

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**MAPEAMENTO DE QTL PARA RESISTÊNCIA A PARASITAS E
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO NOS CROMOSSOMOS
CINCO E SETE DE UMA POPULAÇÃO EXPERIMENTAL F₂ DE
BOVINOS GIR X HOLANDÊS**

GUSTAVO GASPARIN

SÃO CARLOS – SP

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**MAPEAMENTO DE QTL PARA RESISTÊNCIA A PARASITAS E
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO NOS CROMOSSOMOS
CINCO E SETE DE UMA POPULAÇÃO EXPERIMENTAL F₂ DE
BOVINOS GIR X HOLANDÊS**

GUSTAVO GASPARIN

Tese de doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G249mq

Gasparin, Gustavo.

Mapeamento de QTL para resistência a parasitas e características de crescimento nos cromossomos cinco e sete de uma população experimental F2 de bovinos Gir x Holandês / Gustavo Gasparin. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

81 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Genética animal. 2. Animais - melhoramento genético.
3. QTL. 4. Bovinos - parasitas. I. Título.

CDD: 591.15 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória de meu pai,
Antonio Sergio Gasparin

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, amiga e orientadora desde minha iniciação científica, por todos os ensinamentos, paciência (muita) e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório;

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução pelo auxílio na realização desse estudo;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida entre janeiro/2005 a fevereiro/2007;

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Genética e Evolução da UFSCar pelos conhecimentos transmitidos, assim como as secretárias do Programa pela atenção e amizade;

Ao Dr. Mário Luiz Martinez (*in memoriam*), principal responsável pela formação da população experimental utilizada neste estudo; Dr. Luiz Lehmann Coutinho, coordenador do projeto de mapeamento; Dr. Marcos Vinícius G. Barbosa da Silva, pela ajuda com os dados fenotípicos e parte estatística; Dr. Marco Antonio Machado e Ms. Ana Lúcia Campos pelo envio das amostras de DNA dos animais; Dr. Tad S. Sonstegard e Dra. Sabrina Machado pelas doações de primers; Ms. Waldomiro Barioni Júnior pela ajuda com o SAS e Dr. Maurício Mello de Alencar pelos ensinamentos e auxílios nas análises;

Aos meus pais, Antonio e Vera, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em minhas decisões. Sem vocês, esse trabalho jamais seria realizado; ao meu irmão Olavo, que mesmo sem dizer, sempre confiou em mim;

Ao Ms. Millor Fernandes do Rosário, pela ajuda com o CRI-MAP durante a construção dos mapas de ligação dos cromossomos estudados;

A todos aqueles que passaram pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste: Marcelo, Liliane, Gisele, Rogério, Adriana, João, Sarah, pela amizade, risadas e momentos de descontração;

À Ester, mulher que amo, que mais do que ninguém agüentou meu mau-humor, sempre me apoiando e incentivando. Obrigado pela compreensão e pela enorme paciência comigo.

Resumo

A enorme variabilidade fenotípica entre os bovinos *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*, os quais se separaram há centenas de milhares de anos atrás, e vêm sendo explorados desde então pelo homem através da seleção artificial de raças para corte e produção de leite, possibilita a formação de raças mestiças, pois não há isolamento reprodutivo entre essas subespécies. Sabe-se também que parte das diferenças observadas entre as raças para características produtivas e de resistência aos parasitas está sob controle genético, e que é possível distinguir animais geneticamente superiores aos demais da população com o uso combinado da genética molecular e do melhoramento animal tradicional. Uma vez que a economia do Brasil é grandemente influenciada pela agropecuária, somente a exportação de carne bovina gerou receita de US\$2,5 bilhões em 2004, a busca e identificação de regiões cromossômicas que controlem ao menos parte da variação dessas características quantitativas de interesse econômico (QTL, *Quantitative Trait Loci*), tais como peso ao nascimento e ganho de peso, e também regiões que influenciem a resistência aos parasitas, é de grande importância. O objetivo do presente estudo foi mapear QTLs para características de crescimento e de resistência à endoparasitas gastrintestinais e parasitas externos, como o carrapato (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) e o berne (*Dermatobia hominis*), utilizando marcadores microssatélites para fazer a varredura dos cromossomos cinco e sete dos bovinos, em uma população F₂ Gir x Holandês. No cromossomo cinco, detectamos a presença de um QTL significativo ($P < 0,01$) para peso ao nascimento e outro sugestivo ($P < 0,05$) para contagem de carrapato na estação chuvosa. No cromossomo sete, detectamos um indicativo de QTL ($P < 0,10$) para contagem de carrapato na estação seca. Em ambos os casos houve desvio significativo de dominância, sugerindo que parte da variação genética da característica deve ser atribuída à combinação de alelos. O alelo favorável para resistência do QTL no cromossomo cinco foi oriundo da raça Gir e o do cromossomo sete da raça Holandesa, fato surpreendente, dado que as raças zebuínas foram tradicionalmente consideradas como única fonte de resistência ao carrapato. Nenhum QTL foi associado à resistência aos endoparasitas gastrintestinais ou ao berne. A aplicação dessas informações depende ainda da redução do intervalo de confiança para a posição dos QTLs e validação em outras populações.

Abstract

The large amount of phenotypic variability between *Bos primigenius taurus* and *Bos primigenius indicus* cattle, which had diverged hundreds of thousands of years ago and since then have been explored by men through artificial selection of the breeds to milk and meat production, allows the development of crossbreeds, since there is no reproductive isolation between these subspecies. It is known that part of the described differences for productive and parasite resistance traits among the breeds is under genetic control, and that is possible to distinguish genetically superior individuals from the others of the population with the combined use of molecular genetics and traditional livestock production programs. Since in Brazil the economy is largely influenced by agribusiness, once bovine meat exportation alone generated US\$2.5 billion in 2004, the search and identification of chromosomal regions that control at least part of the variation of these quantitative economic traits (QTL, *Quantitative Trait Loci*), like birth weight and weight gain, and also regions that influence resistance to parasites, is of great concern. The objective of the present study was to map QTLs for growth traits and resistance to gastrointestinal endoparasites and external parasites, like the tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and the beef worm (*Dermatobia hominis*) using microsatellite markers to scan bovine chromosomes five and seven in a F₂ Gir x Holstein experimental population. On chromosome five, a significant ($P < 0.01$) QTL for birth weight and one suggestive ($P < 0.05$) for resistance to tick count during the rainy season were detected. On chromosome seven, it was identified an indicative QTL ($P < 0.10$) for tick count in the dry season. In both cases, a significant dominance deviation was observed, suggesting that part of the genetic variation must be attributed to allele combinations. The favorable allele for resistance in chromosome five was from the Gir parental and on chromosome seven, from Holstein, which is a surprising result, since the zebu breeds were traditionally considered as the solely source of tick resistance. No QTL was associated to resistance to endoparasites or to the beef worm. The application of these informations still demands the reduction of confidence intervals for the QTLs locations and validation in other populations.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Exemplo de fêmea da raça holandesa (<i>Bos primigenius taurus</i>).....	6
Figura 2 -	Exemplo de animal representante da raça Gir (<i>Bos primigenius indicus</i>).....	8
Figura 3 -	Imagem de um carrapato macho de <i>Rhipicephalus microplus</i> (A) e de uma fêmea ingurgitada ainda na pelagem do hospedeiro (B).....	15
Figura 4 -	(A) mosca adulta da espécie <i>Dermatobia hominis</i> ; (B) larvas de <i>Dermatobia hominis</i>	16
Figura 5 -	Exemplar de fêmea de <i>Cooperia</i> sp.....	17
Figura 6 -	Exemplar de macho de <i>Haemonchus</i> sp.....	18
Figura 7 -	O cruzamento dos parentais da raça holandesa acasalados com fêmeas dando origem à geração F ₁ , os quais apresentam grande homogeneidade fenotípica.....	33
Figura 8 -	Animais F ₁ cruzados para dar origem à geração F ₂ , a qual demonstra alta variabilidade fenotípica.....	33
Figura 9 -	(A) animais nas casinhas; (B) animais nos piquetes de capim-estrela.....	36
Figura 10 -	QTL para peso ao nascimento no cromossomo cinco.....	52
Figura 11 -	QTL para resistência ao carrapato no cromossomo cinco.....	59
Figura 12 -	QTL para resistência ao carrapato no cromossomo sete.....	60

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Origem e evolução dos bovinos	2
2.2. O gado Holandês	4
2.2.1. O frísio Holstein	5
2.2.2. O gado Holstein Friesian no Brasil	6
2.3. O Gado Gir	7
2.4. Principais diferenças entre <i>Bos primigenius indicus</i> e <i>Bos primigenius taurus</i>	9
2.5. Os parasitas	12
2.5.1. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
2.5.2. A mosca <i>Dermatobia hominis</i> (Diptera: Cuterebridae)	15
2.5.3. Endoparasitas: <i>Cooperia</i> spp e <i>Haemonchus</i> spp	17
2.6. Mecanismos genéticos da resistência aos parasitas	19
2.6.1. O sistema imune e os parasitas	19
2.6.2. Interleucina-4 (IL-4) e interferon gamma (IFN- γ): atuação no sistema imune	20
2.6.3. Carrapatos e sistema imune	21
2.6.4. Endoparasitas e sistema imune	22
2.7. Marcadores moleculares	24
2.7.1. Marcadores microssatélites	25
2.8. Detecção de QTL	26
3. OBJETIVO	31
4. METODOLOGIA	32
4.1. Delineamento experimental	32
4.2. Avaliação das medidas de crescimento dos animais	34
4.3. Avaliação da resistência genética dos bovinos ao carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> e ao berne (larva da mosca <i>Dermatobia hominis</i>)	34
4.4. Avaliação da resistência à verminose	35
4.5. Identificação genotípica dos animais	37

4.5.1. Extração de DNA	37
4.5.2. Amplificação dos marcadores microssatélites e análises genotípicas	38
4.6. Construção do mapa de ligação dos cromossomos cinco e sete	41
4.7. Detecção de QTLs	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Análises genotípicas	45
5.2. Mapas de ligação	48
5.3. QTLs para características de crescimento	51
5.4. Mapeamento de QTLs para resistência a parasitas	54
5.4.1. Endoparasitas	54
5.4.2. Ectoparasitas	55
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. Introdução geral

O Brasil está se destacando no cenário internacional no setor agropecuário. Com 165 milhões de cabeças de gado, é o maior rebanho comercial do mundo (ANUALPEC, 2004). Em 2003, as exportações de carne bovina brasileira somaram 1,3 milhão de toneladas, com receitas de US\$ 1,51 bilhão. Em 2004 esses números cresceram para 1,854 milhão de toneladas, o que gerou receitas de US\$ 2,457 bilhões (AGRInforma, 2005). As exportações brasileiras de produtos lácteos também vêm se destacando. Em janeiro de 2005, renderam ao país US\$ 11,5 milhões, o que representa um crescimento de 258,8% na comparação com os US\$ 3,2 milhões registrados em igual período do ano passado. Em volume, as exportações de lácteos atingiram 6,6 mil toneladas, 160% a mais que as 2,5 mil toneladas de janeiro de 2004.

Apesar dos números favoráveis, a busca por animais mais produtivos e a redução das perdas decorrentes de infestações por parasitas é uma constante entre os produtores, pois o desempenho agrícola dos países situados em regiões tropicais é muito inferior aos países de clima temperado (Hammond, 1994).

Características de crescimento e resistência aos parasitas são consideradas quantitativas, pois além de serem poligênicas, com vários locos gênicos influenciando sua expressão, também são grandemente influenciadas pelo ambiente no qual o animal se desenvolve.

É possível mapear regiões cromossômicas que controlam pelo menos parte da variabilidade fenotípica para essas características nos bovinos, caso utilizemos uma população experimental bem delineada, como é o caso da população experimental F₂ de bovinos mestiços Holandês (*Bos primigenius taurus*) x Gir (*Bos primigenius indicus*) juntamente com uma metodologia estatística própria para tal.

O presente estudo faz parte de um projeto maior, cujo início da execução ocorreu em 1995, coordenado pelo Dr. Mário Luiz Martinez, melhorista animal e pesquisador da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), e tem por objetivo realizar o mapeamento de QTLs

(*Quantitative Trait Loci*, locos de características quantitativas) para características de crescimento do animal e resistência contra parasitas, utilizando a metodologia de mapeamento por intervalos com marcadores microsatélites. A escolha dos cromossomos cinco e sete do genoma bovino deu-se em virtude de trabalhos previamente descritos e também com base nos genes presentes nesses cromossomos.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Origem e evolução dos bovinos

Os bovinos são animais vertebrados mamíferos, pertencentes à ordem Artiodactyla (casco fendido), assim como os porcos, camelos, lhamas e veados. Esses animais possuem dois dedos maiores, e que formam o casco fendido ao meio, e onde os outros dedos são diminutos e não utilizados (Friend and Bishop, 1978). Nessa ordem existem várias famílias, e os bovinos encontram-se na família Bovidae, juntamente com cabras e ovelhas. Os bovinos domésticos pertencem ao gênero *Bos*, que se caracteriza por agrupar animais que possuem chifres que nunca são trocados, estômago com quatro compartimentos e glândulas mamárias localizadas entre as patas traseiras. Além disso, são animais que não possuem dentes incisivos superiores e caninos na mandíbula, porém Sisson e Grossman (1977) consideram que os incisivos inferiores sejam, na verdade, caninos modificados. Dentro desse gênero existem ainda os bisões e búfalos, e os bovinos domésticos foram separados em duas espécies, de acordo com Linnaeus (1758): *Bos indicus*, composta por bovinos indianos, e que possuem cupim (também chamados de zebuínos, ou gado Zebu), e *Bos taurus*, onde se encontram animais sem cupim (denominados também de taurinos, ou gado europeu) (Barbosa, 1998).

Todos os bovinos modernos originaram-se a partir de um ancestral comum que existiu na Ásia por volta de sete milhões de anos atrás (Friend and Bishop, 1978), porém há

controvérsias sobre a origem dos bovinos, principalmente sobre o gado Zebu. Barbosa (1998) apresentou uma compilação revisada sobre o trabalho de diversos autores que estudaram a origem desses animais. Zeuner (1963) elaborou uma teoria onde os zebuínos são descendentes do *Bos namadicus*, um gado selvagem encontrado na Índia há mais de dez mil anos, mas segundo Epstein (1971), os zebuínos originaram-se em 3000 aC. Friend and Bishop (1978) acreditam que no Pleistoceno, ou seja, cerca de 2 milhões de anos atrás, um ancestral comum deu origem ao *Bos namadicus* e ao *Bos primigenius*. *Bos namadicus* teria originado o gado Zebu há cerca de 5.000 anos atrás, com o começo do processo de domesticação desses animais; *Bos primigenius* teria se subdividido em *Bos longifrons* (gado europeu de chifres curtos) e *Bos taurus* (*Bos primigenius* domesticado, com chifres longos) no meio do período Holoceno, há 3.000 anos atrás. Já de acordo com Loftus *et al.* (2004), existem mais de 1 bilhão de bovinos no mundo atualmente, e que todos sejam derivados de subtipos de bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* que se divergiram há 100.000 anos atrás, antes mesmo dos eventos de domesticação, os quais começam a ocorrer quando a seleção por fenótipos favoráveis se iniciou nos bovinos, há 7.500 – 10.000 anos atrás. Análises de DNA mitocondrial e o uso de marcadores microssatélites indicam que *Bos indicus* divergiram de *Bos taurus* entre 110.000 e 850.000 anos atrás (Hansen, 2004).

Apesar de existir essa subdivisão entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, é interessante notarmos que essas espécies se reproduzem normalmente entre si, sem redução de fertilidade nas gerações subseqüentes. Essa falta de isolamento reprodutivo contradiz o conceito biológico de espécie, contrariando a divisão desses animais em espécies distintas. Studart (2001), em revisão sobre o assunto, verificou que Tambasco (1976), com base em análises citogenéticas, considerou taurinos e zebuínos como sendo duas subespécies da espécie *Bos taurus*, podendo vir a ser chamadas de *Bos taurus taurus*, e *Bos taurus indicus*. Porém, a nomenclatura mais amplamente utilizada é a de Linnaeus, mesmo com a

possibilidade de hibridação entre os indivíduos *Bos taurus* e *Bos indicus* pois, segundo Futuyma (1997), muitas vezes as diferenças morfológicas prevalecem na definição de espécies taxonômicas, sobrepondo-se às evidências de isolamento reprodutivo.

No presente estudo, entretanto, baseado em trabalhos previamente reportados, recente taxonomia (Nowak, 1999) e também no fato de não haver isolamento reprodutivo, *Bos taurus* e *Bos indicus* serão considerados como sendo subespécies diferentes de bovinos, não espécies distintas, e a nomenclatura utilizada para identificar as subespécies será *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*, nomenclatura esta que já está sendo empregada em trabalhos recentes (por exemplo, Henkes *et al.*, 2005).

2.2. O Gado Holandês

O gado holandês (*Bos primigenius taurus*) é encontrado no mundo todo, podendo ser dividido em três tipos principais. O frísio holandês foi desenvolvido na Holanda, local de origem da raça. O frísio Holstein é a variedade norte-americana, e o frísio inglês é o intermediário entre os dois primeiros tipos (Marques, 1969).

Infelizmente, a origem da raça não é totalmente conhecida. Existe uma visão tradicional de que os ancestrais dos atuais frísios foram domesticados há mais de 2.000 anos atrás nas terras do norte da Holanda e Frísia ocidental (Friend and Bishop, 1978). Outra teoria é que as tribos frísias e batávias da Europa Central introduziram na Holanda um gado altamente produtivo, a partir de uma variedade da Grécia antiga.

Poucos animais desta população inicial sobreviveram às várias catástrofes que ocorreram na Holanda. Houve uma grande perda de animais devido a inundações sérias e deflagrações de doenças. Para manter a crescente indústria do gado que ergueu a Holanda desde o século 13, muitos animais tiveram que ser importados.

2.2.1. O frísio Holstein

Os primeiros colonos holandeses da América do Norte trouxeram seus rebanhos consigo, e existem referências de gado branco e preto no continente americano desde 1621. Esses animais foram cruzados com outras linhagens conforme foram sendo importados (Marques, 1969).

