

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia

Karla Gasparini dos Santos

**MAPEAMENTO FINO DE QTL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AO
CARRAPATO EM BOVINOS DE LEITE**

Juiz de fora

2011

Karla Gasparini dos Santos

**Mapeamento fino de QTL associados à resistência
ao carrapato em bovinos de leite**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Marco Antonio Machado

Co-orientadora: Dr^a Ana Luisa Sousa Azevedo

Juiz de Fora

2011

Santos, Karla Gasparini dos.

Mapeamento fino de GTL associados à resistência ao carrapato em bovinos de leite. / Karla Gasparini dos Santos. – 2012.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia.)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Imunidade. 2. Bovinos I. Título.

CDU 57.083

Dedico essa dissertação a todos que me apoiaram e que acreditam no meu sucesso, meus pais, Rosangela e Nilton; meus irmãos, Joaquim e Thiago e ao meu namorado Arthur.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, amor incondicional, pela presença e principalmente pelo financiamento, pois sem ele não conseguiria realizar essa etapa na minha vida.

Aos meus irmãos Joaquim e Thiago, por todo carinho, confiança e amizade.

Aos meus sobrinhos, me desculpo pela ausência no crescimento e agradeço cada carinho e sorriso.

Ao meu namorado Arthur, pela ajuda, pelo “colo” em muitos dias de desespero e principalmente por todo amor, paciência e carinho a mim dedicado.

À minha dinda Mere, Vovó Cecília, Tia Nenen e ao meu primo Felipe, por todo amor, conversas, conselhos e confiança.

Ao Dr. Marco Antonio, pela orientação, oportunidade e apoio.

À Dr^a. Ana Luisa, pelos ensinamentos e confiança.

À Embrapa Gado de Leite, pela oportunidade durante os 4 anos que estive nela.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório, principalmente ao Robert pela paciência comigo e ajuda em muitos momentos.

A todos os amigos que me apoiaram ou não, me dando conselhos, desconselhos e muita amizade; em especial a Camila e Lili amigas distantes, mas sempre presentes.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e o Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade;

E principalmente agradeço a Deus pela minha vida, pelas minhas conquistas e pelo meu futuro.

RESUMO

Em países de clima tropical, os prejuízos causados pelo carrapato *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* causam grande impacto nos sistemas de produção bovino. A identificação de regiões genômicas e marcadores de DNA associados à resistência ao parasita poderão ser utilizados como estratégia para seleção de animais mais resistentes. Já foram descritos sete QTL relacionados à resistência ao carrapato bovino, porém, os estudos iniciais geralmente detectam QTL com uma resolução baixa ou moderada, sendo necessário o posterior refinamento da região onde o mesmo foi detectado. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo refinar a posição dos QTL previamente identificados com a adição de marcadores microssatélites em uma população bovina F2 formada a partir do cruzamento entre animais Gir e Holandês. Amostras de sêmen e sangue foram submetidas à extração de DNA e posterior PCR com os marcadores microssatélites. Os produtos de PCR foram detectados utilizando o seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 e as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GridQTL. As análises realizadas nos cromossomos 2, 5, 10, 11, 21, 23 e 27 confirmaram a presença dos QTL encontrados anteriormente e reduziram significativamente os intervalos de confiança da maioria dos QTL. Os QTL encontrados no BTA 2 e 27 foram significativos a $P < 0.05$, aqueles localizados no BTA 5, 10, 11, 21 e 23 foram significativos a $P < 0.01$. O BTA 2 sofreu redução no intervalo de confiança de 12 cM passando de 22 para 10 cM, assim como o BTA 5 que passou de 20 para 8 cM. No BTA 10 foi confirmada a presença de dois picos de QTL com intervalo de confiança de 27cM anteriormente detectado em 47 cM. O BTA 11 passou a apresentar um intervalo de confiança de 19 cM e BTA 21 de 36 cM sofreu redução para 26 cM. O BTA 23 apresentou a menor redução no intervalo de confiança na estação de chuva passando de 17 para 14 cM e na seca manteve inalterado com I.C. de 12 cM, assim como o BTA 27 que sofreu redução de apenas 1 cM passando para 7 cM. A adição de marcadores e a redução no intervalo de confiança de QTL previamente encontrados é um importante passo para a identificação de genes relacionados à resistência ao carrapato.

Palavras-chave: BTA, Microssatélites, Resistência.

ABSTRACT

In tropical countries, losses caused by tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causes a great impact on cattle production systems. The identification of genomic regions and DNA markers associated to the parasite resistance may be used to select resistant animals. Seven QTL associated with tick resistance were described, however, the initial studies detect QTL with low or moderate resolution, being necessary the refinement of the regions where the QTL were detected. Thus, the aim of this work was refine the position of QTL previous identified with addition of microsatellite markers in Gir X Holstein F2 population. Semen and blood samples were submitted to DNA extraction and then, the PCR were done using microsatellite markers. The PCR products were detected using DNA automatic sequencer MegaBACE1000 and the statistical analysis was performed using GridQTL software. The analysis performed on chromosome 2, 5, 10, 11, 21, 23 and 27 confirmed the presence of QTL previously found and the confidence intervals were significantly reduced in most of QTL. The QTL found on the BTA 2 and 27 were significant at $P_c < 0.05$ and those located on BTA 5, 10, 11, 21 and 23 were significant at $P_c < 0.01$. The BTA 2 was reduced 12 cM in the C.I., from 22 to 10 cM, and BTA 5 from 20 to 8. In BTA 10 was confirmed the presence of two QTL peaks with C.I. 27 cM, previously detected in 47 cM. BTA 11 reduced C.I. to 19 cM and BTA 21 reduced from 36 cM to 26 cM. BTA 23 showed the smallest reduction in C.I. in the rainy season, from 17 to 14 cM and in dry season the C.I remained unchanged with 12 cM, as the BTA 27 that reduced only 1 cM reaching 7 cM. The addition of markers and the reduction in the confidence interval of QTL previously found is an important step to identify genes related to ticks resistance.

Keywords: BTA, Microsatellite, Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do carrapato bovino	18
Figura 2	Fotografia mostrando uma fêmea de carrapato ingurgitada (A) e o momento da ovoposição (B)	19
Figura 3	Representação gráfica obtida com o programa <i>Fragment Profiler</i> mostrando o padrão eletroforético do primer 2-8. Cada gráfico representa um animal heterozigoto, com seus respectivos alelos (163, 167) e (169, 171). O “bin set” foi ajustado para análise das populações F1 e F2 com a exclusão dos alelos ausente nos parentais, neste caso 145 ao 161 e 175, 177 e 179	49
Figura 4	Valores de F para o cromossomo 2 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico	57
Figura 5	Valores de F para o cromossomo 5 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico	60
Figura 6	Valores de F para o cromossomo 10 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento	

Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico

62

Figura 7

Valores de F para o cromossomo 11 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico

63

Figura 8

Valores de F para o cromossomo 21 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico

65

Figura 9

Valores de F para o cromossomo 23 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico

66

Figura 10

Valores de F para o cromossomo 27 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento

Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cromossomo, marcador, posição, heterozigosidade e número de alelos do mapa consenso MARC/USDA. Os marcadores em negritos foram os adicionados no mapeamento fino, aqueles que não estão em negrito foram utilizados em trabalhos anteriores.....	41
Tabela 2	Cromossomo, nome do marcador, fluoróforo utilizado para marcação do primer forward, concentração de primer, temperatura de anelamento (TA °C) e concentração de MgCl ₂ (mM) padronizados para os marcadores adicionados no mapeamento fino	44
Tabela 3	Cromossomo, marcador, número de alelos do mapa consenso MARC/USDA, número de alelos encontrados na população F2 da Embrapa Gado de Leite, posição dos marcadores em centimorgans (cM) no mapa MARC/USDA, posição dos marcadores em centimorgans (cM) na população F2 da Embrapa Gado de Leite e as falhas referentes a cada marcador	51
Tabela 4	Marcador, Heterozigosidade observada (H _o), heterozigosidade esperada (H _e) e conteúdo de informação polimórfico (PIC) na população F2	53
Tabela 5	Tamanho do mapa cromossômico após análises (Embrapa) comparados ao tamanho do mapa disponibilizado MARC/USDA	54
Tabela 6	Resultado do mapeamento fino na população F2 mostrando a estação em que o QTL foi detectado, o valor de F, posição onde foi detectado o QTL, intervalo de confiança (I.C.), efeito aditivo e dominante e a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL (%σ ²)	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QTL	“Quantitative trait loci” Locos de Característica Quantitativa
I.C.	Intervalo de Confiança
APC	“Antigen Presenting Cell” Célula Apresentadora de Antígeno
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IFN- γ	Interferon Gamma
MCP-1	“Monocyte Chemoattractant Protein” Proteína Químico Atraente de monócitos
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF- α	“Tumor Necrose Factor γ ” Fator de Necrose Tumoral α
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” Fator Estimulador de Macrófago
NK	“Natural Killer”
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism” Polimorfismo de Nucleotídeo único
PCR	“Polymerase Chain Reaction” Reação em Cadeia da Polimerase
cM	Centimorgam

