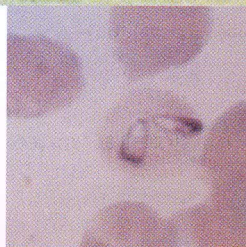
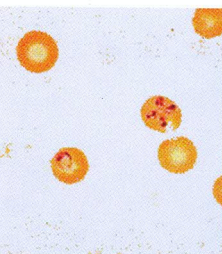


Resistência genética a hemoparasitos em bovinos



Documentos 58

Resistência genética a hemoparasitos em bovinos

Magda Vieira Benavides

Ana Maria Sastre Sacco

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul
BR 153, km 595 - Caixa Postal 242
96401-970 - Bagé, RS
Fone/Fax: (0XX53) 3242-8499
<http://www.cppsul.embrapa.br>
sac@cppsul.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Teresa Cristina Moraes Genro*
Secretário-Executivo: *Ana Maria Sastre Sacco*
Membros: Carlos José Hoff de Souza
Renata Wolf Suñe Martins da Silva
Rosangela Costa Alves
Eliane Mattos Monteiro

Supervisor editorial: Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul
Tratamento de ilustrações: Gráfica Instituto de Menores
Edição eletrônica: Gráfica Instituto de Menores

1ª edição

1ª impressão (2006): 2000 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).

S119c Benavides, Magda Vieira.

Resistência genética a hemoparasitos em bovinos / Magda Vieira

Benavides, Ana Maria Sastre Sacco, Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2006.

Magda Vieira Benavides e Ana Maria Sastre Sacco - Bagé:
Embrapa CPPSul, 2005.

23p. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos; 58).

ISSN 0103-376X

1. Bovinos. 2. Tristeza parasitária. 3. Variedade resistente.
4. Babesiose. I. Sacco, Ana Maria Sastre. II. Título. III. Série.

CDD 636.20896

Autores

Magda Vieira Benavides

Zootecnista, PhD., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970,
(0XX53) 3242-8499, magda@cppsul.embrapa.br

Ana Maria Sastre Sacco

Méd. Vet., Dra., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970,
(0XX53) 3242-8499, anasacco@cppsul.embrapa.br

Sumário

Introdução	9
Resistência Genética.....	10
Associação entre Tripanosomose e Resistência Genética em Bovinos e Camundongos	11
Associação entre Malária e Resistência Genética em Humanos e Camundongos	13
Que Marcadores Moleculares Estudar na Resistência do Hospedeiro Frente a Hemoparasitas?	16
Referências	18

Resistência genética a hemoparasitos em bovinos

Magda Vieira Benavides

Ana Maria Sastre Sacco

Um dos graves problemas sanitários da pecuária do Rio Grande do Sul é a tristeza parasitária bovina (TPB), doença causada por protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e por uma rickettsia do gênero *Anaplasma* (*A. marginale*). Estes protozoários e rickettsia são hemoparasitas, se localizam nas hemácias, e são transmitidos aos bovinos pelo carrapato comum do boi, o *Boophilus microplus*. Esta enfermidade causa prostração, febre, icterícia, anemia, anorexia, sintomatologia nervosa e, se não tratada, leva o animal à uma morte rápida. Os bovinos jovens, logo após o nascimento, são naturalmente mais resistentes a estes hemoparasitos do que os animais adultos sendo, assim, esta a faixa etária ideal para que ocorra o processo de imunização, tanto natural quanto induzido. Também existe uma diferença de sensibilidade em relação a espécie bovina sendo que os animais *Bos taurus* (origem européia) são mais sensíveis a doença do que os animais *Bos indicus* (origem zebuína).

A doença é portanto prevalente em regiões onde se encontra o *B. microplus*, ou seja, em áreas geográficas localizadas entre os paralelos 32°N e 32°S. Nestas áreas, o contato constante do bovino jovem, a partir do nascimento, com o carrapato permite uma imunização natural contra os agentes causadores da TPB. Nas regiões próximas aos paralelos 32°N e 32°S há uma diminuição das condições favoráveis ao desenvolvimento do *Boophilus*, que passa a ter presença descontínua ao longo do ano impedindo e/ou dificultando a imunização efetiva dos bovinos. Nestas regiões, consideradas regiões marginais, caracterizadas pela presença descontínua do carrapato, é comum a ocorrência de surtos de TPB em função dos bovinos receberem altas cargas de hemoparasitas em certas épocas do ano, ou mesmo infestações leves em animais adultos não previamente imunizados. Surtos em rebanhos sensíveis causam alta morbidade com perdas produtivas em termos de perda de peso, atraso no crescimento e abortos, conseqüências importantes da TPB porém que não são facilmente mensuráveis pelos produtores. Além disso, os surtos de babesiose podem provocar índices de mortalidade superiores a 50%, o que junto aos outros fatores torna a TPB um dos principais entraves para a produtividade e lucratividade dos rebanhos de corte e leite da Região Sul