O primeiro rebanho puro de frísios Holstein da América do Norte foi estabelecido por Winthrop W. Cheney de Belmont, Massachusetts. Em 1852 ele comprou uma vaca que veio da Holanda. Esse animal fornecia leite fresco aos tripulantes durante a viagem, e foi uma vaca tão produtiva que ele decidiu importar outras. Em 1881, o frísio Holstein foi importado para o Canadá a partir dos Estados Unidos, e dois animais desse grupo original foram se tornar os ancestrais da maioria do Holstein canadense.

Essa raça é famosa por sua excepcional produção leiteira, mas os americanos também se concentraram no tipo. Um comitê de importantes criadores de gado leiteiro foi formado em 1922 para decidir qual deveria ser o tipo correto do Holstein. Modelos e gravuras foram criados por artistas, sob a supervisão do comitê, e amplamente distribuídos. Um programa de classificação de rebanhos foi iniciado em 1929, onde os criadores eram ranqueados por um inspetor oficial. O proprietário podia comparar suas vacas com o animal ideal, e se esforçar para criar animais melhores.

O Holstein é o mais produtivo dentre as linhagens leiteiras. Não são tão precoces quanto outras raças, mas se tornam animais grandes, com úberes bem desenvolvidos (Figura 1).



Figura 1 – Exemplo de fêmea da raça holandesa (*Bos primigenius taurus*) (extraído de: www.fregonezi.com/)

2.2.2. O gado Holstein Friesian no Brasil

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (<http://www.gadoholandes.com.br/origem/raca.htm>), não foi estabelecida uma data de introdução da raça holandesa no Brasil. De acordo com informações obtidas do site, "segundo os dados históricos, referentes à nossa colonização, presume-se que o gado holandês foi trazido nos anos de 1530 a 1535, período no qual o Brasil foi dividido em capitanias hereditárias". O Herd-Book começou a funcionar em 1935, com o macho "Colombo St. Maria" de Francisco Lampréia, RJ, e "Campineira", de Vicente Giaccaglino, SP.

Até o início de 1980, o Brasil foi considerado o detentor do maior rebanho mundial de HVB (Holandês Vermelho Branco), mas o efetivo foi decrescendo, ano após ano, por falta de disponibilidade de reprodutores VB (Vermelho Branco) com valores genéticos comprovados e também pela não aceitação das coberturas de vacas VB por touros PB (Preto Branco). A abertura para uso de reprodutores PB sobre vacas VB somente aconteceu por volta de 1984 desde que o reprodutor fosse portador de gene recessivo para pelagem VB.

No ano de 2000, o país alcançou o número de 96.649 animais em produção, com média de produção leiteira de 8.047 kg na idade adulta. Cerca de 84,0% de criadores residem em São Paulo, Paraná e Minas Gerais.

2.3. O Gado Gir

Segundo dados retirados do site da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ)(<http://www.abcz.org.br>), a raça Gir (*Bos primigenius indicus*)(Figura 2) tem esse nome pois foi originada nas terras próximas das montanhas de Gir, ao Sul de Katiawar, em uma área que cobre 150 quilômetros quadrados na península retangular entre o Golfo de Cutch e o Golfo de Cambay, na costa oeste da Índia. Considerada em sua própria região de origem como de dupla aptidão (trabalho e leite), a raça manteve e aprimorou seus atributos econômicos no Brasil. Com caracterização racial bastante peculiar, o Gir se distingue pela pelagem vermelha ou amarela em combinações típicas da raça: gargantilha, chitada, rosilha e moura, sempre sobre pele bem pigmentada. Sua natureza gregária e o temperamento dócil contribuíram para sua expansão no Brasil. Os primeiros plantéis no Brasil foram formados por volta de 1918 a 1920, com representantes da raça Gir e com alguns animais das raças Dandi e Deoni, tendo ocorrido importações subseqüentes quando a raça estava supervalorizada entre os pecuaristas (Del Lama *et al.*, 1992). Esse fato foi decisivo e contribuiu para a definição de um padrão racial apurado no rebanho nacional, correspondente ao Gir indiano.



Figura 2 – Exemplo de animal representante da raça Gir (*Bos primigenius indicus*) (extraído de: www.emepa.org.br)

O gado Gir tem uma característica cabeça com testa bem proeminente, com chifres que se curvam para trás, e para cima, geralmente com cerca de 5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento (Marques, 1969). Alguns animais são inteiramente vermelhos, mas a maioria é mosquada e varia entre um vermelho amarelado até quase preto. Uma peculiaridade dessa raça é que a maioria dos animais possui uma mancha bem definida que difere bastante em coloração das outras partes do corpo.

Os machos adultos pesam cerca de 660 Kg, enquanto as fêmeas pesam 385 Kg. A barbela é apenas moderadamente desenvolvida. Os machos castrados são usados para arado, mas embora sejam grandes e fortes, tendem a ser lentos e lertárgicos.

No Brasil, o Gir é considerado como sendo uma raça leiteira, sendo conhecida também como o “Zebu leiteiro”. Os controles oficiais apontam produções médias de 3.198 kg de leite, sendo comuns lactações acima de 4.000 kg ou até 5.000 kg leite/lactação (ABCZ).

Novas linhagens de gado têm sido desenvolvidas, tanto na América do Norte quanto na do Sul, usando o sangue Gir. Entre 1875 e 1921, o Brasil importou animais Gir e Kankrej da

Índia e formou o Indu-Brasil. Nos Estados Unidos, o Gir (junto com outras três raças de *B. p. indicus*) contribuiu para formar o gado Brahman.

2.4. Principais diferenças entre o *Bos primigenius indicus* e *Bos primigenius taurus*:

Os animais da subespécie *B. p. indicus* apresentam as seguintes características: alta capacidade de tolerância ao calor tropical; alta capacidade de resistência aos ecto e endoparasitas; capacidade de aproveitar pastagens grosseiras; pasta mais tempo sob o sol intenso do clima tropical; alta fertilidade, mesmo em clima quente; maior período de gestação: média de 291,5 dias para as raças criadas no Brasil; pêlos curtos e lisos que favorecem a eliminação do calor; aparelho digestivo com menor capacidade; membros longos e com menor cobertura muscular, o que faz com que o animal se locomova com muita facilidade, mesmo em pastagens de terreno elevado, constituindo grande vantagem, principalmente quando a criação é feita em regime extensivo, ou quando os animais têm que percorrer grandes distâncias para atingir o mercado consumidor; desenvolvimento mais lento que as raças européias (Marques, 1969).

Já o gado *B. p. taurus* têm propriedades praticamente opostas às do gado zebuino: baixa capacidade de tolerância ao calor tropical, quando exposto à radiação solar intensa, apresenta alteração no ritmo respiratório e na temperatura corporal; baixa capacidade de resistência aos ecto e endoparasitas; mais exigente quanto às pastagens e seu valor nutritivo; não pasta nas horas de muito sol, preferindo abrigar-se nas sombras; menor período de gestação (280 dias); pele geralmente espessa, esticada, e coberta de longos pêlos; aparelho digestivo com maior capacidade; membros curtos e com boa cobertura muscular, não resistindo às grandes caminhadas; crescimento rápido, chegando ao abate em idade bastante jovem.

Hansen (2004) verificou que a maioria das adaptações dos zebuínos ao clima tropical ocorre tanto ao nível fisiológico quanto ao celular. A habilidade superior desses animais de

manter a temperatura corporal mesmo durante períodos de stress térmico é o resultado de taxas metabólicas mais baixas, assim como maior capacidade de dissipar calor, seja por possuírem glândulas sudoríparas maiores, ou mesmo por terem pelagem com propriedades que maximizam a condutividade de calor e minimizem a absorção de radiação solar.

Outra grande diferença entre o gado zebuino e *B. p. taurus* verificada por vários autores já há muito tempo é a maior resistência ao carrapato do Zebu em relação aos taurinos (Utech 1978, Thiesen 1979, Oliveira *et al.* 1989, Oliveira e Alencar 1990, Penna 1990, Teodoro *et al.* 1994, Wambura 1998, Teodoro *et al.* 2004), pois o gado indiano convive há milhares de anos com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ocorrendo assim, muito provavelmente, a eliminação dos animais naturalmente mais susceptíveis e permitindo maiores oportunidades para aqueles geneticamente mais resistentes (Teodoro *et al.*, 2004). Entretanto, Penna (1990) relatou que o gado europeu é menos resistente ao carrapato provavelmente apenas devido ao pouco contato com o parasito, e salientando que existem raças com diferentes níveis de resistência. Teodoro *et al.* (1994) verificaram que animais europeus da raça Jersey apresentaram menos carrapatos em relação às outras raças taurinas, evidenciando que são mais resistentes.

Em animais cruzados, geralmente, quanto maior a proporção de *B. p. indicus* no mestiço, maior sua resistência aos parasitos (Wambura *et al.*, 1998). No Brasil, Veríssimo *et al.* (1997), estudando bovinos das raças holandesa e Gir, bem como seus mestiços, observaram diferenças significativas na infestação por carrapatos nesses animais, sendo a raça Holandesa a mais susceptível, e a Gir a mais resistente. Frisch e O'Neill (1989), na Austrália, compararam a resistência de diversas raças, dentre as quais haviam animais zebu puros, *B. p. taurus* puros e raças mestiças. Eles classificaram as raças em ordem decrescente de resistência, e o resultado foi: gado zebu indiano e africano, animais cruzados, *B. p. taurus* africano e, por último, *B. p. taurus* europeu.

Essa diferença de resistência também foi verificada quando os animais estão infestados por endoparasitas. Gasbarre *et al.* (2001), em estudos de contagem de ovos do nematóide gastrintestinal *Ostertagia ostertagi* nas fezes de bovinos (OPG) de uma população experimental dos Estados Unidos, verificou que os bezerros podem ser divididos em três tipos: (1) tipo I, que nunca demonstraram altos níveis de OPG, (2) tipo II, que demonstraram aumento nos valores de OPG nos dois primeiros meses na pastagem contaminada, e depois esses valores decaíram e se aproximaram dos valores dos animais do tipo I, (3) tipo III, bezerros que mantém altos níveis de OPG. A percentagem aproximada desses animais na população é 1:2:1, indicando, portanto, que essa população está segregando para características envolvidas na resistência e susceptibilidade à nematóides gastrintestinais.

O cruzamento de animais resistentes a nematóides gastrintestinais tem sido muito estudado em ovinos, e já aplicado comercialmente na Nova Zelândia (Beh *et al.*, 2002), e programas de melhoramento e seleção quanto a resistência à nematóides gastrintestinais têm sido bem sucedidos (Albers *et al.*, 1987; Windon, 1991). Programas como estes, para chegarem a um nível satisfatório de resistência por parte dos animais aos parasitas, podem levar de 10 a 20 anos (Albers e Gray, 1986). Entretanto, não é um período muito maior do que o necessário para a identificação, desenvolvimento e comercialização de um novo anti-helmíntico, e também para o desenvolvimento de resistência dos helmintos ao produto.

Em bovinos, vários estudos (Teodoro *et al.* 1984, Madalena *et al.* 1985, Cardoso 2000, Fraga *et al.* 2003) mostraram que a herdabilidade da característica resistência ao carrapato é baixa a moderada, variando entre 0,15 e 0,49. O mesmo foi demonstrado para resistência à endoparasitas (Suarez *et al.* 1997, Sonstegard e Gasbarre, 2001). Andrade (1996) observou que a herdabilidade para resistência ao carrapato possui variação genética aditiva, indicando que há possibilidade de avanço genético da população para a característica em questão. Davis (1993), em revisão sobre o tema, verificou que a herdabilidade média de resistência ao

carrapato é semelhante à herdabilidade de características de crescimento e produção de leite em regiões temperadas. Stear *et al.* (1990) relataram que a herdabilidade para contagem dos ovos nas fezes (FEC), medida de resistência à parasitas gastrintestinais em ruminantes, variou entre 0,35 e 0,51 em bovinos, corroborando o uso da seleção para aumento da resistência. A herdabilidade para FEC em rebanho dos Estados Unidos variou entre 0,3 e 0,4 Gasbarre *et al.* (2001).

Portanto, existem consideráveis evidências de que grande parte da variação de resistência em ruminantes está sob controle genético.

2.5. Os parasitas

2.5.1. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*:

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas que obrigatoriamente se alimentam do sangue de seus hospedeiros, sendo encontrados em quase todas as regiões do mundo. Infestam vertebrados tais como pássaros, mamíferos, vários répteis e anfíbios (Pereira, 2000). Além de suas características como parasitas, os carrapatos também são importantes devido aos vários tipos de doenças que eles transmitem ao homem e aos outros animais. Grande variedade de organismos patogênicos é transmitida pelos carrapatos: fungos, bactérias, riquetsias, vírus e protozoários. Nenhum outro artrópode é vetor de tão ampla variedade de organismos patogênicos. Além do mais, em decorrência de suas picadas, os carrapatos podem induzir algumas toxemias em seus hospedeiros (Sonenshine, 1993).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um aracnídeo pertencente à sub-classe Acarina da classe Arachnida. Esta classe, juntamente com a dos Merostomata, compõe o sub-filo Chelicerata do filo Arthropoda. É a única espécie desse gênero identificada no Brasil e o mais importante ectoparasita de rebanhos bovinos. Está presente em todas as áreas

tropicais e sub-tropicais entre os paralelos 32°N e 32°S, abrangendo regiões que se dedicam à pecuária na América, África, Ásia e Austrália (Gonzales, 1995). As perdas econômicas causadas pelo *R. microplus* são estimadas em mais de 800 milhões de dólares ao ano no Brasil (Martinez *et al.* 2006), quando contabilizadas a queda na produção de leite e carne, a mortalidade, a redução na natalidade, os gastos no seu controle, e a transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemia* e da riquetsia *Anaplasma marginale* que causam a Tristeza Parasitária Bovina. No mundo, esses valores podem alcançar, anualmente, a cifra de 7 bilhões de dólares (De Castro, 1997). Além de danificar o couro do bovino, prejudicando sua comercialização, o grande volume de sangue sugado pelos carrapatos após a fixação pode causar anemia no hospedeiro e, dependendo do número de carrapatos infestantes, levá-lo à morte (Horn, 1983; Frisch *et al.*, 2000).

O ciclo de vida do carrapato *B. microplus* divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária. A fase de vida livre inicia-se após a queda da teleógina ingurgitada com o período de pré-postura, que tem, em média, duração de dois a três dias, podendo se estender a mais de 90, passando, posteriormente, à fase de ovopostura, que dura em torno de 17 a mais de 90 dias e, em seguida, à fase de eclosão, para a qual são necessários de cinco a dez dias, podendo, no entanto durar até mais de 100. Após o nascimento das neolarvas, é necessário um período de quatro a 20 dias para que se tornem larvas infestantes. Portanto, o tempo de vida livre do carrapato dos bovinos gira em torno de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias. Além disso, as larvas podem ficar mais de seis meses sem se alimentar. Em condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/ postura/eclosão tem duração de um mês (Gonzales, 1995). A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. A fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões.

Essa fase de vida inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro, passando a ser larva parasitária e transformando-se em metalarva, sendo necessários cinco dias, em média, para esse período, podendo variar entre três a oito dias. São necessárias várias transformações para que o parasito chegue ao estágio adulto, sendo apresentados, a seguir, os seus respectivos períodos de duração: de metalarva a ninfa (5 a 10 dias, em média oito); de ninfa a metaninfa (9 a 23 dias, 13 em média). Nesta fase, já há diferenciação entre os sexos, e a transformação de metaninfa para neandro necessita de 18 a 28 dias, com 14 dias em média, passando a gonandro em dois dias, permanecendo no animal por mais de 38 dias. A transformação de metaninfa para neógina é feita em torno de 14 a 23 dias, sendo, em média, de 17 dias, passando à partenógena em três dias e à teleógina em dois dias. O início da queda das teleóginas ocorre no 19º dia da infestação, sendo, em média, entre o 22º e 23º dias (Gonzales,1995).

De forma mais simples, o ciclo do *R. microplus* para o Brasil-Central é descrito por Furlong (1993). Na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura; de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes. O autor afirma, ainda, que a cada postura uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas.

O ingurgitamento e queda da fêmea do *R. microplus* (Figura 3) são bastante rápidos. Demonstrou-se que, em parte, fêmeas ingurgitadas que têm crescimento de 4-6 mm (10-30 mg), podem atingir um rápido final de ingurgitamento à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg) e se destacando do animal nas primeiras horas do dia. Porém, os padrões de

ingurgitamento se diferenciam entre as estações, assim como em bovinos estabulados, sugerindo que este sofre uma influência do ambiente externo, principalmente de luz e temperatura. A contagem de carrapatos de 4,5 a 8,0 mm de comprimento em um dia, demonstrou fornecer uma confiável estimativa do número de carrapatos ingurgitados caindo no dia seguinte, e tem sido adotada para a determinação do número de carrapatos nos bovinos (Wharton & Utech, 1970). Segundo Veríssimo e Oliveira (1994), a contagem de carrapatos na região anterior, entre a cabeça e a escápula, tem 90,9% de correlação, simplificando o método de Wharton e Utech (1970).