DGAT1	“Diacylglycerol O-acyltransferase”
BTA	Bos taurus
MAS	“Marker Assisted Selection” Seleção Assistida por Marcadores
Ho	Heterozigosidade Observada
He	Heterozigosidade Esperada
PIC	“Polymorphism Information Content” Conteúdo de Informação Polimórfico
HSA	Homo sapiens
CXCR4	“C-X-C chemokine receptor type 4” Receptor de quimiocina 4
CXCL12	Quimiocina do tipo C-X-C 12
CD	Células Dendríticas
IL2R β	Receptor de Interleucina 2 subunidade β
CLEC7A	“C-type lectin domain family 7 member A”
FGF6	Fator de Crescimento de Fibroblasto
IL2R α	Receptor de Interleucina 2 subunidade α
IL2R γ	Receptor de Interleucina 2 subunidade γ
IL-15	Interleucina 15
IGF-1	“Insulin - like Growth factor 1”
MMU	Mus musculus
RasGRP1	“RAS guanyl-releasing protein 1”
IgE	Imunoglobulina Classe E
MHC	“Major Histocompatibility Complex” Complexo principal de Histocompatibilidade
BoLA	Complexo de Histocompatibilidade Bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	17
2.1.1 Ciclo de vida do <i>R. (B.) microplus</i>	18
2.1.2 Controle e problemas causados pela infestação de bovinos com carrapato <i>R.(B.) microplus</i>	20
2.1.3 Influência da raça bovina na resistência ao <i>R. (B.) microplus</i>	22
2.1.4 Resposta imune dos bovinos contra o carrapato	23
2.2 Marcadores moleculares	25
2.3 Mapeamento de QTL	27
2.4 Mapeamento Fino de QTL	29
2.5 Mapas genômicos	31
2.6 Estudo dos QTL	33
2.7 Seleção assistida por marcadores (MAS)	34
3 OBJETIVO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 População experimental	38
4.2 Avaliação do fenótipo	38
4.3 Extração de DNA	40
4.4 Saturação de QTL com marcadores microssatélites	40
4.5 Amplificação e precipitação do DNA	43
4.6 Análises Estatísticas	45
4.7 Construção dos mapas de ligação	46
4.8 Análises para detecção de QTL	46
4.9 Busca por genes na região do QTL	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Scoring dos Marcadores microssatélites	49
5.2 Estatística descritiva dos marcadores microssatélites	52
5.3 Mapa de ligação	54
5.4 Mapeamento Fino de QTL associados à resistência ao carrapato bovino	55

6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Os países em desenvolvimento, que representam cerca de 60% da população mundial, estão situados na faixa tropical do globo, e de modo geral, apresentam baixos índices de desempenho no setor agropecuário quando comparados aos países de clima temperado (HAMMOND, 1994). Nesses países, doenças e infestações por endo e ectoparasitas prejudicam a produção animal, além de acarretarem perdas econômicas com prevenção e tratamento. A incidência do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos fatores que causam grande impacto nos sistemas de produção de gado de leite, reduzindo a produção de leite, afetando características reprodutivas e deixando os animais mais susceptíveis a outras infecções.

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com um pouco mais de 205 milhões de cabeças de gado (IBGE, Censo Agropecuário 2010), além disso, é o sexto colocado na classificação de produção de leite, sendo responsável por 4,6% da produção mundial de leite, o que equivale a mais de 27 bilhões de litros de leite por ano (FAO- Food and Agriculture Organization, 2008). Contudo, quando a produtividade de cada país é avaliada, o Brasil cai para 21º apresentando uma produtividade de 1.236 Kg/vaca/ano (FAO- Food and Agriculture Organization, 2008).

As infestações por ectoparasitas são responsáveis em parte pela redução na produtividade brasileira. O Brasil deixa de produzir 28 milhões de arrobas carne/ano e 4,3 bilhões de litros de leite/ano, totalizando um prejuízo de 2,24 bilhões de reais (MARTINEZ et al., 2006). Além das perdas com a carne e o leite, as infestações por carrapatos aumentam os gastos dos produtores com os produtos químicos para combater o parasita e diminuem também a qualidade do couro que não pode ser comercializado como de primeira qualidade.

Com um mercado cada vez mais competitivo, os criadores buscam formas de amenizar perdas e aumentar sua produtividade. Nesse contexto, o melhoramento genético animal surge como uma ferramenta importante que pode auxiliar a produção de forma eficiente e barata. A identificação de regiões genômicas e de marcadores de DNA ligados a característica de interesse é uma boa estratégia para

selecionar animais que atendam a essas características dentre elas a resistência ao carrapato.

A grande maioria das características de interesse é governada por vários genes e influenciada pelo ambiente, tais características são denominadas de quantitativas sendo que vários locos nos cromossomos afetam essas características, tais locos são denominados Locos de Características Quantitativas (QTL).

O avanço da biologia molecular proporcionou a identificação de QTL relacionados a várias características de interesse. Com o objetivo de entender a natureza molecular das variações das características quantitativas, vários estudos foram realizados de forma bem sucedida para a localização de locos que afetam características economicamente importantes, muitas dessas características relatadas para gado de leite. Uma das alternativas para identificar esses locos é o mapeamento de QTL, contudo a maioria desses QTL é identificada inicialmente com uma baixa resolução, pois a distância entre os marcadores é relativamente grande, com um intervalo de confiança (I.C.) variando de 20 a 30 cM. Com um intervalo dessa magnitude fica inviável a localização de possíveis genes que afetem a característica. Caso se deseje chegar a possíveis genes candidatos é necessário reduzir o I.C. encontrado, sendo que este deve estar entre 1 e 2 cM, dessa forma, métodos de alta precisão são necessários para refinar a região onde foi detectado o QTL (OLSEN et al., 2004).

Estudos realizados por Machado et al., (2010), detectaram a presença de sete QTL em uma população experimental F2 proveniente do cruzamento Gir x Holandês. Contudo esses QTL foram detectados com uma resolução moderada, assim esse estudo tem por objetivo refinar o posicionamento dos QTL encontrados com a adição de novos marcadores que irão saturar as regiões previamente identificadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *R. (B) microplus*, conhecido popularmente no Brasil como carrapato de boi, é um parasita que necessita obrigatoriamente passar por uma fase de sua vida sobre um hospedeiro, geralmente bovino, ingerindo linfa, sangue e substratos teciduais. Pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, família Ixodidae, gênero *Rhipicephalus*. Anteriormente era conhecido somente por *Boophilus microplus*, mas em 2003 foi reclassificado após estudos morfológicos e moleculares que identificaram espécies dentro do gênero *Rhipicephalus* que eram mais semelhante às espécies do gênero *Boophilus* do que a outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Assim foi sugerido por Murrell & Barker (2003) a inclusão das espécies de *Boophilus* dentro do gênero *Rhipicephalus*, contudo, para a preservação do nome *Boophilus* este foi mantido como subgênero.

A espécie *R. (B) microplus* originou-se provavelmente na Ásia quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes já no período terciário (HOOGSTRAAL, 1985). Adaptaram-se perfeitamente ao clima dos países tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis a sua sobrevivência e manutenção da espécie (POWEL & REID, 1982).

O *R. (B) microplus* é o ectoparasita que causa mais danos aos rebanhos bovinos no Brasil. Ele possui uma ampla distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, estando presente na faixa entre os paralelos 32° N e 32° S. Estima-se que 80% do rebanho bovino do mundo estejam infestados por carrapato (BOWMAN, 2004), tal fato torna esse parasita o mais importante economicamente para a produção animal. As perdas econômicas causadas pelos carrapatos são estimadas em mais de 100 milhões de dólares anuais na Austrália e mais de um bilhão e meio de dólares por ano na América Central e América do Sul (SABATINI et al., 2001). Martinez et al. (2006) estimou em mais de 800 milhões de

dólares ao ano as perdas no Brasil, que incluem gastos no controle do parasita, perdas na produção de leite e carne e redução da natalidade.

2.1.1 Ciclo de vida do *R. (B.) microplus*

O *R. (B.) microplus* é um ectoparasita que utiliza apenas um hospedeiro que é normalmente bovino, contudo podem parasitar outros animais como ovelha, cavalo, cão e cabra em épocas de grande infestação nas pastagens (GONZALES, 1974).

O ciclo de vida do carrapato divide-se em uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária (FIGURA 1).

