupo de moléculas envolvidas na sinalização entre células do sistema imune.

Marcador genético - É uma região variável de DNA, seja de seqüência que codifica proteína (exon) ou não (intron). O marcador genético é utilizado como referência de localização pois possui um único endereço no cromossomo.

Mutação - Alteração na composição (següência de bases) do DNA.

Polimorfismo - Causado por mutação. Resulta em diferenças nas bases de uma mesma següência de DNA.

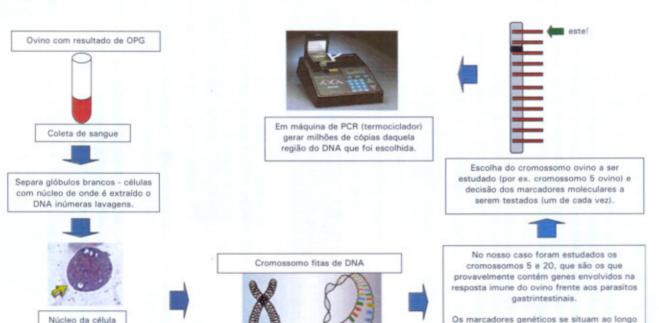
Variante (alelo) - Uma de várias formas alternativas de uma seqüência de DNA.

Exemplo: Duas mutações ocorreram na seqüência AAAA, gerando TAAA e GAAA. Esta seqüência é dita polimórfica (poli + formas) pois possui várias 'formas': a variante A, a variante T e a variante G.

Pergunta: Assim sendo qual seria o OPG esperado para o animal 007?

Resposta: 200.

Diagrama 1. Passos utilizados no laboratório de Genética Animal para analisar o DNA dos animais.



DNA: código genético de cada ovino.

Os marcadores genéticos se situam ao longo do cromossomo.

Todo o DNA ovino (genoma ovino) está distribuído em 26 pares de cromossomos (+ 1 cromossomo sexual).

Diagrama 1. Passos utilizados no laboratório de Genética Animal para analisar o DNA dos animais. (continuação...).



Após geradas as milhões de cópias daquela região do DNA...



Visualizar as variantes de cada ovino para o marcador genético testado.



Gel de poliacrilamida. Substrato no qual as variantes serão separadas por corrente elétrica por tamanho. É analisada a relação entre os grupos de variantes (de AB, AC, AD... até II) e os resultados de OPG.

Genótipo do ovino brinco 1 = CC (homozigoto) Genótipo do ovino brinco 2 = BG (heretozigoto)

Genótipo do ovino brinco 3 = AB (heterozigoto)