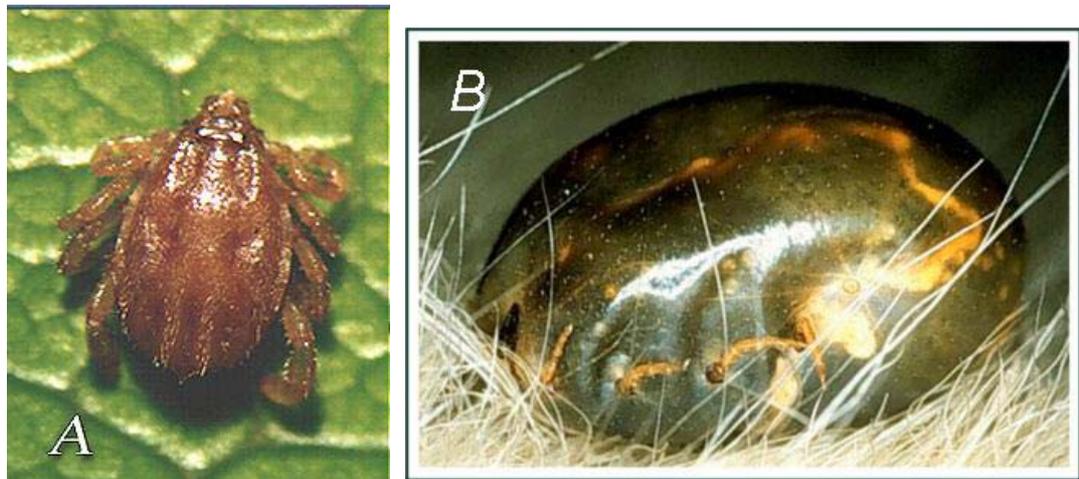


Figura 3 – Imagem de um carrapato macho de *Rhipicephalus microplus* (A) e de uma fêmea ingurgitada ainda na pelagem do hospedeiro (B) (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM)

2.5.2. A mosca *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae)

O berne é o nome popular da larva da mosca *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) (Figura 4A), que se desenvolvem nos tecidos subcutâneos de mamíferos domésticos causando uma miíase cutânea superficial do tipo furunculoso. A larva mantém os espiráculos voltados para a superfície da pele e respira por um orifício que se comunica com o exterior (Sequeira e Amarante, 2002). Com isso, a larva provoca danos na pele dos indivíduos onde está alojada, e que no caso dos animais criados para produção, leva a perdas

econômicas, levando a *Dermatobia hominis* a ser considerada o terceiro ectoparasita de maior importância econômica no Brasil (OMS/OPS, 1983).

Os adultos de *Dermatobia hominis* não se alimentam. Após a cópula, as fêmeas capturam um outro díptero de menor porte depositam cerca de 30 - 38 ovos, que ficam aderidos externamente ao abdômen por um período médio de 6 dias (Sequeira e Amarante, 2002). Os animais são infectados quando esse inseto veiculador pousa sobre o hospedeiro, onde o calor que emana da pele do hospedeiro funciona como estímulo para a eclosão das larvas de primeiro estágio (Figura 4B). Elas penetram ativamente na pele do hospedeiro e migram até os tecidos subcutâneos, onde sofrem duas mudas durante um período que varia, nos bovinos, de 29 a 45 dias. A larva de terceiro estágio, madura (Figura 4B), abandona espontaneamente o hospedeiro através do orifício respiratório e cai no solo para pupar durante um período de cerca de 30 dias em condições ótimas de temperatura e umidade. Mas esse período pode se estender durante meses, caso as condições não sejam propícias. O inseto adulto sobrevive de 3 a 19 dias, e o ciclo completo pode levar de 100 a 140 dias.

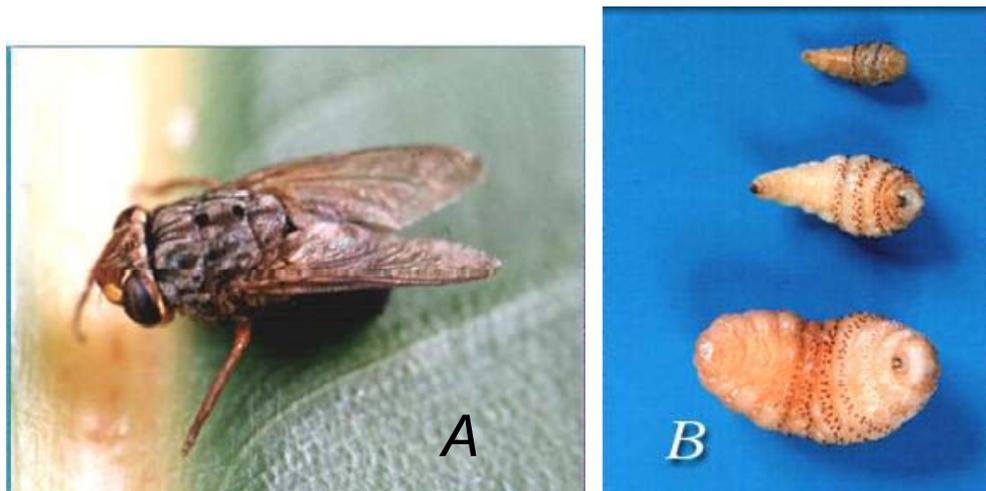


Figura 4 – A: mosca adulta da espécie *Dermatobia hominis*; B: larvas de *Dermatobia hominis* (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM)

2.5.3. Endoparasitas: *Cooperia* spp e *Haemonchus* spp

Em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, os endoparasitas mais comuns encontrados nos bovinos são dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus*, com prevalência de mais de 80% para o primeiro e mais de 10% para o segundo (Borges *et al.*, 2001; Neto e Fonseca, 2002; Araújo e Lima, 2005), sendo *Trichostrongylus* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Bunostomum* sp. os gêneros menos prevalentes.

Cooperia spp são endoparasitas do intestino delgado, enquanto *Haemonchus* spp alojam-se no abomaso. Ambos pertencem à ordem Strongylidae, família Trichostrongylidae, porém as espécies de *Cooperia* foram classificadas como pertencentes à subfamília Trichostrongylinae, enquanto *Haemonchus* spp estão situadas dentro da subfamília Haemoncinae.

O gênero *Cooperia* (Figura 5) é caracterizado por formas adultas pequenas, cujo comprimento não ultrapassa 10mm. Machos possuem bolsa copulatória simétrica, com lobo dorsal reduzido; raios ventro-dorsal e lateral anterior mais espessos do que os outros; castanhos, geralmente com uma expansão rugosa em forma de asa. As fêmeas possuem vulva situada na metade posterior do corpo, com extremidade distal cônica, terminando em ponta mais ou menos aguda (Freitas, 1980).



Figura 5 – Exemplar de fêmea de *Cooperia* sp. (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM)

Haemonchus spp (Figura 6), cujos representantes possuem tamanho geralmente acima dos 10mm, são providos de vestíbulo na extremidade anterior armado de lanceta dorsal. Os machos possuem bolsa copulatória formada por um lobo dorsal assimétrico e lobos laterais desenvolvidos, e as fêmeas possuem um processo vulvar protegendo a vulva, situada na metade posterior do corpo.



Figura 6 – exemplar de fêmea de *Haemonchus* sp. (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM)

Os ciclos biológicos das espécies de tricostrongilídeos parasitos de ruminantes são, em regra geral, semelhantes (Freitas, 1980). Os vermes adultos vivem na luz do tubo digestivo dos hospedeiros, e põe ovos em grande quantidade, que são eliminados para o meio exterior através das fezes do animal. Em baixa tensão de oxigênio, o desenvolvimento desses ovos é inibido. Quando esses ovos saem junto com as fezes, já na presença de oxigênio, eles eclodem e dão larvas de primeiro estágio (L1) logo no primeiro dia. A larva L1 se alimenta de microorganismos presentes nas fezes, e se as condições de temperatura forem boas, em mais um dia se transforma em larva de segundo estágio (L2), a qual dentro de aproximadamente uma semana se transforma na larva infectante de terceiro estágio (L3). A larva L3 mantém a cutícula do último estágio, que funciona como uma bainha de proteção contra condições adversas do meio e que garantem sua sobrevivência por meses. As larvas infectantes saem das fezes e migram pela vegetação das pastagens, através das películas de água, e quando ingeridas por um hospedeiro apropriado, emergem das cutículas protetoras já na luz do tubo

digestivo através de mecanismos que dependem de fatores originários do hospedeiro de da própria larva. As larvas de *Haemonchus* (que infectam o abomaso), desencapsulam-se no rúmen, e as larvas de *Cooperia*, parasita de intestino delgado, perdem a cutícula no abomaso.

Uma vez libertadas da cutícula, L3 entra na fase do ciclo histotrófico (ou fase tecidual), durante a qual se alimenta às custas dos tecidos do hospedeiro. Essa fase normalmente dura poucos dias, mas em animais que adquiriram resistência em função de infecções repetidas, esse período pode demorar bem mais (Freitas, 1980). A resistência contra os estágios imaturos dos nematódeos se manifesta pela eliminação das larvas infectantes ou pela inibição do desenvolvimento das mesmas (hipobiose) (Amarante, 2004a).

2.6. Mecanismos genéticos da resistência aos parasitas

2.6.1. O sistema imune e os parasitas

Segundo Grecis (1997), um dos primeiros trabalhos publicados sobre a análise das respostas do sistema imune dos animais contra infecções por parasitas foi no final da década de 30 (Taliaferro & Sarles 1939), cujos autores relataram infecções por *Nippostrongylus brasiliensis* em ratos. Já nessa época, eles chegaram à conclusão que mudanças no padrão da quantidade de anticorpos e células de defesa (principalmente eosinófilos) eram a chave para a resistência aos parasitas. Trabalhos subseqüentes (Ogilvie & Jones 1968; Ogilvie & Love 1974) mostraram que a ação dos linfócitos juntamente com imunoglobulinas, dentre elas a principal foi IgE, mediavam a ação do parasita, culminando com sua expulsão pelo hospedeiro.

Urban *et al.* (1991) demonstraram que, dentre os linfócitos, aqueles do tipo “T” eram os que liberavam anticorpos para combater os parasitas, especialmente o linfócito T do subtipo

CD4⁺. Essas células T CD4⁺ foram então subdivididas em dois conjuntos, baseados no perfil de citocinas que eram excretados por elas. Citocinas são moléculas mensageiras que modulam o sistema imune contra as infecções por patógenos e parasitas (Tizard, 2002). Deu-se o nome de Th1 às células que secretam citocinas predominantemente do tipo interferon gamma (INF- γ) e também interleucina 2 (IL-2), e Th2 às que secretam principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Grencis, 1997). Ainda segundo o autor, vários trabalhos já demonstraram que a resposta imunológica dos hospedeiros após infecções por nematóides intestinais foi principalmente do tipo Th2, baseados na mensuração de citocinas produzidas pelas células T. Estudos revisando trabalhos sobre infestações por ectoparasitas mostram que o padrão imunológico é o mesmo nesses casos (Wikel, 1999).

Seja quando um animal é infestado por nematóides gastrintestinais (Gasbarre, 1997; Else e Finkelman, 1998; Gasbarre *et al.*, 2001; Sonstegard e Gasbarre, 2001; Finkelman *et al.*, 2004; Gómez-Muñoz *et al.*, 2004) ou por artrópodes ectoparasitas (Ganapamo, 1995; Ferreira e Silva, 1999; Hajnická *et al.*, 2000; Hajnická *et al.*, 2001; Hajnická *et al.*, 2005), o perfil de resposta imune do hospedeiro é semelhante: aumento nos níveis de expressão de IL-4 e IL-10 e diminuição dos níveis de IL-2 e INF- γ , em uma clara polarização da resposta imune para o tipo Th2.

2.6.2. Interleucina-4 (IL-4) e interferon gamma (INF- γ): atuação no sistema imune

Tanto a IL-4 quanto o INF- γ são citocinas que medeiam e regulam a imunidade adaptativa (Abbas, 2000), ou seja, mediam a proliferação e diferenciação dos linfócitos após o reconhecimento do antígeno na fase de ativação das respostas imunes adaptativas, além de mediar a ativação de células efetoras especializadas na fase efetora da imunidade adaptativa.

A IL-4 é a maior estimuladora para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T helper CD4+ simples; é a citocina de assinatura do subconjunto Th2 e funciona como a citocina indutora e efetora dessas células. Suas funções biológicas incluem promover IgE e reações mediadas por mastócitos/eosinófilos, além de suprimir as reações macrófago-dependentes (Tizard, 2002).

O IFN- γ é a principal citocina de ativação dos macrófagos, e atua em funções críticas da imunidade (inata e mediada por células): fornece meios pelos quais os linfócitos T e células NK ativam macrófagos para matar os microrganismos fagocitados; estimula a expressão de moléculas da classe I e II do complexo de histocompatibilidade (MHC); promove a diferenciação de células T helper CD4+ simples em células Th1, além de inibir a proliferação de células Th2; ativa neutrófilos e promove a ação citolítica das células NK. A rede de efeitos da atividade do IFN- γ é promover reações inflamatórias ricas em macrófagos, enquanto inibe reações ricas em eosinófilos dependentes de IgE (Tizard, 2002).

IFN- γ e IL-4 possuem, portanto, ações antagônicas no sistema imune, com os produtos de um inibindo a ação da outra. Porém, ambas são extremamente importantes nas reações imunológicas do organismo, cada uma em um estágio particular da infecção e contra patógenos específicos.

2.6.3. Carrapatos e sistema imune

Ferreira e Silva (1999), em estudo sobre infestações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em camundongos, constataram que células do nódulo linfático cultivadas na presença da saliva desse carrapato, demonstraram um perfil de citocinas típico de células Th2, representado pelo aumento dos níveis de interleucina-4 (IL-4), IL-10 e do fator de crescimento e transformação β (TGF- β), além de inibição da síntese de IL-2, IL-12 e interferon gamma (IFN- γ), e sugerem que a consequência de muitas infestações parasíticas,

com relação à resistência ou susceptibilidade, é determinada pelo padrão de resposta, envolvendo células T helper (Th) CD4+. Células Th1 produzem IL-12 e IFN- γ , enquanto que as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e essas citocinas podem direcionar as respostas imunes através de diferentes mecanismos efetores (Mossmann e Sad, 1996). Por exemplo, células Th1 promovem ativação de macrófagos e têm sido associadas com hipersensibilidade “delayed-type” (DTH). Por outro lado, células Th2 aumentam o número de eosinófilos, e promovem a síntese de anticorpos. Mais ainda, os produtos das células Th1 e Th2 podem regular negativamente a produção e/ou atividade umas das outras (Mosmann e Moore, 1991). Os macrófagos também produzem citocinas, como a IL-12 e TGF- β , além da prostaglandina E2 (PGE2) que pode influenciar e ser influenciada pelos produtos das células T. Desse modo, Ferreira e Silva (1999) acreditam que a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro às infestações por carrapatos deve ser explicada pela modulação induzida pelo carrapato no sistema de citocinas do hospedeiro. Além do mais, o entendimento das bases moleculares das estratégias utilizadas pelos carrapatos para evadir a proteção do hospedeiro, e os mecanismos imunológicos que levam à proteção do hospedeiro, devem abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de vacinas ou produtos alternativos para controlar os ectoparasitas.

2.6.4. Endoparasitas e sistema imune

Gasbarre (1997) e Gasbarre *et al.* (2001) em estudos realizados nos Estados Unidos, com população experimental de bovinos desafiados com o nematóide gastrointestinal *Ostertagia ostertagi*, verificaram que, apesar da aparente falta de especificidade das respostas imunes, infecções com *O.ostertagi* induziram profundas alterações no sistema imune do hospedeiro. Essas mudanças incluem uma marcante expansão no número de linfócitos tanto dos nódulos linfáticos locais quanto nos abomasais. Essa expansão no número de células

envolve uma mudança no curso de populações clássicas de células predominantemente do tipo T para uma população onde as porcentagens de células T são diminuídas e as células B (produtoras de imunoglobulinas) são aumentadas. Ao mesmo tempo, a expressão de RNA mensageiro das citocinas das células T é alterada para o aumento da expressão de IL-4 e IL-10, em detrimento da expressão de IL-2 e IFN- γ . Esse tipo de resposta (chamado resposta mediada por células Th2) é amplamente considerado como o tipo de resposta necessária para proteção contra nematóides gastrintestinais (Finkelman e Urban, 2001, Waldvogel *et al.*, 2004).

Finkelman *et al.* (2004) revisaram vários trabalhos publicados que utilizaram camundongos infectados com nematóides intestinais (*Nippostrongylus brasiliensis* ou *Trichinella spiralis*) e chegaram à conclusão que as citocinas IL-4 e IL-13 participam ativamente da resposta imune do hospedeiro contra esses parasitas. Mais ainda, devido ao fato do sistema imune do hospedeiro ter habilidade limitada para distinguir diferenças entre a infestação por diferentes tipos de nematóides parasitas, esse sistema desenvolveu um tipo de resposta de células Th2 esteriotipada, que ativa um conjunto de mecanismos efetores que protegem o hospedeiro contra a maioria dos nematóides parasitas intestinais.

O envolvimento do IFN- γ na resposta à parasitas já foi documentado. Porém, apesar do gene que codifica essa citocina estar localizado no cromossomo cinco (58,6cM), o mapeamento de QTL para resistência aos endoparasitas não atingiu níveis significativos em nossa população experimental. Em estudo realizado em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, Wolowczuk *et al.* (1997) verificaram que injeções intradérmicas de IL-7 exógena de humanos anteriormente à penetração desses parasitas na pele do hospedeiro levaram à uma patologia hepática mais severa, bem como fez com que o número de parasitas adultos sobreviventes aumentasse. A administração de IL-7 levou à uma diminuição nos níveis de RNA mensageiro de IL-12 e IFN- γ presentes na pele e linfócitos do hospedeiro.

Portanto, uma vez que a expressão do IFN- γ está sob influência de outras citocinas, alterações nos níveis desses outros fatores podem ser tão ou mais importantes do que mudanças nas concentrações de IFN- γ .

A quantidade de expressão de INF- γ depende do tempo em que os níveis dessa citocina foram avaliados após a infecção do hospedeiro. Waldvogel *et al.* (2004) verificaram que, 10 dias após a infecção de ratos por *Fasciola hepatica*, os níveis de RNA mensageiro de IL-4 em monócitos da circulação periférica estavam extremamente elevados, enquanto que os níveis de RNAm do IFN- γ não se alteraram. Somente 28 dias após a infecção é que os níveis de IFN- γ aumentaram. Sayers *et al.* (2005a) encontraram associação entre haplótipos do intron 1 do gene que codifica IFN- γ e contagem de ovos por grama de fezes de parasitas gastrintestinais em ovinos da raça Texel, porém o mesmo não foi observado para a raça Suffolk. Em trabalho anterior, Sayers *et al.* (2005b) encontraram associação entre alelos do complexo de histocompatibilidade Ovar-DRB1 na raça Suffolk que responderam por 14% da variância fenotípica observada, enquanto que para a raça Texel não foi encontrada nenhuma associação significativa.

2.7. Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos são características de herança simples que permitem a determinação do genótipo do indivíduo, fornecendo informações importantes para a análise genética de uma espécie. Para a comparação entre populações, os marcadores devem ser neutros para a adaptação e sobrevivência do animal, preferencialmente codominantes e estáveis ao longo do desenvolvimento.