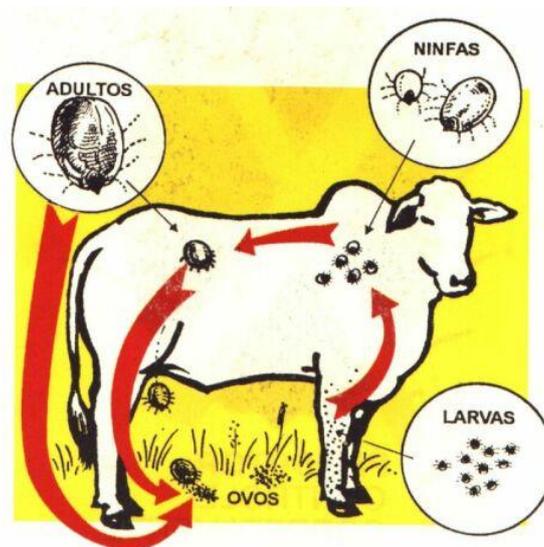


FIGURA 1: Ciclo de vida do carrapato bovino

A fase de vida livre inicia-se após a queda das fêmeas ingurgitadas denominadas “teleóginas” (FIGURA 2). As teleóginas ao desprender-se do seu hospedeiro caem no solo geralmente na primeira metade da manhã procurando se abrigar em locais com baixa incidência de luz para realizar sua ovoposição. O período que compreende a queda até o momento da postura é chamado pré-postura, que tem em média duração de dois a três dias em temperatura ideal (em torno de 27°C), podendo se estender a mais de 90 dias. A postura e eclosão ocorrem aproximadamente em 18 dias em condições de umidade ideal (em torno de

80%) e temperatura variando entre 27 e 28°C, podendo esse período durar até mais que 100 dias. A teleógina coloca cerca de 3000 a 4000 ovos, morrendo após a postura. Em condições ambientais favoráveis, uma semana após a postura as larvas começam a eclodir dos ovos; dependendo das condições essa eclosão pode durar até seis meses. As larvas recém eclodidas movem-se em direção às folhas mais altas para localização do hospedeiro por meio de vibração e odor (OLSEN, 1974). Nesse período as larvas se tornam infestantes. Na pastagem, as larvas apresentam geotropismo negativo e fototropismo positivo à intensidade moderada de luz. Em torno do 5º ao 7º dia após a eclosão, a larva mede 0,7 por 0,5 mm e apresenta uma cor avermelhada. Sua longevidade é altamente dependente das condições de temperatura e umidade, tendo sua capacidade infestante diminuída com o passar do tempo. Na vegetação as larvas se encontram agrupadas para diminuir a perda de umidade e evitar a incidência direta dos raios solares e com isso aumentam sua sobrevivência. Podem ficar até seis meses sem se alimentar esperando um hospedeiro adequado. Em condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/postura/eclosão tem duração de um mês (GONZALES, 1974). 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, não sofrendo alterações bruscas com as condições ambientais (GONZALES, 1975).

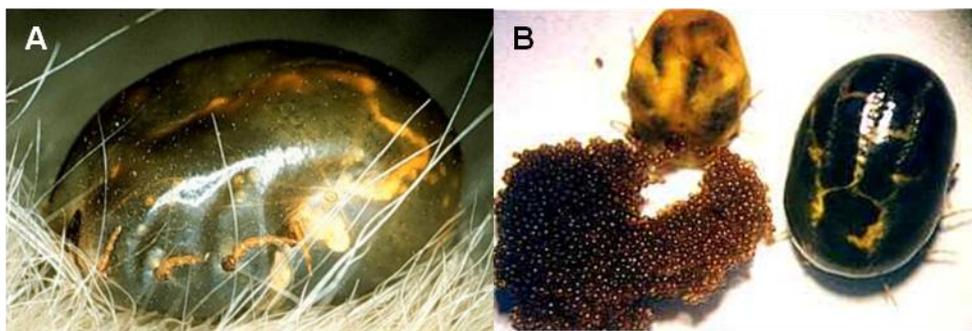


FIGURA 2: Fotografia mostrando uma fêmea de carrapato ingurgitada (A) e o momento da ovoposição (B).

A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infestante encontra e se instala em um hospedeiro passando a ser larva parasitária e transformando-se em metalarva que dá origem a ninfa por volta de 8 a 10 dias. Ao redor do 15º dia sofrerá

uma muda transformando-se em metaninfa, nessa fase já há diferenciação entre os sexos. A transformação da metaninfa em neandro (macho) necessita de 14 dias em média, passando a gonandro em dois dias, permanecendo no animal por mais de 38 dias. A transformação da metaninfa em neógina (fêmea) é feita em média de 17 dias, passando à partenógina em três dias e a teleógina em dois dias. A fêmea após o acasalamento começa a se alimentar de sangue até o seu ingurgitamento total que irá proporcionar a sua queda do hospedeiro. Os machos, por permanecerem mais tempo no animal, conseguem se acasalar com mais de uma fêmea. A fase parasitária dura em média 21 dias.

Os carrapatos não se distribuem de forma aleatória pelo corpo do animal, há regiões pelas quais eles demonstram maior afinidade, tais como pata traseira, regiões da virilha e úbere. Nos locais onde a fixação do carrapato é feita aparecem zonas de hiperemia e inflamação.

2.1.2 Controle e problemas causados pela infestação de bovinos com carrapato *R.(B.) microplus*

Atualmente as formas de controle do carrapato bovino são baseadas no gerenciamento de aplicações de compostos carrapaticidas, utilização de vacinas e a seleção de animais resistentes. Contudo, os dois primeiros métodos citados atuam no controle do parasita de forma paliativa e contribuem somente com a redução no número dos mesmos além de exigirem aplicações freqüentes e cuidados com manejo.

Os acaricidas foram os primeiros métodos desenvolvidos para o controle do carrapato, contudo nem sempre são eficientes, pois existem cepas de carrapatos resistentes. Além disso, outros fatores devem ser considerados quanto ao uso de acaricidas: custo do produto, trabalho para aplicação, equipamentos necessários, perdas na produção de carne e leite, efeitos para a saúde humana e meio ambiente (JONSSON, 1997).

Outro método usado no controle dos carrapatos é a aplicação de vacinas. A primeira vacina foi desenvolvida por Willadsen et al. (1995) e atua principalmente reduzindo a capacidade reprodutiva da fêmea. Sua atuação na redução da

infestação é gradual, não tendo efeito imediato no combate ao parasita, sendo necessário o uso conjugado de outras formas de combate. Assim como os acaricidas, as vacinas também apresentam limitações: alto custo, pois muitas devem ser aplicadas em períodos constantes além da resposta diferencial de cada animal, que podem responder mal a vacinação e contribuir favoravelmente para a próxima geração de carrapatos.

No Brasil, o principal método de controle dos carrapatos ainda é feito com o uso de acaricidas, contudo, o uso contínuo desses produtos propiciou o aparecimento de carrapatos resistentes, e dessa forma, mesmo com o desenvolvimento de novas substâncias com ação acaricida, novas cepas de carrapatos resistentes aparecerão, se transformando em um ciclo vicioso (MARTINEZ et al., 2004). Além disso, o uso de acaricidas deixa resíduos nos alimentos de origem animal, o que reafirma a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas para o controle do carrapato. A seleção de hospedeiros resistentes é uma solução promissora para o controle do carrapato, pois apresenta baixo custo e é uma solução mais duradoura.

Os problemas causados pelo carrapato variam dependendo da idade do animal, nível de infestação e se o parasita está atuando como vetor para outras enfermidades. Um bovino, portador de uma alta carga parasitária, pode apresentar desde uma leve a moderada anemia até a morte. Os carrapatos aumentam a taxa de morbidade e mortalidade durante o período de seca, onde as infestações tendem a serem maiores. Outra preocupação com os carrapatos é sua atuação como vetor de outras enfermidades sanguíneas, dentre elas a babesiose, anaplasiose e brucelose.

Um bovino infestado com carrapatos e parasitado por vermes, se não tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 Kg de peso/ano, podendo chegar a óbito devido a infestações com mais de 200 carrapatos durante um período de seis semanas (MARTINEZ et al., 2004). Furlong et al. (1996) verificaram uma queda de 23% na produção de leite em vacas mestiças Holandês-Zebu quando apresentavam uma média de 105 carrapato/vaca.

Diante dos problemas apresentados, torna-se justificável a busca de métodos economicamente viáveis e eficazes no controle do carrapato bovino que possam reduzir os gastos, os resíduos nos produtos consumidos e que não altere a produtividade do animal.

2.1.3 A influência da raça bovina na resistência ao *R. (B.) microplus*

O mecanismo de resistência dos bovinos ao carrapato é altamente complexo e vêm sendo amplamente estudado por vários grupos. Segundo Riek (1962), existem dois mecanismos envolvidos na resistência: a resistência inata e a adquirida. A resistência inata já se mostra presente no animal quando ocorre a primeira infestação e parece não depender do contato prévio do animal com o carrapato. O'Kelly e Spiers (1976), demonstraram que os bezerros mestiços zebu foram mais resistentes que o de raças européias em sua primeira exposição ao carrapato após o nascimento, o que demonstra a presença de uma imunidade inata. A resistência adquirida só começa a ser evidenciada após a exposição do animal a algumas infestações com o carrapato, Roberts (1968) e Wagland (1975) mostraram que o nível de resistência dos animais foi maior após várias infestações em comparação com o nível após a primeira infestação.

Fatores como sexo, idade, estresse nutricional, estação do ano, cor da pelagem, gestação, lactação afetam a resistência dos bovinos ao carrapato, mas o fator de maior importância é a raça.

Em geral, os animais *Bos indicus* são mais resistente a parasitas que os animais *Bos taurus*. Vários trabalhos relatam a maior resistência das raças indianas com relação às taurinas (VILLARES, 1941; GONZALES, 1975; UTECH et al., 1978; MADALENA et al., 1985; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA ET AL., 1989; OLIVEIRA E ALENCAR, 1990.). O gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato, tal fato possibilitou a eliminação de animais com menor resistência ao parasita e proporcionou maiores oportunidades para os animais resistentes se reproduzirem (THIESEN, 1979; LEMOS, 1986). Já o gado europeu mostra-se menos resistente ao carrapato, provavelmente devido ao pouco contato com o parasita (PENNA, 1990).