do Brasil, principalmente no sul do Rio Grande do Sul, região marginal para o desenvolvimento do *Boophilus*, de grande produção pecuária com predominância de gado de origem européia. Em recente diagnóstico da pecuária bovina de corte do RS realizado pelo SEBRAE/SENAR/FARSUL (2005) foi constatado que 83% dos produtores não fazem prevenção contra a TPB, 9,1% pré-imunizam e 7,9% vacinam. Em média 39% dos produtores entrevistados possuem problema com a enfermidade, com uma perda média de 5,7 animais por ano, chegando a casos extremos como a morte de 83 animais em uma só propriedade no período de um ano.

Os métodos de imunização disponíveis (pré-imunização e vacinação com cepas atenuadas) estão baseados no processo infecção-resposta imune, o que sempre apresenta risco aos animais. Estes riscos incluem o desenvolvimento da doença que pode ser grave quando o inóculo é altamente virulento, a não-imunização quando são usados inóculos insuficientes ou mortos, e os riscos inerentes ao uso de sangue como veículo, como a transmissão/disseminação de outros agentes patogênicos. É interessante salientar o exemplo da leucose bovina, hoje endêmica na região, considerada por muitos como tendo sido provavelmente introduzida pela prática da pré-imunização tradicional feita ao longo de muitos anos no Rio Grande do Sul sem maior controle sanitário dos doadores de sangue.

Assim, é importante que sejam encontradas alternativas seguras de auxílio no controle da TPB, como vacinas de sub-unidade (ou recombinantes) eficientes e um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune dos bovinos, determinados '*in vivo*', para a sua utilização como ferramenta auxiliar no controle da doença.

O objetivo desta Série Documentos é apresentar os resultados parciais do experimento que está sendo desenvolvido no tema de resistência genética de bovinos a *Babesia bovis* na Embrapa Pecuária Sul e também apresentar resultados de pesquisas na área de resistência a hemoparasitos em mamíferos realizados por outros grupos de pesquisa.

Resistência genética

A resistência de indivíduos frente a infecções provocadas por parasitos tem sido observada em vários rebanhos. Animais que foram sucessivamente expostos a determinados patógenos possuem maior probabilidade de ter um sistema imune mais desenvolvido para combater ou suportar aquela infecção. No entanto existe ampla variedade individual na resposta dos hospedeiros, alguns animais nunca desenvolvem

imunidade, apesar de serem expostos aos patógenos, e outros são refratários à infecção mesmo no primeiro contato com o patógeno. Este último aspecto é chamado de resistência genética, há evidências de ser repassada de geração em geração e por isso possui interesse no estudo de doenças veterinárias de alta mortalidade e morbidade.

A identificação de variações (polimorfismos) nos genes que determinam a resistência ou a sensibilidade dos animais a uma determinada doença é de grande importância pois permite a seleção de animais resistentes e também possibilita uma maior compreensão dos mecanismos que atuam na resistência/susceptibilidade a patógenos. Também abre possibilidades, a longo prazo, do desenvolvimento de imunomoduladores efetivos, ou seja, proteínas do sistema imune que, se administradas em animais suscetíveis, confirmam proteção frente a determinada enfermidade.

Trabalhos com babesiose são inexistentes na área de genética animal, porém estudos de QTLs (do inglês *Quantitative Trait Loci*), ou seja, regiões (marcadores ou genes) do cromossomo que estão associadas a outras hemoparasitoses como tripanosomose e malária podem contribuir para o avanço do conhecimento no sentido de indicar regiões do genoma com maior probabilidade de afetar o desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro frente às hemoparasitoses.

Associação entre tripanosomose e resistência genética em bovinos e camundongos

Assim como a babesiose provoca perdas produtivas e mortes em bovinos criados nas regiões marginais para a presença do carrapato *Boophilus microplus*, a tripanosomose bovina tem grande importância econômica em regiões onde a mosca tsé-tsé (*Glossinia* sp), vetor dos hemoprotozoários extracelulares *Trypanosoma brucei brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*, é prevalente (África Equatorial). Ambos hemoparasitos causam sintomas como anemia, perda de peso e abortos, porém a tripanosomose também causa linfadenopatia e caquexia em animais sensíveis que podem permanecer infectados por meses ou anos. Ambos parasitos são responsáveis pela perda de bilhões de dólares por ano. Algumas raças bovinas como a N'Dama e a West African (Roberts & Gray, 1973; Roelants, 1986; Doko *et al.*, 1991) possuem a característica de ser 'resilientes' ou 'tripanotolerantes', que é a capacidade de um indivíduo manter-se produtivo apesar de estar infectado com o tripanosoma. Como não há vacina para esta enfermidade e a quimioterapia e o controle do vetor têm problemas de resistência às drogas, a base genética da 'tripanotolerância' está sendo investigada com o objetivo de ser utilizada como uma forma

alternativa no controle da enfermidade.