Os primeiros marcadores disponíveis foram as mutações que produziam alterações morfológicas como, por exemplo, o nanismo, a ausência de asas em *Drosophila* e a ausência de pelos em camundongos. Entretanto, tais mutações são pouco frequentes nas populações

naturais, nas quais a maior parte da variação genética é de caráter contínuo, e freqüentemente comprometem a adaptação do indivíduo (Tanksley, 1993).

A partir da década de 30, o polimorfismo de antígenos eritrocitários passou a ser investigado, fornecendo uma nova classe de marcadores para o estudo de populações em animais. A análise de marcadores foi ampliada com o desenvolvimento de técnicas de eletroforese de proteínas associadas a métodos de coloração histoquímica (Hunter & Market, 1957) que permitiram que a variação genética das isoenzimas passasse a ser estudada. Esses marcadores têm sido intensamente utilizados para investigar a estrutura das populações, elucidando questões como fluxo gênico em populações naturais, dispersão e filogenia. Apesar disso, apenas uma parte da variação genética pode ser observada, aquela originada em mutações que resultam em alteração detectável do produto gênico. Além disso, as isoenzimas podem sofrer influência do ambiente, e podem sofrer variações de acordo com a idade e o tecido utilizado.

Essa limitação foi superada com o desenvolvimento das técnicas de análise de DNA, como o uso de marcadores RFLP, RAPD e microssatélites, esse último discutido a seguir.

2.7.1. Marcadores Microssatélites

Os organismos eucariotos e parte dos procariotos e eubacterias apresentam seqüências simples de DNA repetitivo distribuídas ao longo do genoma. Essas seqüências, denominadas microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) são caracterizadas por repetições em tandem de um mono, di ou trinucleotídeo, inseridas em regiões de seqüência única. Cada segmento de repetições é geralmente menor que 100 pares de bases de nucleotídeo (Tautz, 1989).

O polimorfismo dos marcadores microssatélites baseia-se na variação do número de repetições, resultante provavelmente de erros da DNA polimerase durante a replicação do DNA.

Os microssatélites foram os principais marcadores a serem beneficiados pela utilização da técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*, ou reação em cadeia da polimerase)(Schlotterer, 2004) .A PCR para a análise desses marcadores representa uma importante redução no tempo despendido para a identificação dos genótipos, além de permitir a identificação do genótipo de embriões. Esse fato, aliado ao intenso polimorfismo, pequena quantidade de DNA necessária para as reações, facilidade no isolamento, baixo custo de genotipagem dos indivíduos e alta abundância no genoma eucarioto fizeram dos microssatélites um dos mais vantajosos marcadores disponíveis atualmente (Schlotterer, 2004) e bastante adequados para a construção de mapas genéticos e identificação de locos que controlam caracteres quantitativos (QTL), principalmente em espécies onde o número de progênies é limitado (Massey & Georges, 1992). Até o momento, já foram identificados e isolados aproximadamente 5.600 locos marcadores no genoma bovino (Itoh *et al.*, 2005), permitindo o mapeamento fino desse material genético em busca de genes que potencialmente contribuem para a variação genética de uma característica.

2.8. Detecção de QTL

QTL (do inglês *Quantitative Trait Loci*, loco de característica quantitativa) é uma região do genoma que influencia uma característica fenotípica mensurável ou quantitativa (Jansen, 2003). Características quantitativas são multifatoriais e influenciadas por vários genes polimórficos e pelas condições ambientais.

Em alguns trabalhos sobre QTL em animais de criações próprias para fins comerciais, é comum encontrarmos o termo ETL (*Economic Trait Loci*, loco de característica econômica),

pois nesses animais geralmente são estudadas características de importância econômica (Lahav *et al.*, 2006).

A determinação de ligação genética entre o loco marcador e o QTL depende da existência de desequilíbrio entre os alelos no loco marcador e alelos do QTL. Esse desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados através de análise estatística. O sucesso desses experimentos pode também ser atribuído ao desenvolvimento de métodos estatísticos e delineamentos genéticos adequados (Weller *et al.*, 1990). Em bovinos de leite, a disponibilidade de grandes famílias de touros também tem contribuído para maior avanço no mapeamento de QTL para características de produção. Como a avaliação genética de um touro é feita pela produção das suas filhas, há disponibilidade de grandes famílias com informação fenotípica, o que permite a utilização de delineamentos de filhas ou de netas do touro.

No delineamento de filhas (*daughter design*), a progênie do touro de elevado mérito genético, heterozigoto no loco marcador, é genotipada e separada em grupos de acordo com o alelo alternativo herdado do pai. O mérito genético das filhas e filhos é estimado. Uma diferença significativa nas medidas fenotípicas entre cada grupo de alelo alternativo significa a detecção de um potencial QTL. No delineamento de netas (*granddaughter design*), os filhos de um touro heterozigoto para o marcador são genotipados. As medidas fenotípicas são realizadas nos produtos desses touros (netos). O mérito genético dos filhos é estimado através de medidas dos netos e netas, e depois utilizados em testes de associação com o marcador (Machado, 2002).

A capacidade de detectar um QTL é uma função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica. Quanto maior o

efeito, o tamanho da população e a herdabilidade, e mais próximo o marcador do QTL, mais fácil será a detecção (Ferreita & Grattapaglia, 1998).

Sax (1923)¹(citado por Darvasi *et al.*, 1993) foi o primeiro a mostrar que um loco de característica quantitativa poderia ser associado com locos marcadores em linhagens endogâmicas. Desde então, diversas metodologias foram desenvolvidas para a detecção dos mais diversos QTL (Knott e Haley, 2000), principalmente em plantéis comerciais de animais (Davis e DeNise, 1998).

O desenvolvimento de mapas genéticos para os bovinos (Bishop *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1997; Ihara *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2005) tem contribuído muito para a identificação de locos que controlam características quantitativas de importância econômica (do inglês QTL – *Quantitative Trait Loci*). Segundo MacNeil e Grosz (2002), a descoberta desses QTL tem o potencial de aumentar significativamente o ganho genético desses animais através da implementação de programas de seleção assistida por marcadores (do inglês, MAS – *Marker Assisted Selection*). Quando tratamos com características difíceis ou economicamente custosas de serem avaliadas, que possuem baixa herdabilidade, expressão tardia ou que apenas possam ser mensuradas após o abate do animal, a seleção assistida por marcadores pode aumentar substancialmente a taxa de resposta da seleção, quando comparada à seleção praticada apenas através do melhoramento animal tradicional (Davis e DeNise, 1998). O uso de MAS pode também contribuir para a quebra de correlações genéticas indesejáveis entre características sob seleção artificial (Grosz e MacNeil, 2001). Por exemplo, estimativas de correlação genética entre peso ao nascimento do animal, e peso adulto do mesmo, giram em torno de 0,5 (Kootz *et al.*, 1994), e o resultado de selecionarmos animais mais precoces é a tendência de aumentar a média do peso ao nascimento dos animais da população sob seleção com um todo, aumentando a incidência e severidade das complicações

¹ SAX, K. Association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, v.8, p.552- 560, 1923.

de parto. O oposto também é válido, ou seja, selecionar animais mais leves ao nascer leva à formação de uma população de adultos menos pesados, o que não é financeiramente desejável pelos produtores. Portanto, a identificação de regiões cromossômicas que controlem peso ao nascimento sem afetar o peso adulto do indivíduo seria de grande importância para a manipulação/predição das taxas de ganho de peso desses animais.

Atualmente, existem diversos trabalhos que descrevem a presença de QTL para peso ao nascimento e características de crescimento no cromossomo cinco dos bovinos (Stone *et al.* 1999, Casas *et al.* 2000, Casas *et al.* 2001, Casas *et al.* 2003, Casas *et al.* 2004, Li *et al.* 2004, Stone *et al.* 2005). Além disso, nesse cromossomo localiza-se o gene que codifica INF- γ e também contém, nos bovinos, uma região homóloga ao cromossomo três de ovinos, no qual foram encontrados QTLs associados à resistência a *Trichostrongylus columbriformis* (Beh *et al.*, 2002). Já no cromossomo sete dos bovinos estão presentes os genes que codificam as interleucinas 3, 4, 5 e 12.

Apesar de não haver trabalhos na literatura descrevendo QTL para resistência à ectoparasitas em bovinos, Martinez *et al.* (2006) verificaram associação significativa ($P < 0,05$) entre alelos de marcadores microssatélites BoLA-DRB3.2 e contagem de carrapatos *R.microplus* em estudos com esta mesma população experimental. Miyata (2006), ao estudar essa mesma população F₂, detectou a presença de um QTL significativo ($P < 0,01$) no cromossomo 14 para resistência ao carrapato *R.microplus*. Maillard *et al.* (2003), utilizando haplótipos de marcadores classe II BoLA-DBR3-DQB, reduziram a prevalência de dermatofilose (doença causada pela bactéria *Dermatophilus congolensis*, a qual está associada ao carrapato *Amblyomma variegatum*) de 0,76 para 0,02, em 5 anos de seleção assistida por marcadores, em uma população de gado Brahman na Martinica.

QTL para resistência à endoparasitas são mais encontrados em estudos com ovinos (Beh *et al.*, 2002). Porém, recentemente, Benavides *et al.* (2005) verificou que um marcador

microssatélite do cromossomo seis dos bovinos está associado com diferenças quanto à susceptibilidade dos bovinos aos nematóides gastrintestinais ao realizar estudos de associação em uma população de bovinos mestiços *B. p. taurus* x *B. p. indicus*. Essa região do QTL havia sido previamente identificada por Gasbarre *et al.* (2002), em uma população de bovinos da raça Aberdeen Angus.

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi mapear QTLs para características de crescimento e de resistência a ectoparasitas e endoparasitas por meio da varredura dos cromossomos cinco e sete dos bovinos, utilizando marcadores microssatélites em uma população F₂ Holandês x Gir.

4. Metodologia

4.1. Delineamento experimental

Os animais experimentais da geração F_2 foram produzidos dos cruzamentos entre animais F_1 mestiços Holandês x Gir, na Fazenda Santa Mônica (Vassouras, RJ), pertencente à Embrapa. Para isto foram utilizadas 28 fêmeas Gir (em trabalho de superovulação e transferência de embriões) que foram inseminadas com sêmen de quatro touros da raça Holandesa. Estes acasalamentos foram repetidos com a finalidade de se obter cerca de 150 F_1 (Figura 7). Destes 150 indivíduos F_1 (machos e fêmeas), apenas cinco machos foram escolhidos com base no vigor para serem pais da nova geração. As fêmeas F_1 foram acasaladas com cada um dos cinco touros, para constituírem cinco famílias, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Ao final do projeto, cada uma das famílias deve produzir, por meio da superovulação e transferência de embriões, cerca de 100 animais F_2 . No total serão obtidos cerca de 400 indivíduos F_2 (Figura 8), ou seja, cerca de 100 descendentes por reprodutor, dos quais 375 já foram avaliados genotipicamente.

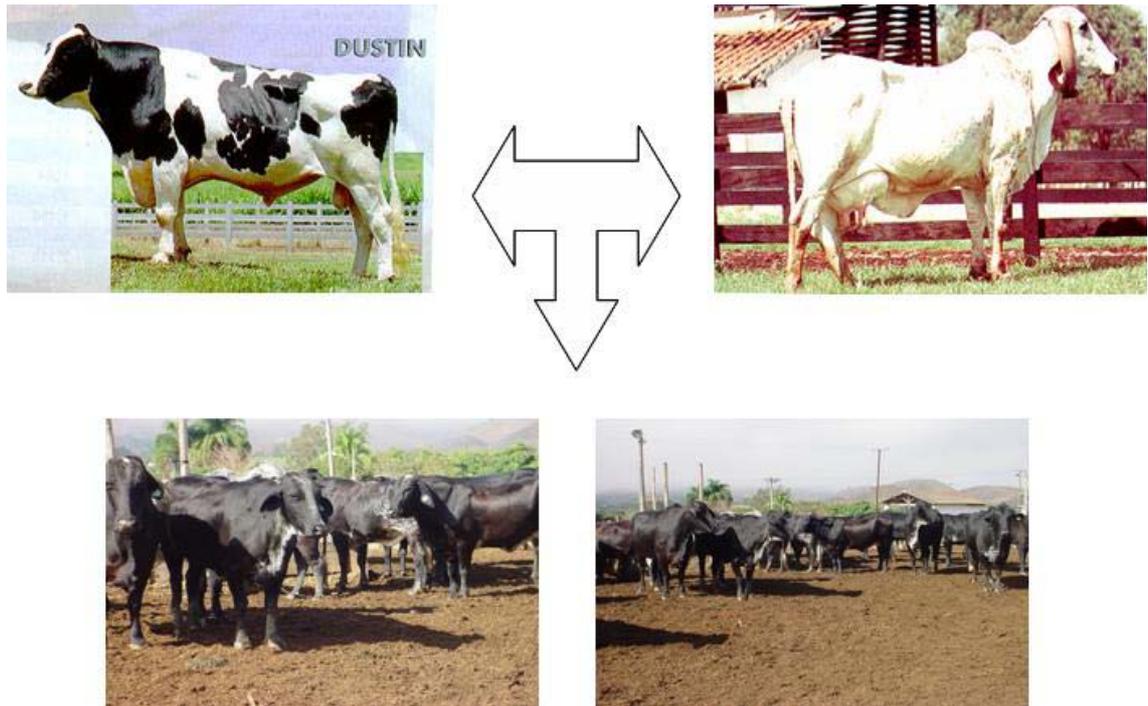


Figura 7 – O cruzamento dos parentais da raça holandesa (acima à esquerda) acasalados com fêmeas Gir (acima à direita) deu origem à geração F_1 , os quais apresentam grande homogeneidade fenotípica (imagens cedidas pelo Prof Dr. Marcos Vinícius G.B. Silva)

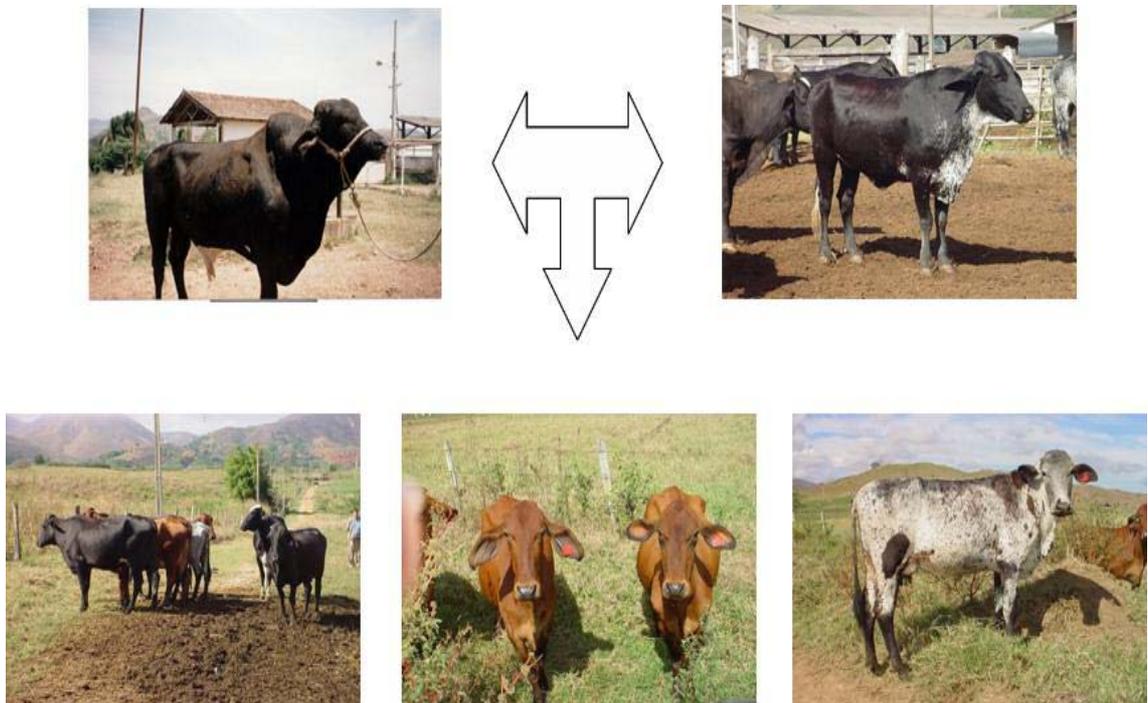


Figura 8 – Animais F_1 (mais acima) cruzados para dar origem à geração F_2 , a qual demonstra alta variabilidade fenotípica (imagens cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Vinícius G.B. Silva)

4.2. Avaliação das medidas de crescimento dos animais

A avaliação das características fenotípicas foi feita no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à EMBRAPA Gado de Leite, localizado no município de Valença, estado do Rio de Janeiro.

A avaliação do peso ao nascimento foi feita logo após o nascimento dos bezerros, que foram induzidos a ingerir o colostro, permanecendo junto à mãe durante as primeiras 24 horas de vida, período no qual são pesados. Em seguida, foram levados para gaiolas individuais, recebendo quatro litros de leite por dia, além de feno, ração concentrada e água à vontade até os 56 dias. Após essa idade, foram agrupados em lotes de acordo com a idade, e recriados em piquetes de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*), até a idade de 12 meses, quando foram transferidos para pastos de braquiária (*Brachiaria* sp).

Para o presente estudo, foram avaliadas as seguintes características de crescimento: peso ao nascimento (PN; n = 294), peso aos 60 dias (P60; n = 288), peso aos 205 dias (P205; n = 271) e peso aos 365 dias (P365; n = 276).

4.3. Avaliação da resistência genética dos bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus* e ao berne (larva da mosca *Dermatobia hominis*)

Foi utilizada a avaliação absoluta para determinação do nível de resistência de cada animal. Esta avaliação é feita pela contagem das fêmeas de carrapatos que completam seu ciclo após a infestação artificial com um número conhecido de larvas. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas infestações artificiais com 10.000 larvas por animal, e as contagens feitas no dia modal de queda dos carrapatos, que ocorre no 21º dia após a infestação. As larvas foram preparadas em laboratório na 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 um colar adaptado que foi colocado na

região cervical do animal, de modo que as larvas possam atingir ambos os lados do corpo. As larvas se deslocam rapidamente, e o colar pode ser removido dentro de duas horas.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, em torno de 20 a 30 animais, com 10 a 14 meses de idade, por grupo. Foram mantidos em baias coletivas, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. 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 nove horas, quando a maioria dos carrapatos se desprende dos animais.