Segundo Gonzales (1975) muitos técnicos tentaram explicar a resistência dos zebuínos pelo fato destes possuírem um maior número de glândulas sebáceas distribuídas pela pele, o que produziria um odor que afastaria o carrapato, assim como maior mobilidade geral do animal e de sua pele, o que provavelmente faz com que o animal se defenda melhor da infestação. Veríssimo (1991) explicou que o sistema de alimentação da larva de *R. (B.) microplus* depende de uma reação

inflamatória que se inicia no momento de fixação da larva; os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que os taurinos o que possibilita uma auto-limpeza muito eficiente contribuindo para o equilíbrio carrapato/hospedeiro.

Com relação à época do ano, os bovinos apresentam-se mais sensíveis no outono do que no inverno (GOMES et al., 1989), estando relacionado com o foto período mais curto que afeta a resposta inflamatória no local da picada. O estado nutricional também influencia, diminuindo a resistência dos bovinos aos carrapatos (SUTHERST et al., 1983).

A coloração da pele e do pêlo pode influenciar no comportamento dos bovinos, fazendo com que os de pelagem mais escura procurem locais mais protegidos do sol que são também locais de preferência dos carrapatos, facilitando o acesso das larvas aos animais, enquanto que os de pelagem mais clara são menos infestados (OLIVEIRA & ALENCAR, 1987).

Embora a resistência ao carrapato seja bastante variável entre as diferentes raças, não existe uma raça totalmente resistente.

2.1.4 Resposta imune dos bovinos contra o carrapato

Os carrapatos possuem uma estratégia relativamente agressiva para obtenção de sangue, na qual causa injúrias na pele do hospedeiro que podem ser classificadas como lesão inflamatória edematosa. A obtenção de sangue pelo carrapato inicia-se com a fixação deste na pele do hospedeiro, na qual ele introduz suas peças bucais através da epiderme. Enquanto a pele do hospedeiro é cortada pelas quelíceras do carrapato, ele produz uma saliva com uma substância de componentes variados com aspecto pegajoso que denominamos cimento. O cimento é depositado ao longo da ruptura da epiderme, envolvendo o hipostômio do carrapato, formando um canal que leva a derme superior que é denominada de canal alimentar. Logo abaixo é formada a cavidade alimentar onde a saliva é inoculada e se difunde para os tecidos adjacentes. A saliva dos carrapatos contém substâncias anti-coagulantes, anti-plaquetárias e vasodiladoras, sendo responsáveis pela inibição da homeostase do hospedeiro e manutenção do fluxo sanguíneo no local da picada, e também contém fatores que modulam a resposta imune inata e

adquirida do hospedeiro (WIKEL, 1997). Mesmo com todas as propriedades da saliva do carrapato, ainda ocorre a formação de infiltrado celular na cavidade onde o carrapato lesionou.

A alimentação do carrapato induz variadas respostas imunes nos hospedeiros que envolvem apresentação de antígenos via células apresentadoras de antígenos (APCs), células-T, células-B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, eosinófilos e uma variedade grande de moléculas bio ativas (BROSSARD & WIKEL, 2004).

Os linfócitos são os elementos-chave nas funções efetoras e da regulação do sistema imune, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células (BROSSARD & WIKEL, 2004). A ativação de células T antígeno- específicas dispara vias de sinalização para produção de citocinas, diferenciação e proliferação celular (JANEWAY et al. 2002), podendo diferenciar-se em células Th1 e Th2 de acordo com as citocinas secretadas. Células Th1 secretam interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, interferon-gama (IFN- γ) e proteína quimio atracente de monócitos (MCP-1), enquanto células Th2 secretam, preferencialmente, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHER & MOSMANN, 1987; ELSE & FINKELMAN, 1998). Estas citocinas Th1 e Th2 atuam como sinais imuno regulatórios para geração de resposta imune mediada por células e anticorpos, respectivamente (WIKEL, 1997). Infestações repetidas com ninfa de *Ixodes ricinus* em camundongo BALB/c estimularam a migração dos linfócitos a partir dos linfonodos para o local da picada, produzindo significantes níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator estimulador de macrófago (GM-CSF) quando estimulado *in vitro* com concanavalina A ou com anticorpo anti-CD3 (GANAPAMO et al., 1997). Em bovinos e outros animais de laboratório, já foi mostrado que a reação de hipersensibilidade tardia mediada por células Th1 cutâneas no sítio de fixação do carrapato induziu imunidade adquirida contendo infiltrados de basófilos e eosinófilos (ALLEN, 1973; ALLEN et al, 1977; BROSSARD & FIVAZ, 1982). Vários estudos têm revelado que linfócitos T e citocinas fazem um papel crucial na determinação do resultado de infecções parasitárias em termos de imunidade protetora (FERREIRA & SILVA, 1999). Citocinas medeiam à diferenciação ou a ativação de linfócitos e outras células, montando assim, respostas imunes adaptativas e inatas.

Células natural killers (NK) são conhecidas pela sua citotoxicidade contra vírus e tumores (MORETTA, 2002; RAULET, VANCE E MCMAHON, 2001; ROSLTAD et

al., 2001), além disso, elas promovem uma conexão entre imunidade inata e adaptativa através da produção de citocinas e da interação com células apresentadoras de antígenos (MORETTA, 2002; BIRON e GAZZINELLI, 1995; FERLAZZO et al., 2002). Essas células estão envolvidas na resposta de defesa contra *Mycobacterium bovis* (BASTOS et al., 2008) e patógenos transmitidos pelo carrapato (GOFF et al., 2006), nas quais predomina o padrão Th1 de resposta imune. O papel das NK na resistência ao carrapato ainda não foi elucidado, mas sabe-se que a saliva do carrapato inibe a atividade dessas células (KUBES et al., 2002).

As células dendríticas também possuem papel fundamental na resposta contra o carrapato. Os antígenos secretados juntamente com a saliva durante a fixação e alimentação do parasita no hospedeiro são levados do sítio de alimentação do carrapato pelas células dendríticas que processam e apresentam esses antígenos para os linfócitos T, iniciando uma resposta imune celular ou mediada por anticorpos (ALLEN et al, 1979; LARREGINA & FALO, 2005).

2.2 Marcadores moleculares

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco dos geneticistas passou a ser o gene, como unidade fundamental da variação biológica. A maioria das características econômicas é determinada por vários genes que em conjunto com o meio ambiente determinam o fenótipo do indivíduo. A determinação do componente genotípico é de fundamental importância para a compreensão de vários comportamentos fenotípicos que podem ser estudados por meio de marcadores moleculares.

Marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso ou de um fragmento de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). De acordo com Martinez e Machado (2002), o marcador molecular de DNA é uma técnica que permite detectar diferenças na seqüência de DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento animal. Existe uma grande variedade de marcadores moleculares, cada qual com suas características e limitações. O uso de marcadores moleculares mostra

vantagens com relação aos marcadores morfológicos como: níveis de polimorfismo, em geral são co-dominantes e contém maior quantidade de informação genética por loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente os marcadores mais utilizados são os microssatélites e os Single Nucleotide Polymorphisms (SNP).

Os marcadores microssatélites são frequentemente empregados na identificação de regiões genômicas associadas a características de interesse econômico. Esse tipo de marcador corresponde a pequenas sequências de DNA que contém unidades que se repetem em tandem variando de 1 a 6 pb (TAUTZ, 1989), encontrados em organismos eucariotos e em alguns procariotos e eubactérias. Cada repetição em tandem constitui um loco de microssatélite cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do microssatélite. São marcadores de fácil detecção pela técnica de PCR, são co-dominantes, multi-alelicos, altamente polimórficos e com ampla distribuição pelo genoma. Tais características tornam os microssatélites um dos marcadores mais utilizados em estudos para identificação de QTL, teste de paternidade, estudos de genética de população e estudos de filogenia. Os marcadores microssatélites não identificam diretamente os genes de interesse, mas ajudam na sua localização, pois segregam juntamente com esses genes. Seguindo este princípio, foi possível a localização de uma série de genes de efeitos maiores, genes estes relacionados à produção ou a outra característica (LEE et al., 2002).

Os marcadores SNP tem como base as alterações elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de nucleotídeos. Normalmente os marcadores SNP são bi-alelicos, podem ocorrer em regiões codificadoras e em espaços intergênicos. Em humanos foi estimada a presença de um SNP a cada 1000 bases ou menos (WEINER e HUDSON, 2008). As novas tecnologias de estudo de SNP deram suporte para que esse marcador fosse utilizado em diversos estudos como: estudo de paternidade, identificação individual, detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção.

2.3 Mapeamento de QTL

O QTL (do inglês, Quantitative Trait Loci) pode ser definido como uma região do genoma que influencia uma característica fenotípica mensurável ou quantitativa (ABIOLA et al., 2003). As características quantitativas são influenciadas por inúmeros genes e também por condições ambientais.

O principal caminho para se testar a existência de um QTL é identificar marcadores que estejam segregando com características de interesse. A determinação da associação genética entre o loco marcador e o QTL, depende da existência do desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e os alelos do QTL. De acordo com Lynch & Walsh (1998), o princípio de identificação de QTL a partir de marcadores moleculares é de certa forma simples: por meio do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas é possível criar o desequilíbrio de ligação entre os locos que diferem entre as linhagens parentais, criando assim uma associação entre os locos marcadores e o QTL segregante.