O Laboratório Internacional de Pesquisa em Enfermidades Animais (ILRAD, atualmente chamado de ILRI) tem realizado inúmeras pesquisas visando identificar o mecanismo imune do bovino frente a tripanosomose e a obtenção de marcadores genéticos associados com a característica de 'tripanotolerância'. Os passos para a identificação de genes de interesse foram: criar populações com ampla variabilidade para os níveis de resposta frente ao parasito partindo do cruzamento de raças ou linhagens resistentes e suscetíveis; testar marcadores moleculares para localizar regiões genômicas associadas com a resistência/susceptibilidade à tripanosomose (identificação de QTLs); uma vez encontrada uma área onde há associação significativa, aumentar a densidade de marcadores moleculares na região genômica de interesse e testar genes candidatos naquela região. Desta forma é possível explorar cada vez mais a região genômica de modo a identificar o(s) gene(s) que causa(m) o fenótipo.

Como estratégia de trabalho, experimentos sobre resistência genética à tripanosomose estão sendo realizados em camundongos. Como esta espécie possui menor intervalo de gerações, maior número de progênie e um mapa genético bastante saturado, comparado com a espécie bovina, será possível identificar as possíveis regiões de interesse nos camundongos e depois, por genômica comparativa, identificá-las nos bovinos. Jennings *et al.* (1978) e Morrison & Murray (1979) observaram que várias linhagens de camundongos apresentavam variação fenotípica de resposta a tripanosomose quando estes eram infectados experimentalmente com o parasito. Assim, camundongos de linhagens 'suscetíveis' (BALB/c e A/J) foram cruzados com linhagem 'resistente' (C57BL/6J) para formar uma população F² para o estudo de genes associados a tripanosomose. Os primeiros resultados dos estudos de QTL mostraram 3 QTLs nos cromossomos 1, 5 e 17 na população BALB/c_C57BL/6J e 2 QTLs nos cromossomos 5 e 17 da população A/J_C57BL/6J como regiões do cromossomo murino que estão associadas a uma maior resistência dos camundongos frente ao desafio por *Trypanosoma congolense* isolado ILNat3.1 (Kemp *et al.*, 1997). O QTL localizado no cromossomo 17 foi o mais relevante, pois explicou 15% e 9% da variação total encontrada nas populações BALB/c_C57BL/6J e A/J_C57BL/6J, respectivamente. Em trabalhos posteriores, Clapcott *et al.* (2000) observaram que o QTL do cromossomo murino 17 apresentava uma segregação que dependia do genótipo do pai ('*imprinting*' genômico) uma vez que duas populações com pais F¹ e mães BALB/c tiveram uma taxa de sobrevivência mais alta comparada às duas populações com pais BALB/c e mães F¹.

Usando metodologia similar a dos camundongos, bovinos N'Dama ('tripanotolerante') foram acasalados com bovinos da raça Boran ('tripanosensível') para formar uma população F_2 onde as diferentes respostas dos indivíduos foram medidas após inoculação com *T. congolense*. A população bovina delineada para estudar QTLs em tripanosomose foi originada de 4 famílias F_1 N'Dama x Boran e gerou 177 animais F_2 . Aos 12 meses de idade, todos os animais, mais seis animais de cada raça parental, foram expostos a moscas tsé-tsé (*Glossinia morsitans centralis*) infectadas com *T. congolense* (mesmo clone usado para o trabalho em camundongos). O monitoramento da infecção foi realizado até que o volume globular (medida de anemia) dos animais atingisse 12% ou até 150 dias pós-inoculação. A população foi caracterizada para 477 marcadores moleculares e as análises mostraram 16 QTLs em 15 cromossomos (dois deles no cromossomo bovino 16). As características associadas com as regiões genômicas foram: volume globular, carga parasitária e peso corporal (Hanotte *et al.*, 2003).