Foi realizada uma contagem na estação chuvosa, e outra avaliação na estação seca. Em virtude de limitações do modelo estatístico utilizado para mapear QTLs utilizado no presente estudo, a varredura por QTLs de cada cromossomo foi efetuada duas vezes para a característica resistência ao carrapato, cada vez utilizando o conjunto de dados de uma das estações. Com isso, foram utilizadas 302 avaliações fenotípicas para a estação chuvosa e 338 na seca.

Não houve infestação artificial quanto à berne. Como os animais não eram tratados com acaricidas e outros produtos contra parasitas, naturalmente eram infestados pela mosca *Dermatobia hominis*. Foram feitas contagens diretas nos animais, chegando a uma amostragem de mesmo tamanho dos animais avaliados quanto ao número de carrapatos.

4.4. Avaliação da resistência à verminose

Os animais, formando grupos de aproximadamente 20 a 25 indivíduos, com idade entre 12 e 14 meses, foram desafiados com um inócuo padronizado composto por 20,000 larvas infectantes de *Haemonchus* sp. O inócuo foi produzido, na Embrapa Gado de Leite, a partir de uma cepa isolada em Coronel Pacheco - MG.

Os animais permaneceram desde o nascimento aproximadamente dois meses de idade nas chamadas "casinhas" (Figura 9A) Após esse período, os animais entraram para a chamada "creche" (Figura 9B), o que significa que permaneceram em piquetes de capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*) até a idade aproximada de 10 meses. Nesses piquetes, para cada quatro animais do experimento acrescentou-se um animal "contaminante", no sentido de manter sempre a pastagem com alto número de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais. Os animais não foram vermifugados durante nenhuma fase da infestação.

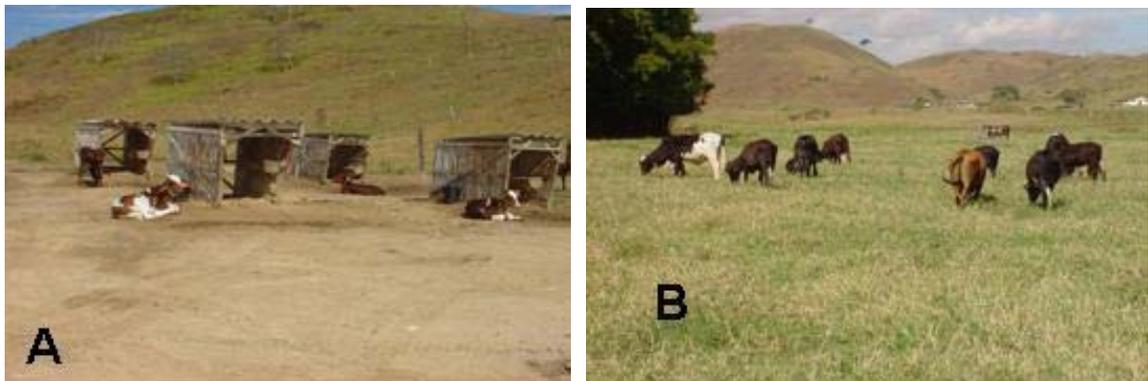


Figura 9 – A: animais nas casinhas; B: animais nos piquetes de capim-estrela (imagens cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Vinícius G.B. Silva)

Foram feitas coletas de fezes e exames de ovos por grama de fezes (OPG) quinzenalmente, pelo método da centrífugo-flutuação pelo açúcar, o qual possibilita maior eficácia no diagnóstico do nível de infecção.

Quando os animais completaram aproximadamente 10 meses de vida, ou mais, e em função da disponibilidade de número suficiente de animais com essa idade mínima, foram formados "lotes" de aproximadamente 15 a 20 animais, os quais passaram para outra área, maior, também de capim estrela, irrigada na seca, com a mesma proporção de animais "contaminantes" por um período de, no mínimo, 20 semanas. Frequentemente esse período foi maior, uma vez que não havendo número suficiente para formação e entrada de novo (s) lote

(s) na área (que não poderia ficar sem animais, para manter a infecção por larvas infectantes para o próximo lote), retardava-se a saída dos lotes já com 20 semanas de observações. Coletas de fezes e exames de ovos por grama de fezes foram realizadas semanalmente, pelo mesmo método. Cada lote foi avaliado duas vezes, sendo uma na época da seca (abril a setembro) e outra na época das chuvas (outubro a março). Todas as avaliações fenotípicas foram realizadas pela equipe do Centro Nacional em Pesquisa em Gado de Leite da Embrapa.

4.5. Identificação genotípica dos animais

Amostras de sangue de todos os animais (parentais Gir, geração F₁ e indivíduos F₂) foram coletadas para a extração de DNA. No caso dos avós holandeses (quatro touros) o DNA foi extraído a partir do sêmen, tendo-se em vista que o sêmen foi importado.

4.5.1. Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue, conforme protocolo de Hallerman *et al.* (1988). Amostras de aproximadamente 30mL (com 0,5% EDTA) foram centrifugadas e o plasma retirado. As células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl), e o resíduo celular peletizado por centrifugação (2.500 rpm, 10 min). A desintegração foi repetida três vezes ou até que um precipitado branco seja obtido. As células brancas do sangue foram suspensas e incubadas em um tampão de digestão (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,02% SDS, com 3 mg proteinase K por amostra) a 42°C até o dia seguinte. As amostras foram extraídas duas vezes em fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1), duas vezes em clorofórmio:álcool isoamil (24:1), e então precipitadas em etanol gelado. O DNA foi solubilizado em tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) e congelado até a hora do uso. Um protocolo semelhante, apenas omitindo o passo de desintegração das

células vermelhas e outras pequenas alterações, foi utilizado para a extração de DNA do sêmen (Zadworny e Kuhnlein, 1990).

Todas as amostras foram quantificadas num espectrofotômetro (HITACHI modelo U-2000) onde foram realizadas medidas em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. O comprimento de onda 260 nm mede a concentração de DNA e o comprimento de onda 280 nm mede a concentração de proteínas e a partir da razão obtida entre estes dois comprimentos de onda é calculada a proporção da concentração de proteínas na amostra em relação à concentração de DNA. As amostras tiveram sua diluição padronizada para 40 ng/ μ L e foram armazenadas em microtubos a uma temperatura de -35°C.

4.5.2. Amplificação dos marcadores microssatélites e análises genótípicas

Os marcadores foram escolhidos dos mapas disponíveis, principalmente do mapa genético produzido pelo Painel de Referência Internacional de Bovinos (Barendse *et al.*, 1997), e o mapa produzido pelo Meat Animal Research Center (MARC), disponível on-line através do site <http://www.marc.usda.gov>. A escolha dos marcadores foi baseada na sua posição no mapa (distância entre marcadores em torno de 20 cM), multi-alelismo e mínimo de 50% de heterozigidade. Numa primeira etapa, os genótipos dos progenitores e dos indivíduos F₁ foram avaliados para cerca de 20 marcadores, visando selecionar aqueles para os quais os F₁ são heterozigotos, e nos quais a origem parental de cada alelo, no heterozigoto, pôde ser determinada. Escolhemos oito marcadores microssatélites para cada cromossomo, visando cobrir 100% dos cromossomos cinco e sete, com um espaçamento de 20 cM, em média, entre os marcadores. Estes marcadores selecionados foram utilizados para a genotipagem dos cerca de 400 animais da população F₂. Informações sobre nome, temperatura de anelamento, posição no cromossomo (de acordo com o para utilizado como

referência) e tipo de fluoróforo dos 16 marcadores microssatélites utilizados estão descritas na Tabela 1.

As reações foram constituídas basicamente por 50 ng de DNA genômico; 0,2 mM de dNTPs; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH 8,3; 50 mM KCl e 0,1 μM de cada *primer*, em volume total de 12,5 μL. As amplificações foram feitas em um termociclador Mastercycler Gradient (*Eppendorf*), com as temperaturas de anelamento variando para cada par de *primer* (Tabela 1). As condições de termociclagem consistiram de desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, seguido de 20 ciclos que consistiram em desnaturação a 94°C por 30 segundos seguidos por anelamento do primer inicialmente a 10°C acima do indicado, a qual foi decaindo 0,5°C a cada ciclo (procedimento denominado “touchdown”). O passo seguinte foi a realização de 10 ciclos completos, o que incluiu desnaturação a 94°C por 30s, anelamento de acordo com a temperatura ótima do primer por 30s e extensão a 72°C durante 30s. Uma extensão final de 72°C durante 45 minutos foi colocada ao final de cada reação. Após as amplificações, os produtos foram analisados em um seqüenciador automático ABI 3100 *Avant* (*Applied Biosystems*), através dos softwares *GeneScan 3.1* e *Genotyper 3.11*. O software *GeneScan* realiza a leitura dos eletroferogramas indicando o tamanho dos alelos em pares de bases e a sua amplificação através da altura dos picos detectados. O software *Genotyper* indica quais são os alelos presentes nas amostras através de uma pré-definição dos alelos presentes nesta população, fornecendo uma tabela com o número do animal e o seu respectivo genótipo.

Tabela 1: nome do marcador, posição no cromossomo em centiMorgans (cM) (de acordo com o mapa utilizado como referência), temperatura de anelamento (T.A.) em graus Celsius (°C) e tipo de fluoróforo de cada um dos 16 marcadores utilizados no presente estudo.

Cromossomo	marcador	Posição no mapa (cM)	T.A. (°C)	fluoróforo
CrM 5	BM6026	6.0	56	6-FAM
	BP1	17.3	56	NED
	BM321	38.2	60	HEX
	BMS1617	56.3	54	NED
	BMS490	66.2	60	HEX
	BMS1248	90.8	58	6-FAM
	ILSTS034	103.4	58	HEX
	ETH152	121.7	56	HEX
CrM 7	BM7160	0.0	58	6-FAM
	BM2607	29.6	58	NED
	IL4	32.0	58	HEX
	BOBT24	32.0	58	HEX
	BM6117	62.2	58	NED
	INRA192	82.5	58	HEX
	BM9065	101.1	58	NED
	ILSTS006	116.6	54	HEX

Todos os indivíduos foram genotipados para 16 marcadores microssatélites, e aqueles da geração F₂ foram avaliados quanto ao seu número de alelos, a heterozigosidade e seu conteúdo de informação polimórfica (PIC) através do software *Cervus* v.2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Utilizamos o software *Cervus* também para a geração parental (Gir e Holandês), apenas com o intuito de verificarmos se realmente existiam diferenças quanto à composição gênica entre os animais fundadores da população F₂, uma vez que o pequeno número amostral não pode ser considerado como representativo das populações dessas raças.

4.6. Construção do mapa de ligação dos cromossomos cinco e sete

Uma vez que obtivemos os genótipos de todos os marcadores para os animais das três gerações (parentais, F_1 e F_2), montamos os arquivos de genealogias próprios para o programa CRI-MAP (Green *et al.*, 1990), o qual determina a ordem dos marcadores de acordo com o maior valor de LOD score (*logarithm of the likelihood of the odds* o que significa logaritmo da verossimilhança das probabilidades), um teste que determina o quão confiável é o resultado positivo observado para as ordens geradas, bem como a distância em cM entre os marcadores para os cromossomos cinco e sete separadamente, utilizando para isso a função de mapeamento de Kosambi. Segundo Baron (2004), esse software tem por objetivo a construção rápida e automatizada de mapas de ligação, testando vários marcadores simultaneamente. Para isso, utiliza-se de genótipos de um conjunto de marcadores analisados em indivíduos de uma população, ordenando e determinando as distâncias entre essas marcas (quando em um mesmo grupo de ligação) através das taxas de recombinação entre esses marcadores.

Para rodar o programa, é preciso um computador com sistema Linux, já que o software é de livre distribuição e feito para atuar em sistemas operacionais Unix. Uma vez compilado, é preciso montar os arquivos no formato requerido pelo programa através da opção de comando “prepare”, a qual gera arquivos de parâmetros que serão utilizados pelo programa, e que podem ser alterados pelo usuário a qualquer momento, caso necessário. Uma vez que os arquivos foram montados corretamente, usamos o comando “build” que ordena os marcadores em um mesmo grupo, ou seja, no caso, no mesmo cromossomo. Os dois marcadores com maior número de recombinações informativas são pareados e fixados. Os marcadores são então inseridos um a um, de acordo com a ordem pré-estabelecida, obtido com o comando “prepare”, sempre adicionando primeiro os marcadores com mais meioses informativas. A visualização do número de meioses informativas é possível, pois, com a opção “prepare”, o programa constrói um arquivo com esses dados. Uma vez fixados os dois primeiros

marcadores automaticamente pelo programa, observamos qual o terceiro melhor marcador, inserimos esse marcador na linha de comando “inserted_loci”, e refazemos a opção “build”. Esse procedimento é realizado para todos os marcadores do grupo de ligação, um a um. A cada vez que o comando “build” é aplicado, o marcador é inserido no grupo de ligação de acordo com o maior valor de LOD obtido dentre todas das possibilidades de inserção desse marcador em relação aos outros, valor esse preferivelmente igual ou maior que três. Como confirmação dos valores obtidos com a opção “build”, utilizamos a opção “twopoint”, que analisa cada par de marcador e cria um intervalo entre eles, fornecendo o valor de LOD score. Caso o valor entre dois marcadores ficasse muito acima do esperado quando comparado com o mapa de referência, a opção “chrompic” era acionada, uma vez que ela apresenta as respectivas fases de ligação estimadas entre os marcadores para cada indivíduo da população, para todos os marcadores. Se o número de recombinações era muito maior do que o esperado, o genótipo do indivíduo era conferido manualmente no programa *GeneScan*.

4.7. Detecção de QTLs

Uma vez que montamos os arquivos com os genótipos dos indivíduos, dados fenotípicos mensurados e mapas de ligação obtidos com o CRI-MAP, utilizamos o programa *QTL Express* (Seaton *et al.*, 2002), disponível on-line através do site <http://qtl.cap.ed.ac.uk/>, o qual executa a varredura cromossômica em busca de QTL através do método de mapeamento por intervalos múltiplos para famílias em delineamento F₂, utilizando metodologia de quadrados mínimos descrito por Haley *et al.* (1994). Essa metodologia consiste em aplicar uma análise de regressão a cada centiMorgan entre dois marcadores dos cromossomos estudados a fim de testar a hipótese de segregação de QTL, utilizando para isso um modelo matemático que inclui efeitos fixos e covariáveis. Aplicamos também testes de permutação para a determinação do limite de corte da significância (10,000 “rounds” de permutação para obter

estimativas estáveis de $\alpha = 0,01$) do QTL (o chamado *threshold*), de acordo com o proposto por Churchill e Doerge (1994), bem como testes *bootstrap* (Visscher *et al.*, 1996) para a obtenção do intervalo de confiança (I.C.) da presença de um possível QTL nesses cromossomos. A metodologia *bootstrap* retira amostras (indivíduos) da população que contém informação sobre genótipo e fenótipo, gerando uma nova população com amostras com reposição, onde a análise estatística é usada para identificar o QTL. Após certo número de reamostragens feitas e a análise de QTL de novas populações, um intervalo de confiança de 95% é determinado pela ordenação das estimativas geradas, retirando-se 2,5% dos valores que representam as extremidades superior e inferior da distribuição (Seaton *et al.*, 2002).

A porcentagem da variância fenotípica que pode ser explicada pelo QTL foi e que foi calculada da seguinte maneira:

$$\alpha = \frac{MS_{full}}{MS_{reduced}}$$

$$\text{Variância} = (1 - \alpha) \times 100$$

onde:

MS_{full} = quadrado médio do modelo completo

$MS_{reduced}$ = quadrado médio do modelo reduzido, valores esses que podem ser obtidos da saída da análise realizada pelo *QTLExpress*.

Sexo, ano no qual o animal foi avaliado, cor do pêlo (100% do corpo coberto por pelagem clara, mais de 75% branco, entre 50% e 75% branco e menos de 50% branco) e tipo do pelame (curto e liso, curto e enrolado, longo e liso, e longo encaracolado) foram considerados como efeitos fixos, enquanto que a idade do animal em dias no momento da avaliação fenotípica foi definida como covariável. Para testar quais efeitos fixos e covariáveis influenciavam significativamente a característica avaliada, realizamos uma análise de

variância (ANOVA) através do procedimento de modelos lineares gerais (GLM – *General Linear Model*) do programa SAS (2002).

Uma vez que o mapeamento de QTL assume que os valores fenotípicos da característica quantitativa sigam uma distribuição normal (Yang *et al.*, 2006), os dados foram previamente transformados para se adequarem a essa premissa. O Dr. Marcos Vinícius da Silva[§] utilizou o método de Box-Cox (Box e Cox, 1964) para a normalização dos dados de peso ao nascimento e características de crescimento (PN, P60, P205 e P365), e os dados já corrigidos em relação ao anterior (interpolação) foram fornecidos para serem utilizados no presente trabalho.

Já para os dados de contagem de carrapatos, bernes e valores de ovos de nematóides gastrintestinais por grama de fezes (OPG) foram ajustados através do uso de $\log_{10}(x + 1)$. Uma vez realizada a normalização desses dados, o procedimento foi aferido através do software *BioStat 1.5.0* (<http://www.programurl.com/biostat.htm>) a fim de verificar se a normalização havia sido realizada com sucesso.

[§] Dr. Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

5. Resultados e discussão

5.1. Análises genotípicas

A heterozigosidade de um loco é definida como a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para o loco em questão considerando a população como um todo (Liu, 1998). Essa informação é extremamente importante para definirmos o número de marcadores necessários, por exemplo, para expandir o mapa de ligação a um nível de cobertura desejável, ou mesmo determinar o número de animais e marcadores necessários para o mapeamento de QTL (Bishop *et al.*, 1994). Segundo Ott (1992) um loco é considerado polimórfico se $H \geq 0,10$, e altamente polimórfico se $H \geq 0,70$. Essa definição implica em dizer que um marcador é polimórfico quando seu alelo mais freqüente tem freqüência menor que 0,95 na população estudada, e altamente polimórfico quando esse alelo tem valor de freqüência abaixo de 0,55. Liu (1998) afirma que uma amostra de apenas 15 indivíduos pode, com relativa probabilidade de acerto, expressar cerca de 70% da heterozigosidade esperada de um determinado loco para todas as distribuições das freqüências alélicas. Porém, um número amostral maior é necessário se o objetivo é detectar 95% da heterozigosidade.