Define-se desequilíbrio de ligação a associação não ao acaso entre diferentes locos. A detecção de ligação genética entre marcadores e QTL depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e do QTL, caso contrário os QTL não podem ser detectados. O desequilíbrio de ligação é muito usado em análises de varredura genômicas em animais domésticos na qual se tem por objetivo encontrar marcadores que se associem a características fenotípicas de interesse.

Dessa forma, é necessária a escolha de delineamentos que maximizem o desequilíbrio de ligação. Genitores fenotipicamente contrastantes para caracteres quantitativos de interesse, provavelmente apresentam essas variações nos locos que afetam esses caracteres (KEARSEY, 1998). Assim cruzamentos baseados nesse princípio podem maximizar o desequilíbrio de ligação entre QTL e os marcadores das populações de mapeamento, aumentando a probabilidade de detectá-los.

Para a identificação de QTL diversos delineamentos podem ser utilizados. Em animais, geralmente são utilizados delineamentos de cruzamentos entre animais não aparentados, uma vez que a endogamia pode levar ao aparecimento de genes em

homozigose que podem ser deletérios e letais. Entre os delineamentos utilizados em animais podemos citar o delineamento de filhas, delineamento de netas e F2.

Dentre os delineamentos endogâmicos, o delineamento F2 é o mais utilizado. Ele consiste na formação de uma população F1 a partir de cruzamentos entre duas linhagens distintas e posterior formação de uma população F2. O cruzamento entre linhagens distintas acarreta um desequilíbrio de ligação entre locos, sendo que o mesmo é a base para a detecção de QTL, criando assim uma associação entre os marcadores e os QTL ligados que estão segregando. Por esse tipo de delineamento é possível a separação dos efeitos aditivos e de dominância dos QTL encontrados.

O mapeamento de QTL demanda um número muito grande de animais com seus respectivos fenótipos de interesse. O número de animais necessário é dependente da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade da característica, do delineamento experimental escolhido, entre outros fatores. Esse requisito é em parte delimitante quando a população a ser estudada é bovina, já que possuem custos de produção e manutenção elevados, além de maior tempo necessário para se conseguir uma população próxima ao ideal.

O gado leiteiro possui vantagens no mapeamento de QTL em relação aos outros animais de produção devido ao fato de que nas fazendas há intensa anotação de dados referentes a avaliações fenotípicas tais como medidas de qualidade de leite, saúde do animal, avaliações morfométricas, informações do pedigree e forma de manejo. O mapeamento de QTL em animais é beneficiado pelo reduzido tamanho efetivo das populações, que leva à redução na complexidade das características em termos de heterogeneidade de alelos, aliada à maior extensão dos blocos de desequilíbrio de ligação, em comparação com outras espécies (GEORGES & ANDERSSON, 2003).

Segundo Rocha et al. (2002), a detecção de QTL requer três estágios fundamentais: coleta acurada de dados fenotípicos dentro da população desenvolvida; coleta acurada dos dados genotípicos (através dos marcadores moleculares) e análise estatísticas correlacionando dados de fenótipos com os dados de genótipos.

Apesar das dificuldades (formação de uma população experimental, gastos com manutenção, gastos com produção) encontradas no mapeamento de QTL para resistência à doenças em ruminantes várias características já tiveram parte de sua variação atribuída a regiões no genoma dos bovinos. Contudo a grande maioria dos

QTL encontrados está relacionada a características de produção de leite ou então de carne, poucos trabalhos relatam QTL relacionados à saúde animal.

2.4 Mapeamento Fino de QTL

Uma grande variedade de estudos vem sendo desenvolvidos com a finalidade de identificar QTL relacionados a características de interesse. Contudo, os estudos iniciais de mapeamento não possibilitaram uma identificação precisa da localização do QTL, em geral, essas estimativas foram feitas com baixa precisão e acurácia. Em bovinos, o intervalo de confiança de QTL encontrados é no máximo de dezenas de centimorgans (cM) (GEORGES, 2007). Essa resolução não é adequada para a clonagem posicional e identificação de genes candidatos. De acordo com Kappes et al. (1998) um QTL é inicialmente identificado em um intervalo de confiança de 20 a 30 cM, esse intervalo certamente contém uma grande quantidade de genes tornando a identificação de um gene específico praticamente impossível. Tal fato reforça a necessidade de estreitar o intervalo de confiança de um QTL encontrado possibilitando a identificação de possíveis genes candidatos dentro da região estudada.

O principal fator limitante para a resolução de um mapeamento em análise de ligação é a frequência de recombinação na progênie que foi genotipada. Em linhagens experimentais, a resolução do mapeamento pode ser melhorada através do aumento do número de recombinações usando famílias maiores ou gerações avançadas (DARVASI & SOLLER, 1995). Centenas de proles são requeridas para reduzir o intervalo de confiança a um nível que seja possível ser feita a clonagem posicional e a identificação de genes, e para isso esse intervalo deveria estar entre 5 cM ou menos (DARVASI, 1998). Uma outra alternativa para aumentar a resolução de um mapeamento, além de aumentar o número de recombinações, seria a adição de uma maior quantidade de marcadores moleculares que cobriria todo o cromossomo e toda a região onde o possível QTL fosse identificado.

Com os avanços na área molecular e estatística, foi possível a realização de mapeamento fino em diversos tipos de população utilizando uma grande variedade de metodologias de análise. Na área molecular, a identificação de Polimorfismos de

Nucleotídeo Simples (SNP) e o desenvolvimento de plataformas que permitem a genotipagem deles em alta escala proporcionaram um grande avanço, permitindo a análise em curto tempo de um grande número de animais. Na área da estatística o desenvolvimento de métodos como análise de desequilíbrio de ligação baseada na identidade por descendência (MEUWISSEN & GODDARD, 2000), métodos de mínimos quadrados baseados na regressão do fenótipo sobre o genótipo ou haplótipo (LONG & LANGLEY, 1999; GRAPES et al., 2004, 2006) e análise combinada de ligação e desequilíbrio de ligação (MEUWISSEN et al., 2002) possibilitaram estreitar o intervalo de confiança de um QTL. Meuwissen et al. (2002) utilizando análise combinada entre ligação e desequilíbrio de ligação, conseguiram mapear um QTL dentro de uma região menor que 1 cM para taxa de gêmeos em uma grande família de meio-irmão de gado norueguês. Sahana et al. (2006) usando análise combinada entre ligação e desequilíbrio de ligação, conseguiu reduzir para 2 cM o intervalo de um QTL associado a mastite. Utilizando a mesma metodologia de análise, Druet et al. (2008) realizou mapeamento fino para reduzir o intervalo de confiança de um QTL no cromossomo 3 afetando a fertilidade de fêmeas em gado de leite.

A utilização de desequilíbrio de ligação tem se tornado uma ferramenta de grande importância em experimentos de mapeamento fino, pois obteve uma grande quantidade de resultados positivos em projetos iniciais de mapeamento de genes relacionados a doenças que possuíam herança Mendeliana (SNELL et al., 1989; HASTBAKA et al., 1992; KEREM et al., 1993.). É crescente a utilização do DL entre os geneticistas e melhoristas para o mapeamento de características quantitativas (SLATKIN, 1999; MEUWISSEN & GODDARD, 2000; FARNIER et al., 2002.). O interesse pela utilização do DL nas análises estatísticas aumentou muito após a descoberta dos marcadores SNPs e com a diminuição dos custos para a realização das genotipagens, permitindo com isso a utilização de um grande número de marcadores.

Diversos trabalhos conseguiram por meio de mapeamento e mapeamento fino de QTL chegar ao posicionamento de genes de interesse. Riquet et al. (1999) por meio de mapeamento fino, conseguiram estreitar o intervalo de confiança de um QTL identificado no cromossomo 14 dos bovinos levando em consideração as recombinações históricas e a utilização de um pequeno grupo de animais selecionados para genotipagem. Posteriormente foi realizada a clonagem posicional,

identificação de mutação casual e caracterização do gene DGAT1 na extremidade centromérica do cromossomo 14 (GRISART et al., 2002; FARNIER et al., 2002; SPELMAN et al., 2002; GRISART et al., 2004). Olsen et al. (2005) estudaram no cromossomo 6 uma região onde um QTL havia sido identificado com um intervalo de confiança de 7.5 cM (OLSEN et al., 2004) relacionado com a produção de leite. Com saturação da região com marcadores SNPs e utilizando a metodologia combinada de ligação e desequilíbrio de ligação, diminuiu-se o intervalo de confiança para 420 kb. Dentro dessa região está o gene da osteopontina que está relacionado com características de produção de leite. A partir desse achado, vários outros trabalhos foram conduzidos buscando variações nesse gene candidato (SCHNABEL et al., 2005; LEONARD et al., 2005; KHATIB et al., 2007).

2.5 Mapas genômicos

O projeto genoma humano foi o ponto de partida para o desenvolvimento de técnicas e estratégias para o estudo do DNA, muitos avanços foram conseguidos nos estudos genéticos dos animais de interesse econômico mediante aplicações dessas novas tecnologias para melhor conhecer e manipular o genoma dessas espécies.

Inicia-se a partir de então a chamada era genômica, em que estratégias avançadas são utilizadas com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a estrutura e sobre o funcionamento de genomas inteiros (HOCQUETTE, 2005). A genômica pode ser dividida em genômica estrutural e genômica funcional. A primeira tem por objetivo a caracterização física do genoma, ou seja, a caracterização do DNA por meio de localização e identificação dos genes/marcadores; a segunda estuda a expressão dos genes, o funcionamento do genoma.