Trabalhos como o de Kemp *et al.* (1997) e Hanotte *et al.* (2003) são importantes para mostrar quais regiões genômicas são interessantes de serem testadas na resistência do hospedeiro de outras espécies animais à hemoparasitos. É interessante notar que no segundo trabalho foi possível verificar que além de regiões genômicas relacionadas com a carga parasitária, também haviam regiões relacionadas com características de peso corporal e principalmente de controle de anemia. Os autores discutem a possibilidade de que fatores não-imunológicos, como os de adaptação e de hematopoiese também possam ser igualmente importantes no mecanismo de controle da infecção de hemoparasitos pelos hospedeiros.

Associação entre malária e resistência genética em humanos e camundongos

Um fator positivo na pesquisa com *Babesia* é a sua estreita relação com o gênero *Plasmodium*, causador da malária em humanos e em outras espécies animais, uma vez que ambos pertencem ao filo Apicomplexa. Os gêneros *Babesia* e *Plasmodium* compartilham aspectos comuns como variação antigênica clonal, citoaderência e seqüestro de hemácias no sistema microvascular (Allred, 1998). Considerando a estreita relação filogenética e de patogenicidade entre os hemoparasitas dos gêneros *Babesia* e *Plasmodium*, é possível que os conhecimentos acumulados nos estudos em malária possam beneficiar os trabalhos de pesquisa com *Babesia* ssp.

Estudos em humanos identificaram uma série de fatores importantes que reduzem o risco de infecção pelo *Plasmodium* ou aumentam a susceptibilidade dos indivíduos à malária cerebral, como polimorfismo no gene da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), fator Duffy negativo, haplótipos do complexo de imunohistocompatibilidade principal e variações na região promotora do fator de necrose tumoral alfa (TNFalfa).

Há uma série de moléculas envolvidas na resistência de indivíduos à malária, a mais notória é o antígeno Duffy (DARC) receptor de citocinas, localizado na membrana dos eritrócitos. Hemácias de indivíduos Duffy negativo são refratárias a infecções por *Plasmodium vivax* (Livingstone, 1984), pois o antígeno Duffy é um receptor essencial para a entrada do parasita nas hemácias uma vez que interage com a proteína de ligação Duffy (DBP) dos merozoítos de *P. vivax* (Wertheimer & Barnwell, 1989). Consequentemente, hemácias Duffy negativas não permitem a ligação DBP-Duffy o que dificulta a invasão de merozoítos em eritrócitos.

Variação genética de Duffy (Fy^a e Fy^b) também foi observada em eritrócitos bovinos (Nakamoto *et al.*, 1998), sendo que há uma alta frequência de indivíduos Duffy negativo (Fy^{a-b}) em *Bos indicus* (86%), enquanto que somente 14% dos *Bos taurus* tem este fenótipo. Indivíduos *Bos indicus* são considerados mais resistentes à babesiose do que *Bos taurus* (James, 1988). Porém, traçando um paralelo com os resultados obtidos por Nakamoto e os estudos de que indivíduos resistentes à malária causada por *P. vivax* são Duffy negativo, seria esperado que apenas 14% dos zebuínos fossem afetados pela TPB. No entanto esta baixa porcentagem de infecção em zebuínos não é observada quando estes animais são utilizados para infecções experimentais e também não são raros os casos de surtos de babesiose em zebuínos a campo quando estes são criados na ausência do *Boophilus microplus* (Ana Maria Sacco, dados não publicados). Considerando tais aspectos, o antígeno Duffy não seria o único determinante da resistência à babesiose, nem em zebuínos nem em taurinos, e provavelmente outras proteínas do sistema imune teriam papel de maior importância neste processo.

Outros genes podem ser capazes de reduzir o risco de indivíduos frente à malária. Eritrócitos deficientes em glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), enzima fundamental no metabolismo da glicose, apresentam um reduzido risco de infecção pelo *Plasmodium* (Beutler, 1994), uma vez que células deficientes nesta enzima inibem o crescimento do parasita nos primeiros ciclos da infecção (Beutler, 1994; Ruwende & Hill, 1998). Em humanos existem sete alelos para G6PD sendo que o alelo G6PD A- está associado com uma atividade enzimática média de 12% (variando entre 0 a 25%) e acredita-se que confira proteção à malária em populações africanas

(Ruwende *et al.*, 1995).

Genes do complexo de histocompatibilidade principal, tanto de classe I como de classe II, também têm sido associados com o grau de severidade de infecção em indivíduos parasitados por malária. Hill *et al.* (1991) encontraram que genótipos HLA-B53 e os haplótipos DRB1*1302 - DQB1*0501 protegiam indivíduos de malária severa.