O uso do conteúdo de informação polimórfica (PIC) também é comum para quantificar o grau de polimorfismo do marcador (Botstein *et al.*, 1980), já que o PIC é uma estimativa da probabilidade de se obter cruzamentos informativos. O valor de PIC praticamente equivale ao valor da heterozigosidade quando o loco possui um grande número de alelos, e conforme o número de alelos aumenta, tanto PIC quanto a heterozigosidade tendem a aumentar (Liu, 1998). As informações sobre número de alelos, heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada um dos 16 marcadores utilizados nos cromossomos cinco e sete estão representadas na Tabela 2.

Verificamos que a maioria dos locos analisados foi altamente polimórfica para a geração F₂, conforme o esperado pela pré-seleção de marcadores que realizamos baseados nas informações do site do MARC, mesmo que a média do número de alelos por marcador não tenha sido muito alta. Contribuíram para isso os marcadores BM321, BM2607 e BM6117, os quais apresentaram apenas três alelos no presente estudo.

Verificamos que a média da heterozigosidade observada foi de 0,703, com valores que variaram entre 0,882 (BM606) e 0,335 (BM6117). Machado *et al.* (2003a), estudando uma população de animais Canchim (3/8 Zebu 5/8 Charolês), encontraram heterozigosidade média de 0,647 utilizando quatro marcadores microssatélites. Machado *et al.* (2003b) encontraram valores médios de heterozigosidade de 0,305 para bovinos da raça Gir e 0,339 para bovinos da raça holandesa em estudo utilizando nove microssatélites.

O valor médio de PIC para os 16 microssatélites analisados na geração F₂ foi de 0,631, com valor máximo observado de 0,777 (ILSTS034) e mínimo de 0,329 (BM6117).

Segundo Botstein *et al.* (1980), um marcador pode ser considerado altamente informativo em uma determinada população se apresentar valor de PIC superior a 0,5, e relativamente informativo se apresentar valores entre 0,25 e 0,5. Portanto, em nossa população experimental, 14 dos 16 marcadores puderam ser classificados como altamente informativos, sugerindo que a geração parental de animais Gir e Holandês foi suficientemente divergente, em relação aos marcadores utilizados, para constituir uma geração F₂ polimórfica. Esse valor, no entanto, não ficou muito acima do encontrado por Mukesh *et al.* (2004), os quais estudaram três raças de bovinos leiteiros (*B. p. indicus*) indianos utilizando 20 microssatélites e observaram valor médio de PIC de 0,610. Já Miyata (2006) encontrou valores médios para heterozigosidade observada e PIC de 0,715 e 0,674, respectivamente, utilizando 7 microssatélites na mesma população experimental do presente trabalho. Segundo Rocha *et al.* (2001), a definição de PIC proposta por Botstein *et al.* (1980) foi baseada em um

modelo populacional de duas gerações. Em um delineamento de três gerações, como é o caso de modelos F_2 onde a informatividade dos marcadores é a fração dos alelos dessa geração para os quais os parentais podem ser discernidos entre si, fontes adicionais de não-informatividade precisam ser consideradas, como por exemplo, o compartilhamento de alelos entre as linhagens.

Tabela 2 - Número de alelos (n), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos 16 marcadores microsatélites utilizados no presente estudo.

Cromossomo	(n)	(Ho)	PIC
Crn 5			
BMS1617	6	0,842	0,715
BM321	3	0,535	0,425
BMS490	7	0,850	0,751
BMS1248	7	0,679	0,625
BM6026	6	0,882	0,745
ETH152	6	0,679	0,592
ILSTS034	10	0,808	0,777
BP1	6	0,591	0,602
Média	6,375	0,733	0,654
Crn 7			
INRA192	7	0,685	0,673
BM9065	4	0,733	0,659
ILSTS006	4	0,711	0,597
BM7160	4	0,711	0,613
BM2607	3	0,664	0,577
BOBT24	5	0,777	0,715
IL4	5	0,777	0,712
BM6117	3	0,335	0,329
Média	4,375	0,674	0,609

5.2. Mapas de ligação

Os mapas de ligação dos cromossomos cinco e sete apresentaram diferenças quando confrontados com os mapas utilizados como referência.

No mapa do cromossomo sete, os marcadores foram posicionados com distâncias relativas entre eles bem superiores às encontradas no mapa do MARC. No caso do cromossomo cinco, além do fato das distâncias entre marcadores estar maior do que o mapa utilizado referência, houve uma inversão entre dois marcadores adjacentes (BMS1617 e BMS490). As distâncias relativas entre marcadores, tanto para os mapas obtidos do site do MARC quanto para os mapas construídos nesse trabalho, podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Mapas de ligação dos cromossomos cinco e sete, com os valores relativos das distâncias entre os marcadores exibidos em centiMorgans (cM), com os valores encontrados nos mapas de referência do MARC e com os obtidos em nosso estudo (mapa Embrapa).

Cromossomo	MARC	Embrapa
Crn 5		
BM6026	6.05	0.0
BP1	17.29	19.5
BM321	38.24	54.2
BMS1617	56.30	93.9
BMS490	66.20	77.4
BMS1248	90.85	132.2
ISLTS034	103.44	148.0
ETH152	121.75	169.5
Crn 7		
BM7160	0.0	0.0
BM2607	29.61	32.9
BOBT24	32.04	48.7
IL4	32.04	49.5
BM6117	62.24	93.1
INRA192	82.48	122.6
BM9065	101.11	155.6
ILSTS006	116.63	199.0

Enquanto que no mapa do MARC o cromossomo sete é apresentado com 116cM de comprimento, a estimativa de tamanho do nosso mapa o deixou com quase 200cM. Essa diferença de tamanhos entre mapas foi menor para o cromossomo cinco, onde nosso mapa ficou com 169,5cM, e o mapa utilizado como referência tem 115,7cM. O mesmo ocorreu com Miyata (2006), onde o mapa de ligação do cromossomo 14 ficou com tamanho estimado 71% maior do que o mapa de referência.

Segundo Liu (1998), uma das prováveis causas para isso ter acontecido foi o pequeno número de animais utilizados na construção dos mapas, já que, quanto menos indivíduos genotipados, menor o número de meioses informativas. Uma vez que os marcadores em um mapa de ligação são ordenados a partir das frações de recombinação entre eles que podem ser identificadas, fica claro que quanto menos eventos de recombinação disponíveis, menor será a acurácia do software para determinar o intervalo entre os marcadores. Na média, tivemos um número três vezes menor de meioses informativas nos marcadores utilizados aqui em relação à quantidade desses eventos de recombinação observados para esses mesmos microssatélites quando verificamos o banco de dados do MARC, conforme pode ser visto na Tabela 4.

Outro fator extremamente importante para a construção de mapas de ligação precisos é o número de marcadores utilizados para tal. Nesse trabalho, utilizamos apenas oito microssatélites por cromossomo, o que gerou mapas com espaçamentos médios entre os marcadores de 21,18cM no cromossomo cinco e 24,87cM no sete. Barendse *et al.* (1994) cobriu 90% do genoma bovino (2,513cM) utilizando 202 marcadores, o que gerou média de um marcador a cada 12,75cM. Itoh *et al.* (2005) construíram mapas de ligação dos cromossomos bovinos através de painéis híbridos irradiados (RH) utilizando 5,593 marcadores, dos quais 3,216 são do tipo microssatélite, e que distribuídos ao longo dos cerca de 3.000cM do genoma bovino, possibilitaram o posicionamento de, em média, mais de 1

marcador por centiMorgan, aumentando muito a acurácia da predição das distâncias estimadas entre esses marcadores.

Tabela 4 – Número de meioses informativas observadas para os marcadores utilizados nesse estudo encontrados no banco de dados do MARC e observados em nosso trabalho.

Cromossomo	MARC	Embrapa
Crn 5		
BM6026	445	678
BM321	2810	317
BMS1617	1230	657
BMS490	321	499
BMS1248	3454	440
ETH152	259	502
ISLTS034	322	622
BP1	3016	445
Média	1482,125	520
Crn 7		
INRA192	2522	606
BM9065	1484	479
ILSTS006	4727	457
BM7160	1673	549
BM2607	156	550
BOBT24	261	601
IL4	3620	601
BM6117	558	207
Média	1875	506,25

Uma vez que o mapa de ligação é função do número de marcadores e animais utilizados e também da população em estudo (Lynch e Walsh, 1998), decidimos utilizar os mapas construídos por nós usando a geração F₂ para o mapeamento de QTL.

5.3. QTLs para características de crescimento

No mapeamento de QTLs para características de crescimento foram analisadas as medidas de peso ao nascimento (PN), peso aos 60 dias (P60), peso aos 205 dias (P205) e peso aos 365 dias (P365) para os dois cromossomos, com o uso do software *QTLEXPRESS* (Seaton *et al.*, 2002). Foram incluídos no modelo efeitos aditivos e de dominância do QTL, além dos efeitos fixos de ano/estação e sexo dos animais. As médias e desvios-padrões para cada uma das características estudadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Número de animais amostrados (n), média e desvio-padrão das características PN, P60, P205 e P365.

Característica	n	Média (Kg)	Desvio-padrão (Kg)
PN	294	27,8	5,1
P60	288	55,2	8,6
P205	271	107	21,1
P365	276	160,5	35,3

Não foi detectada a presença de nenhum QTL para essas características no cromossomo sete. Já no cromossomo cinco, observamos a presença de um QTL significativo ($P < 0,01$, $F = 7,47$ e $LOD = 3,16$) apenas para PN localizado a 82cM do marcador mais centromérico (Figura 10), entre os marcadores BMS1617 e BMS490. Nenhum QTL foi detectado para as outras avaliações de características de crescimento.

A porcentagem da variância fenotípica que pode ser explicada pelo QTL foi de 4,45%, enquanto que o efeito aditivo do QTL sobre a característica foi de $-1,803 \pm 0,493$ Kg. O sinal negativo do efeito de substituição realizado pelo software indica que o alelo que contribui para maior peso ao nascimento tem origem na raça Gir. As fêmeas têm peso, em média, 2,775

$\pm 0,583$ Kg menor que os machos, valor já esperado em se tratando de bovinos onde as fêmeas geralmente são menores.

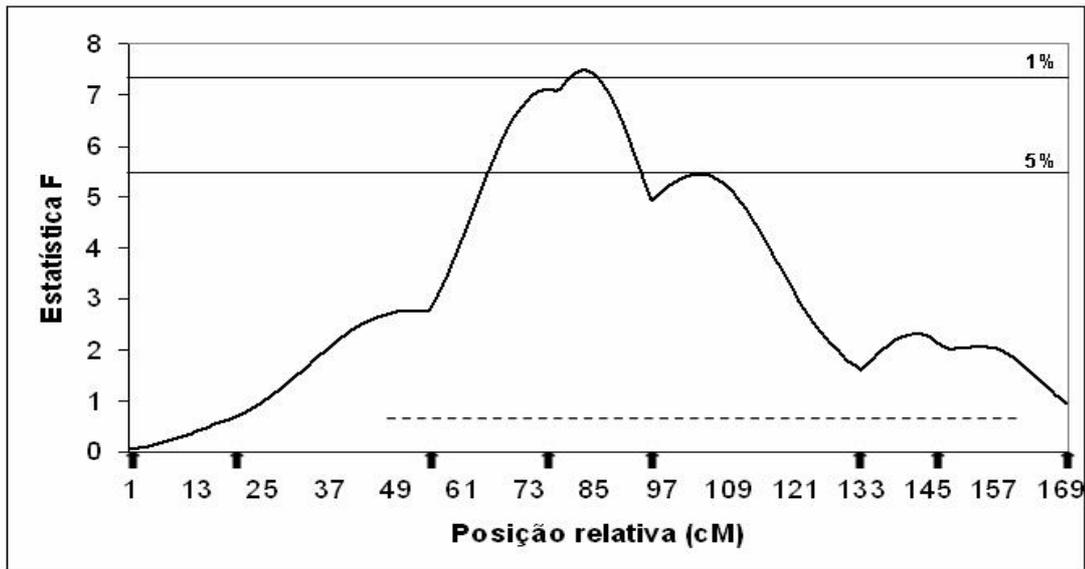


Figura 10 – Distribuição da estatística F ao longo do cromossomo cinco para peso ao nascimento, utilizando o mapa Embrapa. As setas ao longo do eixo X indicam as posições dos marcadores BM6026, BM321, BMS1617, BMS490, BMS1248, ETH152, ILSTS034 e BP1, respectivamente. O maior valor de F (7,48) para o QTL está localizado à 82cM. A linha contínua superior indica significância de 1% ($F = 7,405$) e a linha contínua inferior indica significância de 5% ($F = 5,429$) para PN. A linha tracejada indica 95% do intervalo de confiança do QTL (42 – 161cM).

Já foram descritos QTL em diferentes cromossomos dos bovinos para a característica peso ao nascimento, principalmente no cromossomo cinco, conforme apresentado na introdução. Machado *et al.* (2003a) estudando características de crescimento no cromossomo cinco de bovinos da raça Canchim, verificaram a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para PN à 82,9cM do centrômero, e com distância de 9,4cM do gene IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), considerado por alguns autores (Ge *et al.*, 2001) como um provável gene candidato para a característica. Li *et al.* (2002), ao realizarem estudos de associação para características de crescimento em uma população comercial de *B. p. taurus* utilizando haplótipos de SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polimorphism*, ou polimorfismo de um único nucleotídeo), encontraram três regiões distintas do cromossomo cinco que tiveram associação significativa com peso ao nascimento. No entanto, tanto Machado *et al.* (2003a) quanto Li *et al.* (2004) refutaram a hipótese do gene IGF-1 (localizado a 73,5cM) ser o responsável pelo QTL para peso ao nascimento no cromossomo cinco.

As análises de QTL para as demais características de crescimento (P60, P205 e P365) no cromossomo cinco não alcançaram níveis significativos, demonstrando que há algo nessa região do genoma bovino que influencia PN sem alterar as outras características. Esse resultado é, de certo modo, surpreendente, uma vez que as características PN e P60 estão correlacionadas (Kootz *et al.*, 1994). Miyata (2006) observou QTL sugestivos ($P < 0,05$) tanto para PN quanto para P60 no cromossomo 14 dos bovinos, confirmando a correlação entre as características. Mas uma vez que foi encontrado um QTL influenciando PN sem afetar P60, isso demonstra que essa correlação pode ser quebrada, e que o melhoramento assistido por marcadores nesse cromossomo pode supostamente selecionar animais para uma característica sem que a outra seja alterada. Isso seria muito útil para minimizar efeitos nocivos de distocia (dificuldades de parto) nos bovinos, uma vez que animais muito pesados ao nascer geram prejuízos à produção animal por causa da morte do bezerro e morte ou comprometimento

reprodutivo da mãe (Grosz e MacNeil, 2001). Ainda segundo esses autores, as perdas anuais causadas pela distocia nos Estados Unidos podem chegar a 83,4 milhões de dólares no gado leiteiro e U\$142,5 milhões no caso de bovinos de corte.

5.4 Mapeamento de QTLs para resistência aos parasitas

5.4.1. Endoparasitas

Quando os cromossomos cinco e sete foram analisados, não foi possível detectar nenhuma associação significativa dos marcadores com resistência aos endoparasitas, avaliada através das contagens de ovos por grama de fezes (OPG).

Benavides *et al.* (2002) demonstraram que é possível encontrar associação significativa entre marcadores microssatélites e OPG em ovinos. Eles estudaram o cromossomo cinco desses animais, o qual possui regiões homólogas ao cromossomo sete dos bovinos, pois é nele onde estão situados os genes da IL-3, IL-4 e IL-5, e concluíram que marcadores ou genes próximos aos genes das interleucinas controlam parte da variação genética para a resistência dos hospedeiros aos endoparasitas, provavelmente atuando sobre células efectoras e liberação de anticorpos específicos.

Sabe-se também que a resposta dos animais contra endoparasitas é altamente influenciada pela qualidade da nutrição do hospedeiro (Amarante *et al.*, 2004b), e que animais alimentados com comida enriquecida por proteínas metabolizáveis demonstram maior resistência a infecções por nematóides (Coop and Kyriazakis, 2001). Porém, Louvandini *et al.* (2002), estudando bezerros da raça holandesa infectados por *Haemonchus placei*, observaram que os animais que receberam uma alta dose de proteína (HP) junto com a alimentação continham significativamente mais endoparasitas adultos ($11,900 \pm 7,660$) do que aqueles que receberam alimentação com menor teor de proteína (LP)($5,450 \pm 7,895$), e as contagens de

OPG nos animais HP também foram maiores do que àquelas dos animais LP, sem que isso significasse que os animais HP estivessem mais susceptíveis aos endoparasitas, pois os valores dos hematócritos e o peso corporal dos animais HP eram bem melhores do que os dos animais LP. Isso demonstra que não necessariamente animais com alta contagem de OPG são menos resistentes, e sim demonstram que são mais resilientes, ou seja, tendem a suportar melhor a infecção do que aqueles em pior condição nutricional. É provável que o mesmo efeito possa ser observado ao lidarmos com animais geneticamente mais resistentes que outros.

5.4.2. Ectoparasitas

Não foi mapeado nenhum QTL para resistência à berne no presente estudo, o que não significa que isso não seja possível para o delineamento experimental adotado aqui. Miyata *et al.* (2005) mapearam um QTL ($P < 0,10$) para resistência ao berne à 71cM do cromossomo 14 dessa mesma população F₂.