Em animais de interesse econômico, a genômica estrutural vem permitindo avanços na localização dos genes por meio do mapeamento genômico. O mapeamento genômico é definido como a indicação de um gene em um loco no cromossomo e o posicionamento desse gene em relação aos outros genes encontrados no mesmo cromossomo (WOMACK, 2005).

Os mapas genômicos usados atualmente são: mapas genéticos ou de ligação, mapas físicos e mapas moleculares (RUVINSKY & GRAVES, 2005). Diferentes mapas vêm sendo desenvolvidos para estudo do genoma de animais de interesse econômico a partir de estratégias utilizadas no mapeamento do genoma humano. Essas estratégias podem definir desde a indicação de um gene em um cromossomo, até sua seqüência completa de bases.

Os mapas comparativos proporcionaram um grande avanço para os estudos entre diferentes espécies. Com os avanços nas tecnologias moleculares e nas ferramentas computacionais estes mapas estão cada vez mais saturados de informações, e com cada novo gene descoberto, novas análises e abordagens podem ser realizadas. Como a maior parte dos avanços na parte científica é realizada em camundongos e humanos, é possível aproveitar esses conhecimentos e expandi-los para outras espécies.

Cada mapa genômico possui suas características, vantagens e desvantagens, dessa forma, a construção de diferentes mapas e a integração entre eles vão permitir um conhecimento mais aprofundado sobre os genes, sua localização e seu funcionamento (RUVINSKY & GRAVES, 2005). A localização e o funcionamento dos genes representam o ponto chave para o estudo de características de interesse econômico e para a manipulação de genes que possibilitem o alcance do fenótipo desejado.

Os marcadores moleculares de DNA são extremamente importantes para a construção de mapas de ligação, sendo ordenados em vários mapas de genes. Os mapas de ligação genética são uma ferramenta essencial para as análises de ligação de características monogênicas e complexas. O mapa de ligação é uma representação, de certa forma, resumida dos cromossomos que mostram a posição relativa dos marcadores considerando a recombinação.

Os primeiros mapas genético de bovinos foram construídos com um número pequeno de marcadores o que não possibilitou uma cobertura completa do genoma (BARENDSE et al., 1994; BISHOP et al., 1994; GEORGES et al., 1995). Barendse et al. (2007) e Kappes et al. (2007) descreveram a segunda geração do mapa bovino, esse mapa era composto por 1.425 marcadores com uma cobertura quase completa do genoma. Em 2004, um novo mapa foi divulgado, esse mapa era composto por 3.960 marcadores com intervalo de 1.4 cM entre os marcadores, cobrindo 3.160 cM dos 29 cromossomos autossômicos mais o cromossomo X (IHARA et al., 2004).

Os mapas de ligação foram de fundamental importância para se chegar a muitos QTL já descritos, porém em alguns casos ele não é suficiente para se chegar a um gene ou a clonagem posicional deste. Uma alternativa que pode ser utilizada para somar aos estudos de QTL com marcadores é o uso dos mapas de radiação híbrida (RH). A estratégia de RH implica na quebra artificial dos cromossomos das células doadoras por radiação e transferência dos fragmentos resultantes para células de outra espécie que por sua vez, se integram aos seus cromossomos, como resultado, há a formação de híbridos que contém segmentos de DNA das células doadoras com um tamanho adequado para o mapeamento. Essa técnica é uma ferramenta útil para o mapeamento físico dos genomas, pois fornece um método direto para localizar genes e sequências de DNA ao longo dos cromossomos, dessa forma, o RH pode ser um poderoso caminho para aumentar a resolução dos mapas e integrar mapas de diferentes origens (CHOWDHARY & RAUDSEPP, 2005). Muitos painéis genômicos de bovinos tem se estruturado utilizando RH (WOMACK *et al.*, 1997; REXROAD *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2002; ITOH *et al.* 2005; ZIMIN *et al.*, 2009), e este tem sido usado para a construção de mapas de RH de diferentes resoluções para diversas propostas.

Os QTL são inicialmente mapeados em intervalos que contém uma grande quantidade de genes, e uma grande dificuldade é a de determinar quais genes estão causando o efeito do QTL. Dessa forma, na maioria das vezes não fica claro qual gene candidato considerar ou quais genes podem ser definidos como candidatos. A possibilidade de integração de diferentes mapas é uma poderosa ferramenta para estudo comparativo entre espécies, sendo dessa forma uma grande aliada na identificação desses possíveis genes que estariam afetando as características de interesse.

2.6 Estudo dos QTL

O mapeamento de genes em animais domésticos reflete o grande interesse no melhoramento sendo o principal foco de mapeamento características quantitativas de interesse econômico. Características monogênicas possuem um papel menos significativo, pois desordens genéticas simples foram praticamente

eliminadas da população por meio de cruzamentos seletivos (ANDERSSON et al., 2001). Um grande número de QTL afetando os fenótipos tem sido identificado em espécies bovinas há algumas décadas. No site de domínio público <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>, dados disponibilizados em maio de 2011, um total de 4.756 QTL foram identificados nos 29 cromossomos bovinos mais o cromossomo X. Estes QTL estão relacionados com características físicas, saúde, comportamento, carne, leite, produção e reprodução. Inicialmente a maioria dos grupos de pesquisa focou os estudos somente em características que afetavam a produção de leite (GEORGES et al., 1995), dessa forma muitos QTL foram identificados para essas características. Aos poucos os estudos relacionados à saúde animal e reprodução foram sendo incluídos na detecção de QTL, pois essas características afetam a produtividade do animal.

No cromossomo (BTA) 2 dos bovinos foram detectados 271 QTL para diversas características, sendo uma delas descrita para resistência ao carrapato (MACHADO et al., 2010). O BTA 5 possui um total de 253 QTL, sendo dois desses QTL relacionados a resistência ao carrapato (GASPARIN et al., 2007; MACHADO et al., 2010.). O BTA 10, 11, 21, 23 e 23 possui respectivamente 122, 183, 95, 123 e 69 QTL que abrangem diversas características, em todos os cromossomos foram identificados QTL para resistência ao carrapato bovino, sendo que no BTA 23 dois QTL para esta características foram identificados (MACHADO et al., 2010).

Outros cromossomos bovinos também apresentam QTL relacionados à resistência ao carrapato bovino são eles: BTA 3 (PORTO NETO et al., 2010), BTA 7, BTA 14 (GASPARIN et al., 2007)

2.7 Seleção assistida por marcadores (MAS)

Nos programas de melhoramento convencional, a seleção dos animais que apresentam características desejadas é feito com base somente nas informações fenotípicas dos indivíduos. A seleção fenotípica vem sendo aplicada há muito tempo, apresentando resultados significativos, contudo, nas avaliações fenotípicas, principalmente para caracteres de baixa herdabilidade, são necessárias técnicas

mais elaboradas de experimentação para se ter uma boa aproximação entre fenótipo e genótipo.

Com o advento dos marcadores moleculares em meados da década de 80 um novo caminho foi aberto para auxiliar os melhoristas na seleção dos genótipos desejáveis. Os marcadores moleculares apresentam vantagens para a seleção como não sofrerem influência ambiental e possuírem herança mendeliana. Essas características aumentam a eficiência nos processos de seleção e melhoramento genético.

A MAS é uma alternativa eficiente para obtenção de animais que possuam características desejáveis, além disso, possui caráter permanente. A MAS vem despontando como uma ferramenta a ser utilizada na seleção de características de interesse econômico e muitas empresas de melhoramento animal estão implementando a MAS em programas de melhoramento de rebanhos (GEORGES, 2001).

A informação direta do DNA pode ajudar a fixar um alelo específico de um gene de grande efeito. Pode também ser usada para auxiliar a seleção de características quantitativas, incluindo aquelas que podem ser selecionadas por meio tradicional. A informação molecular pode aumentar a acurácia da seleção, dessa forma, a identificação de genes influenciando características economicamente importantes seguidas pela MAS, pode ser empregada conjuntamente com métodos tradicionais de seleção acelerando o ganho genético dessas características (PLASTOW, 2000). Em geral, a MAS é benéfica para características de baixa herdabilidade, limitadas pelo sexo ou de difícil mensuração fenotípica (MARTINEZ, 2000).

Martinez et al. (2000) citam vantagens que a MAS proporciona para os melhoristas, dentre elas a seleção de touros jovens para marcadores específicos logo após o nascimento. A seleção pode ser feita bem cedo na vida do indivíduo, reduzindo o intervalo entre gerações, podem incluir todos os indivíduos, mesmo aqueles que ainda irão nascer, por meio de análise do genótipo do embrião, e dessa forma, aumentar a intensidade de seleção (MACHADO et al., 2001).

A MAS é uma ferramenta que pode auxiliar os programas de melhoramento que buscam características de produção, bem como controle de doenças e parasitas como o carrapato. O desenvolvimento de doenças compromete a expressão de caracteres relacionados com a produção, assim a seleção para a resistência irá

influenciar na seleção para produção. A seleção para resistência a doenças pode ser realizada com marcadores moleculares, evitando expor o animal à doença e possibilitando uma seleção eficiente para as características de produção (SOLLER & ANDERSSON, 1998).