Dentre as citocinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNFalfa) tem chamado atenção tanto pelo seu papel na defesa do hospedeiro quanto na patogenia da malária cerebral em humanos. McGuire *et al.* (1994) encontraram que crianças homozigotas para o alelo TNF308A tinham aumentada susceptibilidade à malária cerebral. A região promotora deste gene apresenta três alelos em humanos e esta variabilidade seria determinante na diferença de expressão do TNFalfa, uma vez que cada alelo teria diferente nível de transcrição. A associação do TNF308A com malária também foi encontrada por Wattavidanage *et al.* (1999) e este alelo também foi associado com susceptibilidade a lepra, leishmaniose, tracoma e septicemia meningocócica (Abraham & Kroeger, 1999).

Estudos de QTL em uma população de Burkina Faso identificaram que a parasitemia do *Plasmodium falciparum* era controlada em parte por um QTL no cromossomo humano 5 (Rihet *et al.*, 1998). Em estudo realizado com uma população de 340 camundongos F₁ de linhagens A/J (suscetíveis) e C57BL/6J (resistentes) desafiados com *Plasmodium chabaudi*, Hernandez-Valladares *et al.* (2004) encontraram dois QTLs para resistência a malária nos cromossomos murinos 5 e 17. Comparando estes resultados com os de Kemp *et al.* (1997), é possível observar que a região do cromossomo 17 é similar para ambas as enfermidades, e até é possível que se trate do mesmo gene. No entanto somente uma maior saturação destas regiões em termos de marcadores e de genes será capaz de mostrar que o mesmo gene esteja atuando na resistência do camundongo à malária e à tripanosomose.

Dos estudos acima citados é possível sugerir que a resistência do hospedeiro à malária deva ser determinada por vários genes uma vez que se trata da resposta imune do hospedeiro frente a um patógeno, e a resposta imune geralmente depende de um sistema complexo e 'em cascata' onde são ativados e produzidos sucessivos processos celulares e proteínas. É portanto possível que a resposta imune frente a patógenos seja determinada por vários genes e não por um gene principal que determine 100% da variação na resposta.

Que marcadores moleculares estudar na resistência do hospedeiro frente a hemoparasitos?

Atualmente há duas abordagens para o estudo de associação entre genes e fenótipos: a 'varredura genômica' (ou 'genome wide-screening') que se baseia na análise de inúmeros marcadores moleculares situados equidistantes ao longo do cromossomo (geralmente não mais do que 20cM de intervalo) e a de 'genes candidatos', que utiliza o conceito de que polimorfismos nos genes que codificam proteínas importantes na fisiologia de uma dada característica são determinantes na produção desta. A primeira abordagem é extremamente onerosa e laboriosa uma vez que em torno de 200 marcadores moleculares devem ser testados para a população experimental a ser estudada. Por outro lado, a abordagem de genes candidatos tem a vantagem de concentrar o estudo em proteínas envolvidas no processo imunológico do animal frente à enfermidade. Seria de certa forma uma opção menos onerosa para encontrar, em um curto período de tempo, um marcador associado com a característica que se está estudando.

No caso específico da resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia*, é conhecido que o mecanismo requer tanto resposta inata como adquirida e é mediada pela resposta celular (principalmente macrófagos) e humoral (Brown, 2001). Eritrócitos infectados por *B. bovis* estimulam macrófagos a produzir óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas IL1 β e IL12, inibindo a replicação parasitária in vitro. Este processo também gera produção de interferon gama (IFN γ), que aliado ao TNF α , potencializa a ativação das células efectoras à fagocitose (Shoda *et al.*, 2000). Estas células e citocinas estimulam a resposta imune inata e adquirida à *B. bovis*. A resposta inata demonstra ser protetiva quando IL12 e IFN γ são produzidos antes que ocorra a produção de IL10 como evidenciado por Goff *et al.* (2001) em células de baço de terneiros de até 4 meses de idade. Por outro lado, se a IL10 é produzida antes, haverá um atraso ou mesmo inibição da resposta imune do indivíduo e este será incapaz de controlar a enfermidade. Portanto, não só a presença de certas citocinas mas quando estas são produzidas são fatores essenciais na resposta imune. É discutível apontar a citocina mais importante na resposta à babesiose mas o IFN γ certamente é uma das principais proteínas observadas de forma diferencial em animais com imunidade protetiva (East *et al.*, 1997). Assim, se polimorfismos existentes em outros genes que codificam proteínas envolvidas no sistema imune têm a capacidade de alterar a expressão desta citocina inflamatória, é possível que o indivíduo com determinado polimorfismo possa apresentar uma maior ou menor tolerância à infecção por *B. bovis*.