Obtivemos, na estação chuvosa, média de $35,57 \pm 41,83$ bernes por animal, calculada a partir de 302 medições, onde nove animais não foram infestados por larvas da mosca *Dermatobia hominis* e sete animais apresentaram contagens superiores a 150 bernes no corpo, com valor máximo observado de 284. O índice de correlação entre a contagem de bernes e a contagem de carrapatos foi de apenas 0,112. Na época seca, a média observada foi de $32,035 \pm 54,436$, em um total de 338 avaliações, com 21 animais sem berne algum pelo corpo e 11 com mais de 150 infestações, onde a maior contagem foi de 558 bernes em um único indivíduo. O índice de correlação entre o número de bernes e de carrapatos nos animais foi mais baixo ainda que o observado na estação chuvosa (0,0355). Calculamos também a média e o desvio-padrão da contagem de berne separando os animais de acordo com a cor da pelagem e o tipo de pêlo, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Média e desvio padrão das contagens de bernes avaliadas quanto à cor (1- 100% clara, 2 - > 75% branco, 3 - 50% a 75% branco e 4 - < 50% branco) e tipo da pelagem (1 - curto e liso, 2 - curto e enrolado, 3 - longo e liso e 4 - longo encaracolado).

cor	número de avaliações	média	Desvio- padrão
1	58	21,1	43,5
2	151	22,1	27,01
3	208	37	58,2
4	221	41,84	48,2
tipo	número de avaliações	média	Desvio-padrão
1	345	30,17	39,28
2	138	27,54	33,94
3	112	54,19	79,47
4	43	28,27	25,41

Já para as contagens de carrapatos na estação chuvosa, foram 302 observações, com média de 40 carrapatos por animal, e desvio padrão de 72,416. O tamanho exagerado do desvio padrão em relação à média foi devido a oito animais que apresentaram mais de 200 carrapatos cada, um deles com carga parasitária de 792 carrapatos. 25 animais não tinham nenhum carrapato no corpo. Já na estação seca, obtivemos média de 33 carrapatos/animal, com desvio padrão de 43,306. Esse menor valor de desvio padrão em relação ao encontrado para a estação chuvosa pode ser explicado pela melhor distribuição das contagens em torno da média nesse conjunto de dados, uma vez que apenas quatro animais apresentaram contagem superior a 200 carrapatos por animal, e o maior valor observado foi de 418 carrapatos infestando um único indivíduo. Apenas 10 animais, de um total de 338, estavam completamente livres de infestação.

O teste de normalidade através da metodologia proposta por Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk, 1965) realizado pelo software *BioStat 1.5.0* indicou que a transformação dos dados de contagem de carrapato através de $\log_{10}(x + 1)$ não foi efetiva ($P > 0,05$) para ambos os conjuntos de dados. Porém, o resultado foi significativo ($P < 0,05$) para as duas estações

quando aplicamos o teste de normalidade segundo a metodologia proposta por D'Agostino (Baringhaus and Henze, 1990).

O índice de correlação entre as contagens de carrapato na estação seca e chuvosa foi de 0,05, enquanto que a correlação entre as contagens de berne nas duas estações foi de -0,14. Uma vez que a correlação é a medida padronizada da relação entre duas variáveis, e que valores próximos de zero indicam que as duas variáveis não estão relacionadas, essa é mais uma evidência de que os dados das estações seca e chuvosa deveriam realmente ter sido analisados separadamente.

De acordo com a análise de variância realizada através do software SAS (2002), a contagem de carrapato após normalizada era influenciada por diferentes efeitos do ambiente, de acordo com a estação em que era analisada. Nas contagens obtidas durante a época das chuvas, apenas ano de contagem e tipo do pêlo foram significativos ($P < 0,01$), enquanto que para os valores obtidos na estação seca, cor e tipo de pêlo tiveram influência significativa sobre as contagens. Embora alguns autores (Stear *et al.*, 1990, Martinez *et al.*, 2006) observaram efeitos significativos de sexo sobre resistência ao carrapato, possivelmente devido à diferenças hormonais, esse efeito não foi verificado em nossos dados.

Em um primeiro momento, realizamos o mapeamento de QTL para resistência ao carrapato considerando apenas o efeito aditivo. Com isso, na estação chuvosa, encontramos um QTL significativo no cromossomo cinco ($P < 0,01$) e um indicativo de QTL ($P < 0,10$) no cromossomo sete. Para a época seca, verificamos um QTL sugestivo ($P < 0,05$) no cromossomo sete.

Re-analisamos os QTL, dessa vez incluindo efeitos de dominância no modelo, e calculamos a significância do efeito de dominância sobre a variância fenotípica explicada pelos QTL encontrados através de um teste T confrontando o modelo completo e o reduzido. Como resultado, verificamos que, tanto o QTL do cromossomo cinco na estação chuvosa ($P <$

0,01), quanto os QTL do cromossomo sete nas duas estações ($P < 0,05$), estão sob efeitos de dominância além dos efeitos aditivos, o que significa que o tipo de combinação dos alelos também é importante para definir a resistência do animal.

Com o efeito de dominância incluído no modelo de mapeamento de QTL, observamos que a significância do QTL encontrado no cromossomo cinco caiu de 1% para 5% ($F = 6,63$, $LOD = 2,815$)(Figura 11), o suposto QTL encontrado no cromossomo sete nos dados da estação chuvosa não foi mais detectado, e a significância do provável QTL localizado no cromossomo sete para a época seca passou de 5% para 10% ($F = 4,52$, $LOD = 1,935$)(Figura 12).

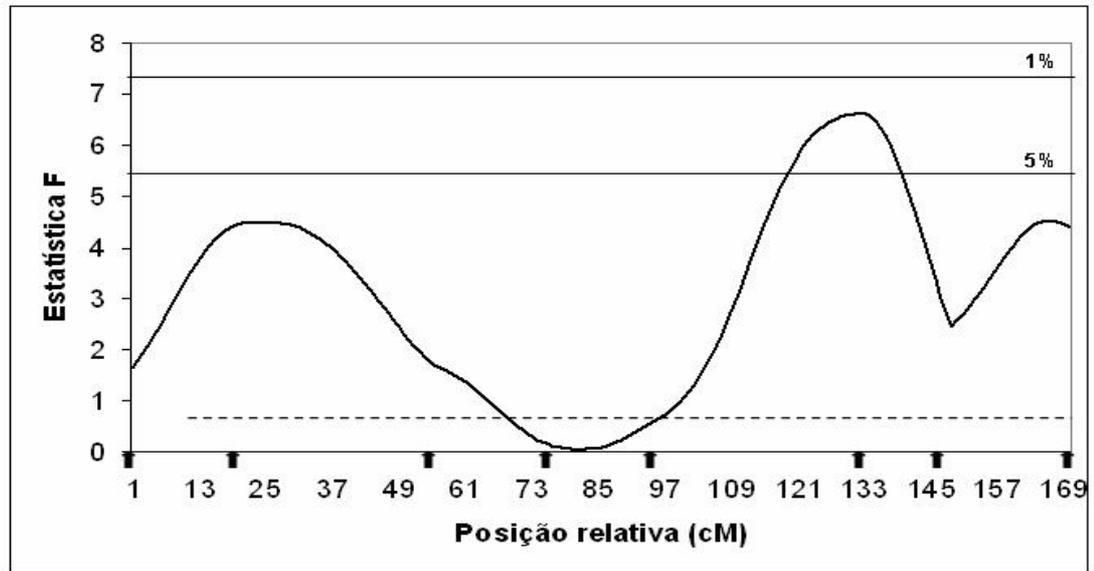


Figura 11 - Distribuição da estatística F ao longo do cromossomo 5 para resistência ao carrapato na estação chuvosa, utilizando o mapa Embrapa. As setas ao longo do eixo X indicam as posições dos marcadores BM6026, BM321, BMS1617, BMS490, BMS1248, ETH152, ILSTS034 e BP1, respectivamente. O maior valor de F (4,52) para o QTL está localizado à 132cM. A linha contínua superior indica significância de 1% ($F = 7,372$) e a linha contínua inferior indica significância de 5% ($F = 5,401$) para PN. A linha tracejada indica 95% do intervalo de confiança do QTL (11 – 169cM).

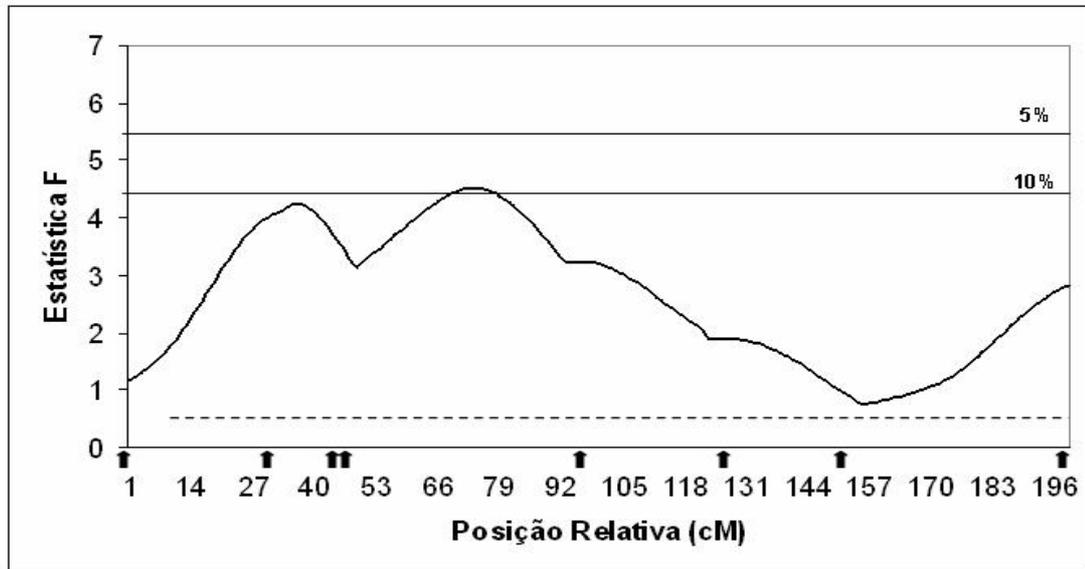


Figura 12 - Distribuição da estatística F ao longo do cromossomo 7 para resistência ao carrapato na estação seca, utilizando o mapa Embrapa. As setas ao longo do eixo X indicam as posições dos marcadores, BM7160, BM2607, BOBT24, IL4, M6117, INRA192, BM9065 E ISLTS006, respectivamente. O maior valor de F (4,52) para o QTL está localizado à 73cM. A linha contínua superior indica significância de 5% ($F = 5,383$) e a linha contínua inferior indica significância de 10% ($F = 4,50$) para PN. A linha tracejada indica 95% do intervalo de confiança do QTL (9,5 – 198cM).

Determinamos a quantidade da variância fenotípica que poderia ser explicada pelo efeito aditivo dos QTL mapeados. No caso do QTL do cromossomo cinco, o efeito aditivo corresponde a 1,7% da variância fenotípica observada, enquanto que esse valor sobe para 1,88% para o QTL do cromossomo sete.

Quanto à influência do tipo de pêlo sobre a contagem dos carrapatos, verificamos que animais de pêlo longo e enrolado apresentaram mais de duas vezes mais carrapatos que aqueles que tinham pêlo curto e liso (Tabela 7). Essa tendência de quanto maior a espessura do pelame, maior o número de carrapatos encontrados, também foi observada por Fraga *et al.* (2003) e Martinez *et al.* (2006). Pêlos longos dificultam a prática da autolimpeza praticada pelos bovinos contra os carrapatos (Fraga *et al.*, 2003). Além disso, outro ponto importante sobre essa questão é que animais com capa do pelame mais apropriada para regiões tropicais (pêlos curtos, grossos e assentados) e, portanto, menor espessura de pelame, apresentam as menores taxas de estresse calórico e, conseqüentemente, maiores níveis de resistência a ectoparasitas, pois o estresse térmico pode afetar a resistência dos animais contra os parasitas (Veríssimo, 1991, Hansen *et al.*, 2004). O efeito do estresse sobre resistência do hospedeiro pode explicar também o motivo pelo qual quanto mais escuro o animal, mais carrapatos apresentou (Tabela 7), efeito também observado por Fraga *et al.* (2003).

Tabela 7 – Média e desvio padrão das contagens de carrapatos avaliadas quanto à cor (1- 100% clara, 2 - > 75% branco, 3 - 50% a 75% branco e 4 - < 50% branco) e tipo da pelagem (1 - curto e liso, 2 - curto e enrolado, 3 - longo e liso e 4 - longo encaracolado).

cor	número de avaliações	média	Desvio- padrão
1	58	18.172	17.620
2	151	33.829	40.515
3	208	42.048	58.617
4	221	44.505	77.448
tipo	número de avaliações	média	Desvio-padrão
1	344	28.470	32.808
2	138	53.377	93.147
3	112	44.549	54.306
4	43	59.864	91.069

A idéia de utilizar uma abordagem molecular para estudar as causas da variabilidade da resistência do bovino ao carrapato não é nova. Em 1968, Ashton *et al.* encontraram associação entre um fenótipo molecular da albumina sérica bovina, cujo gene está localizado no cromossomo três, e infestação de carrapatos em várias populações de bovinos na Austrália. Panepucci *et al.* (1989), estudando esse mesmo loco de isoenzima, encontrou associação entre outra variante da albumina e carga parasitária em bovinos da raça Canchim. Porém, o fenótipo molecular associado à resistência ao carrapato observado por Ashton *et al.*, (1968) não é o mesmo identificado por Panepucci *et al.*, (1989), o que significa que não é a albumina sérica a responsável por conferir maior ou menor resistência, e sim algum gene que está próximo ao gene da albumina, e que o alelo favorável à resistência desse gene desconhecido está em fase de ligação diferente com os alelos da albumina sérica nessas duas populações.

Segundo Frish (1999), a maneira mais rápida de aumentar a resistência ao carrapato em populações bovinas seria a introgressão de genes com grande efeito sobre a característica (genes principais) em populações bovinas de raças reconhecidamente menos resistentes, porém que demonstram melhores características de produção. Segundo ele, foi identificado um gene (Adaptaur) que, em homozigose no indivíduo, seria responsável pela diminuição em

75% do número total de carrapatos no hospedeiro em relação aos animais hererozigotos para o loco em questão. Porém, esses resultados obtidos por Frish (1999) foram desmentidos por Henshall *et al.* (2004), que além de terem maior número de dados disponíveis, ajustaram as análises para efeitos fixos e poligênicos, e que uma vez incluídos no modelo, esses efeitos não indicaram a presença de um único gene principal agindo sobre a característica, mas também não excluíram a hipótese de que resistência ao carrapato está sob influência genética.

Acosta-Rodríguez *et al.* (2005), analisando marcadores microssatélites no complexo BoLA (cromossomo 23 dos bovinos), encontraram associação entre dois desses microssatélites e infestação de carrapatos em duas diferentes raças de bovinos no México. Martinez *et al.* (2006), utilizando a mesma população experimental que foi estudada nesse trabalho, verificaram associação significativa ($P < 0,05$) entre alelos do BoLA-DRB32 e contagem de carrapatos, sugerindo que esses marcadores poderiam ser utilizados na seleção de animais geneticamente mais resistentes ao carrapato, idéia já aplicada há algum tempo por Maillard *et al.* (2003), os quais verificaram redução altamente significativa nos índices de dermatofilose de uma população de bovinos zebu ao realizarem seleção assistida por marcadores durante 5 anos utilizando haplótipos de marcadores situados no complexo BoLA previamente identificados como estando associados à alta susceptibilidade ($h = 0,96$) à doença.

Resistência ao carrapato é uma característica que apresenta índices baixos a moderados de herdabilidade, conforme observado em várias populações de bovinos. Em uma revisão realizada por Davis (1993), o autor encontrou herdabilidade média de $0,34 \pm 0,06$ para a característica, valor similar ao observado para a herdabilidade de caracteres de produção leiteira em regiões de clima temperado. Henshall *et al.* (2004) verificou valores de $0,41 \pm 0,08$ para média de contagem de carrapato em populações de *B. p. taurus*. No presente estudo, a herdabilidade não foi estimada, porém verificamos que resistência ao carrapato é uma

característica que apresento efeito aditivo. Uma vez que características que apresentam níveis baixos a moderados de herdabilidade são as que mais seriam aproveitadas em sistemas de seleção assistida por marcadores (Davis e DeNise, 1998), podemos concluir que é possível aumentar a resistência média ao carrapato de uma população de bovinos realizando melhoramento genético assistido por marcadores.

Uma possível explicação para um QTL ser mapeado ao analisarmos uma estação, e desaparecer quando estudamos a outra, é a grande influência de fatores ambientais e fisiológicos que podem alterar a contagem desses parasitas nos bovinos. Cor e tipo de pelagem são importantes fatores que influenciam a carga parasitária no animal, uma vez que animais mais escuros poderiam se apresentar imunologicamente menos competentes sob o calor dos trópicos devido ao estresse térmico (Hansen *et al.*, 2004). Temperatura do ambiente e percentual de umidade do ar também são variáveis que podem alterar bastante a contagem de carrapatos (Powell e Reid, 1982). O efeito aditivo do QTL é determinado como sendo metade da diferença observada entre as linhagens parentais 1 e 2, após a associação dos genótipos com o fenótipo estudado. Valores positivos indicam que os alelos responsáveis por alterar a característica são oriundos da linhagem 1 (touro holandês, no presente estudo). Verificamos que o efeito aditivo do QTL mapeado no cromossomo cinco possui sinal negativo, indicando que os alelos que reduzem a carga parasitária, nesse caso, vêm do Gir. Esse QTL foi mapeado quando dados da estação chuvosa foram analisados, sendo que essa estação compreende o intervalo entre os meses de outubro a março, caracteristicamente o período mais quente em países do hemisfério sul por abranger a primavera e o verão. Por outro lado, o efeito aditivo do QTL mapeado no cromossomo sete teve valor positivo, indicando que alelos de origem taurina estão reduzindo a contagem de carrapato na estação seca, que compreende os meses de abril a setembro, coincidindo com o outono e inverno, estações mais frias. Portanto, as diferentes origens dos alelos que estão influenciando

contagem de carrapato nas diferentes estações estudadas, onde genes de gado holandês influenciam a contagem na época fria do ano, e genes do gado Gir modificam a carga parasitária nas estações mais quentes do período, talvez possam ser explicadas pelo fato de animais *B. p. indicus* estarem mais adaptados ao clima tropical em relação aos animais *B. p. taurus*, os quais conseguem ser mais efetivos no controle da carga parasitária apenas nos meses mais frios.

Portanto, os resultados encontrados nesse trabalho indicam que é possível mapear regiões do genoma bovino que influenciam características de crescimento e de resistência contra parasitas.