A identificação de regiões genômicas associadas à resistência ao carrapato irá possibilitar melhor eficiência para as características de interesse ao melhoramento. A utilização da MAS para resistência ao carrapato bovino poderá possibilitar um menor uso de produtos químicos para controle do parasita, menor contaminação do leite e carne, menor dano ao meio ambiente e maior produção dos animais. Mas para a utilização comercial da MAS é preciso que as regiões genômicas que estejam associadas a resistência ao carrapato sejam identificadas e caracterizadas.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Reduzir o intervalo de confiança de QTL relacionados à resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* previamente identificados em uma população F2 proveniente do cruzamento Gyr x Holandês,

Objetivos Específicos

- Saturar regiões dos QTL identificados na população F2 com a genotipagem de marcadores microssatélites adicionais;
- Realizar novas análises de associação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População experimental

Os animais experimentais foram obtidos a partir do cruzamento de bovinos da raça Holandesa e Gir, seguindo o delineamento experimental F2. Toda a população F2 foi desenvolvida no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado em Santa Mônica, Valença, Rio de Janeiro entre os anos de 1999 e 2006. A população parental era formada por 27 fêmeas Gir (submetidas à superovulação) e quatro touros da raça holandesa. Os animais F1 foram então produzidos por meio de inseminação artificial das fêmeas Gir utilizando o sêmen dos touros holandeses. Os embriões gerados foram transferidos para fêmeas receptoras diminuindo o tempo gasto para formar a população. Um total de 150 animais F1 foram produzidos e dentre eles cinco machos foram selecionados, com base no vigor, para serem os progenitores da população F2. Esses machos foram acasalados com setenta e sete fêmeas F1, constituindo cinco famílias evitando o parentesco entre o macho e a fêmea a ele designada. Cada família produziu, por meio de superovulação e transferência de embrião, cerca de 80 animais, totalizando 400 animais F2. Com o descarte de alguns animais da população F2, a população experimental deste trabalho totaliza 480 animais, incluindo parentais, F1 e F2.

4.2 Avaliação do fenótipo

Para estimar a resistência do animal ao carrapato, foi utilizada a avaliação absoluta realizada através da contagem das fêmeas de carrapato que completam seu ciclo após infestação artificial com um número conhecido de larvas. A infestação artificial foi realizada com 10000 larvas para cada animal sendo a contagem realizada no dia modal da queda dos carrapatos que corresponde ao 21° dia.

As larvas foram preparadas pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, incubando-se meio grama de ovos por frasco (o equivalente a 5.000 larvas). Dois frascos contendo as larvas foram inseridos em um colar que se adapta a região cervical do animal de modo que as larvas atingissem ambos os lados do animal. O colar permanecia preso ao animal por cerca de 2 horas, tempo no qual todas as larvas já haviam se deslocado.

Cada animal F2 foi infestado artificialmente nas estações de seca e chuva e dessa forma todos foram avaliados duas vezes durante o experimento. A avaliação nas duas estações é importante para averiguar a presença de variações na resposta do animal contra o parasita em ambas as estações. A estação de seca ocorre de abril a setembro, com temperaturas variando de 13°C a 26°C e média de precipitação mensal de 15 mm. A estação chuvosa ocorre entre os meses de outubro a março apresentando temperatura mínima de 18°C e máxima de 30°C, a precipitação média nessa estação é de 147 mm mensal. A avaliação dos fenótipos de todos os animais foi realizada entre 2001 e 2007.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, com idade entre 13 e 15 meses, com número de animais variando de 20 a 30 por grupo. Os animais foram mantidos em piquete desde o momento da infestação até a contagem das fêmeas ingurgitadas que ocorria no 21º dia após a infestação. As fêmeas semi-ingurgitadas foram contadas em um dos lados do animal e esse valor foi multiplicado por dois para se obter um número estimado por animal. A contagem dos carrapatos foi feita na parte da manhã, aproximadamente até as nove horas, horário no qual a maioria dos carrapatos se desprende do animal.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo manejo durante todo o período de avaliação. É importante também relatarmos que a primeira infestação artificial do animal não foi o primeiro contato deste com o carrapato, visto que esse parasita está naturalmente presente nas pastagens do campo experimental.

Características adicionais que poderiam afetar a resistência do animal ao carrapato também foram avaliadas: cor da pelagem, espessura da capa, comprimento da capa e densidade de pelos. A cor da pelagem foi determinada por avaliação visual onde 1 correspondia aos animais totalmente claros, 2 aqueles com predominância clara, 3 com predominância escura e 4 aqueles totalmente escuros. A espessura da capa e o comprimento da capa foram medidos com paquímetro Mitutoyo com precisão de 0,05 em três locais aleatórios do corpo do animal. A

densidade dos pelos foi mensurada através da remoção de amostras de pelo de uma determinada área e posterior contagem do número de pelos naquela área.

4.3 Extração de DNA

Amostras de sangue de toda a população (Parentais, F1 e F2) foram coletadas em tubo vacutainer contendo anticoagulante (EDTA). No caso dos touros holandeses, quatro paletas de sêmen de cada animal foram importadas dos Estados Unidos.

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos utilizando o protocolo Harllerman et al. (1988) com modificações. Os leucócitos foram separados do sangue e transferidos para tubos de 2 mL, essas amostras foram lavadas com tampão de lise até obtenção de um pellet claro, posteriormente foi tratado com protinase K e em seguida as proteínas foram removidas por meio de extração fenol/clorofórmio. O DNA foi solubilizado em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e congelado até o uso. Para extração de DNA de sêmen, um protocolo similar foi utilizando omitindo-se apenas o passo de lise dos leucócitos. A qualidade e a concentração do DNA foi medida por meio do espectrofotometro GeneQuant pro (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom).

4.4 Saturação de QTL com marcadores microssatélites

Sessenta e quatro marcadores microssatélites foram usados para cobrir os cromossomos 2, 5, 10, 11, 21, 23 e 27. Desse total, 39 foram utilizados no trabalho de Machado et al. (2010) e 25 novos marcadores foram adicionados para a realização do mapeamento fino. Dessa forma os cromossomos 2, 5, 10, 11, 21, 23 e 27 foram avaliados com 10, 13, 10, 9, 8, 8 e 6 marcadores respectivamente.

Os marcadores foram selecionados no mapa de ligação bovino disponibilizados pelo MARC/ARS/USDA (Meat Animal Research Center/United States Departamento of Agriculture) no endereço eletrônico

<http://www.marc.usda.gov/genome.html>. A escolha dos marcadores foi feita levando em consideração a posição do marcador no mapa, número de alelos e heterozigosidade (TABELA 1).

TABELA 1: Cromossomo, marcador, posição, heterozigosidade e número de alelos do mapa consenso MARC/USDA.

Cromossomo	Marcador	Posição	Heterozigosidade	N° Alelos
2	TGLA44	4	83	16
2	MNB-83	29	39	4
2	BM3010	38.90	58	6
2	BMS1300	50.59	58	7
2	BM4440	60	67	11
2	DIK4972	69.71	60	8
2	TGLA226	86	52	12
2	MB106	95.57	67	7
2	BMS2519	110	54	12
2	IDVGA-2	126	73	12
5	BM6026	6	44	10
5	BP1	17	63	16
5	BM321	38	65	7
5	BMS1617	56	65	11
5	BMS490	66	66	8
5	CSSM022	74.2	69	16
5	RM029	81.91	70	5
5	BMS1248	91	58	19
5	DIK4329	95.54	90	9
5	ILSTS034	103	76	12
5	DIK5238	110.96	58	10
5	ETH152	122	62	6
5	MNB-71	133.08	73	11

TABELA 1: Continuação

Cromossomo	Marcador	Posição	Hetrozigosidade	N° Alelos
10	DIK5169	0	72	8
10	BM1237	25	69	9
10	BL1035	32	54	11
10	DIK4970	39.49	70	10
10	BM875	54	58	7
10	DIK2245	60.36	73	10
10	DIK1049	70.57	51	8
10	INRA037	79	63	16
10	BMS2641	87.46	62	4
10	BMS2614	109	67	10
11	BMS424B	15	69	9
11	MNB-70	24.61	59	9
11	INRA177	35	73	9
11	BM7169	50	75	17
11	ILSTS036	61.57	77	9
11	RM150	70	60	14
11	BMS1048	81.06	60	9
11	BL1103	98	56	13
11	BMS655	117	52	7
21	DIK4593	1	42,0	5
21	DIK2272	14	49,0	5
21	DIK4001	30	65,0	11
21	MNB-88	45	33,0	6
21	DIK2913	57.06	82	9
21	AFZ1	68	69,0	8
21	BMS743	75.31	71	18
21	DIK3023	84	71,0	8

TABELA 1: Continuação

Cromossomo	Marcador	Posição	Hetrozigosidade	N° Alelos
23	NLBCM15	0	59	7
23	BM1815	24,2	67	8
23	DIK2950	30.78	53	6
23	CYP21	42,4	78	11
23	RM185	52.29	69	8
23	BM1818	58,2	79	8
23	CSSM024	65.71	75	13
23	BM1905	71,6	58	11
27	BM3507	0	87	17
27	TGLA179	5.38	52	7
27	BMS2650	12.28	83	12
27	BMS2137	21	62	6
27	CSSM036	43	67	9
27	INRA027	58	63	6

Marcador = adicionados no mapeamento fino, **Marcador** = utilizados em trabalhos anteriores.