Uma maneira de aumentar os níveis de significância dos QTLs para resistência seria utilizarmos mais marcadores na região próxima à apontada como sendo responsável por influenciar a característica, ou mesmo aumentar o número de avaliações fenotípicas. Com isso poderemos reduzir os intervalos de confiança desses QTLs, e talvez até mesmo apontarmos alguns possíveis genes candidatos para a característica em questão. Não podemos descartar os efeitos das citocinas sobre resistência ao carrapato mesmo que os QTLs tenham sido posicionados a uma considerável distância dos genes dessas proteínas, uma vez que os intervalos de confiança são extremamente altos, e compreendem praticamente o cromossomo inteiro. Uma vez que esses intervalos forem reduzidos, e possíveis genes sejam apontados como candidatos, novas populações devem ser estudadas para confirmar e validar os efeitos dessas regiões mapeadas sobre as características.

6. Conclusões

A partir do delineamento experimental F₂ realizado pelo cruzamento de touros da raça holandesa (*Bos primigenius taurus*) com vacas Gir (*Bos primigenius indicus*), desenvolvido pela EMBRAPA Gado de Leite, QTLs para peso ao nascimento e resistência ao carrapato *Rhipicephalus microplus* foram mapeados nos cromossomos cinco e sete, indicando que é possível mapear locos que controlam a variação nas características quantitativas analisadas através da utilização de marcadores microssatélites.

O fato de diferentes regiões de QTL terem sido observadas para as contagens de carrapato realizadas durante a estação seca e a estação chuvosa sugere a existência de interação QTL X ambiente.

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, 4th ed., W.B. Saunders Company, 2000, 378p.

ACOSTA-RODRIGUEZ, R., *et al.* Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. **Vet. Parasitol.**, v.27, p.313-321, 2005.

AGRInforma. Integração da cadeia bovina busca manter competitividade das exportações brasileiras. **Jornal do Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura**. Campinas, SP, ano III, nº 13, jan-fev 2005, p.2.

ALBERS, G.A.A.; GRAY, D.G. Breeding for worm resistance: a prospective. **Int. J. Parasitol.**, v.17, p.559-566, 1986.

ALBERS, G.A.A., *et al.* The genetic of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in young merino sheep. **Int. J. Parasitol.**, v.17, p.1355-1363, 1987.

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, Pirassununga, SP, 2004. **Anais...** Pirassununga, SP, 2004a.

AMARANTE, A.F.T., *et al.* Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Vet. Parasitol.**, v.120, p.91-106, 2004b.

ANDRADE, A.B.F. **Aspectos genéticos e ambientais da resistência a *Boophilus microplus* de bovinos da raça Gir, da estação experimental da EPAMIG, Uberaba, MG, Brasil.**

1996. 79p. Dissertação (mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 1996.

ANUALPEC 2004. **Anuário Estatístico da Pecuária Brasileira**. FNP Consultoria & Comércio. São Paulo, 2004. 376p.

ARAÚJO, R.N.; LIMA, W.S. Infecções helmínticas em um rebanho leiteiro na região Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, p.186-193, 2005.

ASHTON, G.C.; SEIFERT, G.W.; FRANCIS, J. An association between serum amylase phenotype and tick infestation in cattle. **Austr. J. Bio. Sci.**, v.21, p.303-308, 1968.

BARBOSA, P. F. Bases genéticas e evolutivas para a divergência das espécies de bovinos. **Ecossis**, v.13, p. 5-14, 1998.

BARENDSE W., *et al.* A preliminary map of the bovine genome. **Nat. Genet.**, v.6, p.227-235, 1994.

BARENDSE, W., *et al.* A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mamm. Genome.**, v.8, p.29-36, 1997.

BARINGHAUS L.; HENZE N. A test for uniformity with unknown limits based on D'Agostino's D. **Stat. Prob. Let.**, v.9, p.299-304, 1990.

BARON, E.L. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. 2004. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Genética e Melhoramento em animais domésticos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba, 2004.

BEH, K.J., *et al.* A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Thichostrongylus colubriformis* in sheep. **Anim. Genet.**, v.33, p.97-106, 2002.

BENAVIDES, M.V., *et al.* Association between microsatellite markers of sheep chromosome 5 and faecal egg counts. **Small Rum. Res.**, v.46, p. 97-105, 2002.

BENAVIDES, M.V., *et al.* Genetic variability of a *Bos taurus* X *Bos indicus* cross population and validation of genomic regions influencing nematode. IN: V SIRGEALC, 2005, Montevideo. Resúmenes del Simposio de Recursos Genéticos para America Latina y el Caribe, 2005, v.5, p.105-105.

BISHOP, M.D., *et al.* A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v.136, p.619-639, 1994.

BORGES, F.A., *et al.* Fauna helmintológica de bovinos da região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil, **Ci. Agr.**, v. 22, p.49-53, 2001.

BOTSTEIN, D., *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.32, p.314-331, 1980.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **J. Roy. Stat. Soc.**, v.26, p.211–252, 1964.

CARDOSO, V. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte.** 2000. 108p. Dissertação (mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 2000.

CASAS, E., *et al.* Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J Anim Sci.**, v.78, p.560-569, 2000.

CASAS, E., *et al.* A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. **J Anim Sci.**, v.79, p.854-860. 2001.

CASAS, E., *et al.* Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **J Anim Sci.**, v.81, p.2976-2983, 2003.

CASAS, E.; LUNSTRA, D.D.; STONE, R.T. Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. **Anim Genet.**, v.35, p.451-453, 2004.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait loci mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.

DARVASI, A., *et al.* Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated Genetic Map. **Genetics**, v.134, p. 943-951, 1993.

DAVIS, G.P. Genetic parameters for tropical beef cattle in northern Australia: a review. **Aust. J. Agr. Res.** v.44, p.179-198, 1993.

DAVIS, G.P.; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **J Anim Sci.**, v.76, p.2331-2339, 1998.

DE CASTRO, J.J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet Parasitol.**, v.71, p.77-97, 1997.

DEL LAMA, S.N., *et al.* Peptidase B polymorphism in cattle erythrocytes. **Biochem. Genet.**, v.30, p.247-255, 1992.

EPSTEIN, H. **The origin of the domestics animals of Africa**. New York, Africana Pub Corp, vol I, 1971.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília. EMBRAPA; CENARGEN, 1998.

FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunol.**, v.96, p.434-439, 1999.

FINKELMAN, F.D.; URBAN, J.F. The other side of the coin: the protective role of the Th2 cytokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.107, p.772-780, 2001.

FINKELMAN, F.D. *et al.* Interleukin-4 and interleukin-13 mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol. Rev.**, v.201, p.139-155, 2004.

FRAGA, A.B., *et al.* Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1578-1586, 2003.

FREITAS, M.G. **Helmintologia Veterinária**. 4. ed, Belo Horizonte, MG: Ed. Rabelo, 1980. 396 p.

FRIEND, J. B.; BISHOP, D. **Cattle of the World in Colour**. Poole: Dorset, Great Britain, Blandford Press, 1978. 198 p.

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J. Comparative evaluation of beef cattle breed of African, European and Indian origins (ii) Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. **Anim. Sci.**, v.67, p.39-48, 1989.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.57-71, 1999.

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J.; KELLY. M.J. Using genetics to control cattle parasites - the Rockhampton experience. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.253-264, 2000.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária (UFMG)**, Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, Boletim Técnico, n.8, p.49-61, 1993.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2. ed.,Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997, 646 p.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Immunol.**, v.85, p.120-124, 1995.

GASBARRE, L.C.; LEIGHTON, E.A.; SONSTEGARD, T.S. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.**, v.98, p.51–64, 2001.

GASBARRE, L.C. *et al.* Detection of QTL affecting parasite resistance in a selected herd of Angus cattle. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7th, Montpellier, 2002. **Proceedings...** Montpellier, 2002, p.13-07.

GE, W., *et al.* Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v.79, p. 1757-1762, 2001.

GÓMEZ-MUÑOZ. M.T., *et al.* Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Vet. Parasitol.**, v.120, p.199-214, 2004.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi.** Porto Alegre, edição do autor, 79p, 1995.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROCKES, S. **CRI-MAP version 2.4.** St. Louis, Washington University School of Medicine, 1990.

GRENCIS R.K. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v.29, p.1377-1384, 1997.

GROSZ, M.D.; MACNEIL, M.D. Putative quantitative trait locus affecting birth weight on bovine chromosome 2. **J Anim Sci.**, v.79, p.68-72, 2001.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195–1207, 1994.

HAMMOND, K. Small holder milk recording for developing countries. In: *Session. International Committee for animal recording, 29th*. Ottawa, 1994. **Proceedings...** Ottawa, 1994.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.** v.82, p.349-360, 2004.

HAJNICKA, V., *et al.* Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. **Parasite Immunol.**, v.22, p.201–206, 2000.

HAJNICKA, V., *et al.* Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol.**, v.23, p.483–489, 2001.

HAJNICKA, V., *et al.* Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission **Parasitol.**, v.130, p.333–342, 2005.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195-1207, 1994.

HALLERMAN, E.M., *et al.* Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphisms using homologous and heterologous deoxyribonucleic acid probes. **J. Dairy Sci.**, v.71, p.3.378-3.389, 1988.

HENKES, L.E., *et al.* Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus-Ibague cattle populations. **Genet. Mol. Biol.**, v.28, p.60-66, 2005.

HENSHALL, J.M. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. **Austr. J. Agric. Res.** 55, 1109–1116, 2004.

HORN, S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. 2. ed., **Boletim da Defesa Sanitária Animal**; Brasília: Ministério da Agricultura, 79 p, 1983.

IHARA, N., *et al.* A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. **Genome Res.**, v.14, p.1987-1998, 2004.

ITOH, T., *et al.* A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics**, v.85, p.413-424, 2005.

JANSEN, R.C. The nature and identification of Quantitative Trait Loci: a Community's View. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, p.911-916, 2003.

KNOTT, S.A.; HALEY, C.S. Multitrait least squares for Quantitative Trait Loci detection. **Genetics**, v.156, p. 899-911, 2000.

KOOTS, K.R.; GIBSON, J.P.; WILTON, J.W. Analyses of published genetic parameter estimates for beef production traits. 2- Phenotypic and genetic correlations. **Anim. Breed. Abstr.**, v.62, p.825-853, 1994.

LAHAV, T., *et al.* Marker-assisted selection based on a multi-trait economic index in chicken: Experimental results and simulation. **Anim. Genet.**, v.37, p.482-488, 2006.

LI, C., *et al.* The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.1187-1194, 2002.

LI, C., *et al.* Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1-7, 2004.

LIU, B.H. **Statistical Genomics: Linkage Mapping and QTL Analysis**, Boca Ranton, CRC Press, 1998, 611 p.

LOFTUS, R.T.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.91, p.2757-2761, 1994.

LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; COOP, R.L.; MCMANUS, C.M.; GENNARI, S.M. Effect of dietary protein intake on calf resilience to *Haemonchus placei* infection. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v.39, p.227-232, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Massachusetts, Inc. Publishers Sunderland, 1998, 980 p.

MACHADO, M.B.B. **Análise de QTL no cromossomo 5 de uma população de bovinos da raça Canchim**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

MACHADO, M.B.B., *et al.* QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genet. Mol. Biol.**; v.26, p.259-265, 2003a.

MACHADO, M.A., *et al.* Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **R Bras Zootec.**, v.32, p.93-98, 2003b.

MACNEIL, M.D.; GROSZ, M.D. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford x composite double backcross populations. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.2316-2324, 2002.

MADALENA, F.E., *et al.* Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B.microplus*). **R. Bras. Genet.**, v.8, n.2, p.361-375, 1985.

MARSHALL, T.C., *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Mol. Ecol.**, v.7, p.639-655, 1998.

MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos**. Belo Horizonte, editora da Universidade Federal de Minas Gerais, 1969, 586 p.

MAILLARD, J.C., *et al.* Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. **Genet. Sel. Evol.**, v.35, p.193-200, 2003.

MARTINEZ, M.L., *et al.* Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genet. Mol. Res.**, v.5, p.513-524, 2006.

MIYATA, M., *et al.* Mapeamento de QTLs para peso ao nascimento no cromossomo 14 de bovinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42, 2005, Goiânia. **Anais...** 42 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005.

MIYATA, M. **Mapeamento de QTLs para características de crescimento e de resistência no cromossomo 14 de bovinos F₂ provenientes de um cruzamento Gir x Holandês.** 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. The role of interleukin-10 in cross regulation of Th1 and Th2 responses. **Immunol. Today**, v.12, p.49-53, 1991.

MOSMANN, T.R.; SAS, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v.17, p.138-146, 1996.

MUKESH, M., *et al.* Genetic diversity on Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite markers. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.121, p.416-424, 2004.

NETO, M.P.; FONSECA, A.H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, p.148-152, 2002.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World.** 6th ed. Baltimore. The John Hopkins University Press, 1999, 2015 p.

OGILVIE, B.M.; JONES, V.E. Passive protection with cells or antiserum against *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat. **Parasitol.**, v.58, p.939-949, 1968.

OGILVIE, B.M.; LOVE, R.J. Co-operation between anti-bodies and cells in immunity to a nematode parasite. **Transplant Rev.**, v.19, p.147-168, 1974.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação Natural. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 24, p.1267-1271, 1989.

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

OMS/OPS. **Diagnóstico de la salud animal en las Americas**. Washington D.C: 1983. 223 p.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **Am. J. Hum. Genet.**, v.51, p.283-290, 1992.

PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG.**, v.4, 1990, 65 p.

POWELL, R.T.; REID T.J. Project tick control. **Queensland Agric. J.**, v.108, p.279-300, 1982.

ROCHA, J.L., *et al.* Predictors of marker-informativeness for an outbred F2 design. **Anim. Genet.**, v.32, p. 365-370, 2001.

SANTIAGO A.A. **Os Cruzamentos na pecuária bovina**. São Paulo: Ed Instituto Zootecnia, 1975, 549 p.

SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide Version 8.0**. 5th ed. Cary North Carolina, 2000, v.3.

SAYERS, G., *et al.* Intron 1 of the interferon γ gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. **Res. Vet Sci.**, v.79, p.191-196, 2005a.

SAYERS, G., *et al.* Major Histocompatibility Complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. **Parasitology**, v.131, p.401-409, 2005b.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nat. Rev. Genetics.**, v.5, p.63-69, 2004.

SEATON, G., *ET AL.* QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.18, p.339-340, 2002.

SEQUEIRA, T.C.G.O.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia animal**: Animais de Produção. Rio de Janeiro, EPUB, 2002, 149 p.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test of normality (complete samples). **Biometrika**, v.52, p.591-611, 1965.

SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. **Anatomia de los animales domésticos**. Mallorca, Ed. Salvat S.A., 1977, 952 p.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1993, v.2, 465 p.

SONSTEGARD, T.S.; GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Vet Parasitol.**, v.22, p.387-403, 2001.

STEAR, M.J., *et al.* The relationships among ecto- and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. **Vet. Parasitol.**, v.34, p.303-321, 1990.

STONE, R.T., *et al.* A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **J Anim Sci.**, v.77, p.1379-1384, 1999.

STONE, R.T., *et al.* Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. **J. Anim. Sci.**, v.83, p.2280-2288, 2005.

STUDART, M.T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLPs**. 2001. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

SUAREZ, V.H. *et al.* Epidemiology effects and control of nematode infections on Zebu crossbred, Hereford and Hereford × Brahman calves of Argentina's Western Pampas. **Vet. Parasitol.**, v.35, p.79–91, 1997.

TAMBASCO, A.J. **Contribuição ao estudo citogenético em bovinos normais e em bovinos com problemas de reprodução.** 1976. 97 f. Tese (Doutorado em melhoramento animal) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1976.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl. Ac. Res.**, v.17, p.6463-6471, 1989.

TALIAFERRO, W.H.; SARLES, M.P. The cellular reactions in the skin, lungs and intestine of normal and immune rats after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. **J. Infect. Dis.**, v.64, p.157-192, 1939.

TEODORO, R.L., *et al.* Resistência genética dos bovinos ao carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de touros mestiços sob infestação artificial. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 21, Belo Horizonte, MG, 1984. **Anais...** Belo Horizonte, MG, p.54. 1984.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. Carga parasitária de *Boophilus microplus* em vacas mestiças Europeu x zebu. **R. Soc. Bras. Zoot.** V.23, p.223-228, 1994.

TEODORO, R.L., *et al.* Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, SP, 2004.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma introdução.** São Paulo. Roca. 6. ed. 2002, 532 p.

THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: SEMINARIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DOS BOVINOS, I. Campo Grande, 1979, p.207-215. **Anais...** Campo Grande, MS, 1979.

URBAN, J.F; KATONA, I.M.; FINKELMAN, F.D. *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ Tcells regulate the IgE response and protective immunity in mice. **Exp Parasitol.**, v.73, p.500-511, 1991.

UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors affecting resistance. **Aust.J.Agric.Res.**, v.29, p.411-422, 1978.

VERÍSSIMO, C.J. **Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***. 1991. 169p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 1991.

VERÍSSIMO, C.J.; OLIVEIRA, A.A.D. Método simplificado de contagem para avaliar a resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. **B. Indústria Animal**, v.51, p.169-73, 1994.

VERÍSSIMO, C.J., *et al.* Resistência e suscetibilidade de bovinos mestiços leiteiros ao carrapato *Boophilus microplus*. **B. Indústria Animal**, v.54, p. 1-10, 1997.

VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, v.143, p.1013-1020, 1996.

WALDVOGEL, A.S., *et al.* Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*., **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.97, p.53-63, 2004.

WAMBURA, P.N., *et al.* Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos Taurus*. **Vet. Parasitol.** v.77, p.63-70, 1998.

WELLER, J.I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.2525-2537, 1990.

WICKEL, S.K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.851-859, 1999.

WINDON, R.G. Resistance mechanisms in the *Trichostrongylus* selection flocks. In: GRAY, G.D.; WOOLASTON, R.R. **Breeding for disease resistance in sheep**. Melbourne: Australian Wool Corporation, 1991, p.77-86.

WOLOWCZUK, I., *et al.* Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon-gamma production and leads to an aggravation of the disease. **Immunol**, v.9, p.35-44, 1997.

YANG, R.; YI, N; XU, S. Box–Cox transformation for QTL mapping. **Genetica**, v.128, p.133-143, 2006.

ZADWORNÝ, D.; KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theor. Appl. Genet.**, v.80, p.631-634, 1990.

ZEUNER, F.E. **A History of domesticated animals**. London: Hutchinson. 1963, 560 p.