4.5 Amplificação e precipitação do DNA

Para cada marcador foram testadas concentrações de $MgCl_2$ de 1.5, 2.0 e 2.5mM e as temperaturas de anelamento (TA) de 48, 50, 52, 54, 56 e 58°C, a fim de otimizar o seu funcionamento (TABELA 2). As Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) contiam 3 μ L de DNA genômico a 15ng/ μ L, tampão de PCR (1.5mM de $MgCl_2$, 20mM Tris pH8.3, 50mM KCl), 0.2mM de dNTPs e 0.1 ou 0.2 de primer, totalizando um volume final de 10 μ L. Os primers *forward* foram marcados com os fluoróforos FAM, HEX e TAMRA. As amplificações apresentavam às seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94°C – 0:30 minutos, TA acrescida de 10°C por 0:30 minutos com decréscimo de 1 °C a cada ciclo e 72°C -

0:30 minutos; 20 ciclos de 94°C – 0:30 minutos, TA por 0:30 minutos e 72°C – 0:30 minutos; etapa final de extensão de 72°C por 45 minutos.

TABELA 2: Cromossomo, nome do marcador, fluoróforo utilizado para marcação do primer forward, concentração de primer, temperatura de anelamento (TA °C) e concentração de MgCl₂ (mM) padronizados para os marcadores adicionados no mapeamento fino.

Cromossomo	Marcador	Fluoróforo	[Primer]	TA (°C)	MgCl₂(mM)
2	BM3010	HEX	0,1	56	1,5
2	BMS1300	FAM	0,1	48	1,5
2	DIK4972	FAM	0,1	50	1,5
2	MB106	FAM	0,1	52	1,5
5	CSSMO22	TAMRA	0,1	52	1,5
5	RM029	HEX	0,1	52	1,5
5	DIK4329	HEX	0,1	50	1,5
5	DIK5238	TAMRA	0,1	50	1,5
5	MNB-71	HEX	0,1	54	1,5
10	DIK5169	FAM	0,2	52	1,5
10	DIK4970	TAMRA	0,1	50	1,5
10	DIK2245	TAMRA	0,1	54	1,5
10	DIK1049	HEX	0,1	48	1,5
10	BMS2641	HEX	0,1	52	1,5
11	MNB-70	FAM	0,1	50	1,5
11	ILSTS036	FAM	0,1	50	1,5
11	BMS1048	FAM	0,1	54	1,5
21	DIK2913	FAM	0,1	50	1,5
21	BMS743	TAMRA	0,1	56	1,5
23	NLBCMK15	HEX	0,1	48	1,5
23	CSSM024	HEX	0,1	58	1,5
23	RM185	FAM	0,2	54	1,5
23	DIK2950	FAM	0,1	58	1,5
27	TGLA179	FAM	0,2	56	2,5
27	BMS2650	FAM	0,1	56	1,5

As reações de PCR foram precipitadas com 3 μL de acetato de amônio 2,5M e 30 μL álcool etílico 96% e centrifugadas por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 30 μL de álcool etílico 70% e realizada 2 centrifugações de 1 minuto cada, sendo a segunda para retirada do álcool. O DNA foi ressuspensionado em 20 μL de água e congelado até o uso.

Multiplex foram montados com os marcadores microssatélites para detecção de acordo com o tamanho dos alelos e fluorescência de cada marcador. Os produtos das amplificações foram detectados por meio de eletroforese capilar utilizando o equipamento MegaBace 1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Os genótipos foram analisados no programa Fragment Profiler (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) e os dados exportados para uma planilha Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

4.6 Análises Estatísticas

As informações de frequência alélica, heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram calculados utilizando o programa Cervus 2.0 (MARSHALL et al., 1998), que utiliza as seguintes equações:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

$$p_i = K_i / N$$

Em que: K_i é o número de observações do alelo i ($i = 1, \dots, m$)

N é o número total de informações

p_i e p_j são as informações da frequência dos alelos

4.7 Construção dos mapas de ligação

Os mapas de ligação dos cromossomos em estudo foram gerados utilizando o programa Crimap (GREEN et al., 1990), para isso foi montado um arquivo com dados de genealogia e genótipo para toda a população. O programa Crimap determina a ordem dos marcadores e a distância entre eles utilizando os genótipos disponibilizados. A ordem dos marcadores é determinada levando em consideração os maiores valores de Log_{10} da máxima verossimilhança (LOD – Logarithm of the likelihood of the odds). Os mapas de ligação foram construídos pelo método de máxima verossimilhança utilizando a função de Kosambi, essa função transforma as taxas de recombinação em distância de mapa em centiMorgans (cM). O mapa consenso disponibilizado por MARC/USDA serviu de base para todas as comparações realizadas no presente trabalho, esse mapa foi gerado a partir de diversos trabalhos com diferentes raças: Angus, Australian Friesian, Boran, Brahman, Brangus, Charolês, Gelbvieh, Gir, Hereford, Holandês, InduBrasil, Nelore, N'Dama, Normando, Piemontese, Sahiwal e Simental (BISHOP et al., 1994; BARENDSE et al., 1997).

4.8 Análises para detecção de QTL

As análises para identificação de QTL foram realizadas por mapeamento de intervalos em população F2 utilizando o software GridQTL (<http://www.gridqtl.org.uk>). As análises primárias consistiam na determinação das probabilidades de Identidade-De-Por-Descendência (IBD) para localização das regiões cromossômicas referentes aos dados de marcadores múltiplos e, posteriormente, adequou-se o modelo estatístico às observações e aos coeficientes de IBD (SEATON et al., 2006). A segunda etapa de análise consistiu na análise de regressão dos dados fenotípicos e os coeficientes previamente calculados. Essa análise permitiu adicionar variáveis como efeitos fixos e covariáveis. No trabalho foram usados como efeitos fixos grupo_ano e cor de pelagem na estação de seca e grupo_ano na estação de chuva. Como covariável a espessura da capa foi usada nas estações de chuva e seca.

Os modelos aditivo e aditivo e dominante foram utilizados nas análises do GridQTL seguindo as fórmulas para os dois modelos respectivamente:

$$y_{ijk} = G_i + C_j + b(C_{ijk} - \bar{C}) + c_a a + e_{ijk}$$

$$y_{ijk} = G_i + C_j + b(C_{ijk} - \bar{C}) + c_a a + c_d d + e_{ijk}$$

Sendo,

Y_{ijk} = Valor observado – fenótipo

G_i = efeito fixo grupo_ano

C_j = efeito fixo cor da pelagem j , $j = 1, 2, 3, 4$; (somente na estação de seca)

$b(C_{ijk} - \bar{C})$ = ajuste para a covariável – espessura da capa

Os valores de c_a e c_d são funções das probabilidades condicionais do QTL dado o genótipo dos *locus* e são calculados da seguinte forma:

$$c_a = P(QQ) - P(qq) \quad \text{e} \quad c_d = P(Qq)$$

Em que:

$P(QQ)$ = probabilidade de homozigotos para os genótipos do QTL provenientes dos animais da raça holandesa, dado o marcador ($M_i M_i$; $M_j M_j$);

$P(qq)$ = probabilidade de homozigotos para os genótipos do QTL provenientes da raça Gir, dado o marcador ($M_i M_i$; $M_j M_j$);

$P(Qq)$ = probabilidade de heterozigose para os genótipos do QTL, dado o marcador ($M_i M_i$; $M_j M_j$).

Os limiares de significância a nível cromossômico de 1% e 5% foram calculados pelo programa GridQTL baseados em 10.000 permutações (CHURCHILL e DOERGE, 1994). O intervalo de confiança foi obtido através da aproximação de Qui-Quadrado (X^2) conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000).

A proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL foi calculada conforme descrito por Kim et al. (2003):

$$\sigma^2 = 100 \times [(SQH_o - SQH_a)]^2 / SQH_o$$

Em que:

SQH_o = soma de quadrados obtida no modelo reduzido, ou seja, na ausência de QTL

SQH_a = soma de quadrados obtida do modelo completo, ou seja, na presença do QTL

O nível de significância a nível genômico (1% e 5%) foi calculado seguindo a correção de Bonferroni de acordo com a equação:

$$P_{\text{cromossomo}} = 1 - (1 - P_{\text{genoma}})^r$$

Onde r representa a contribuição relativa do cromossomo.

4.9 Busca por genes na região do QTL

A localização de genes nas regiões onde os QTL foram identificados foi realizada por meio de busca nos sites <http://www.ensembl.org/index.html> e <http://genomes.arc.georgetown.edu/drupal/bovine/>, também foi visitado o site <http://www.genome.iastate.edu/cgi-bin/QTLdb/BT/index> para localização dos QTL que anteriormente foram depositados nesses bancos de dados. Somente os genes que possivelmente tivessem maior efeito sobre a resistência ao carrapato foram selecionados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Scoring dos Marcadores microssatélites

O scoring dos alelos dos marcadores microssatélites foi inicialmente feito para a população parental, onde foram identificados todos os alelos existentes na população. Aqueles alelos não encontrados na população parental foram eliminados para facilitar o scoring gerando um “bin set” ajustado que posteriormente foi exportado para análises da população F1 e F2. O “bin set” ajustado é de grande importância para manter um padrão de detecção dos alelos entre as placas de PCR analisadas, dessa forma as análises se tornam mais precisas por diminuir a chance de erros (FIGURA 3).

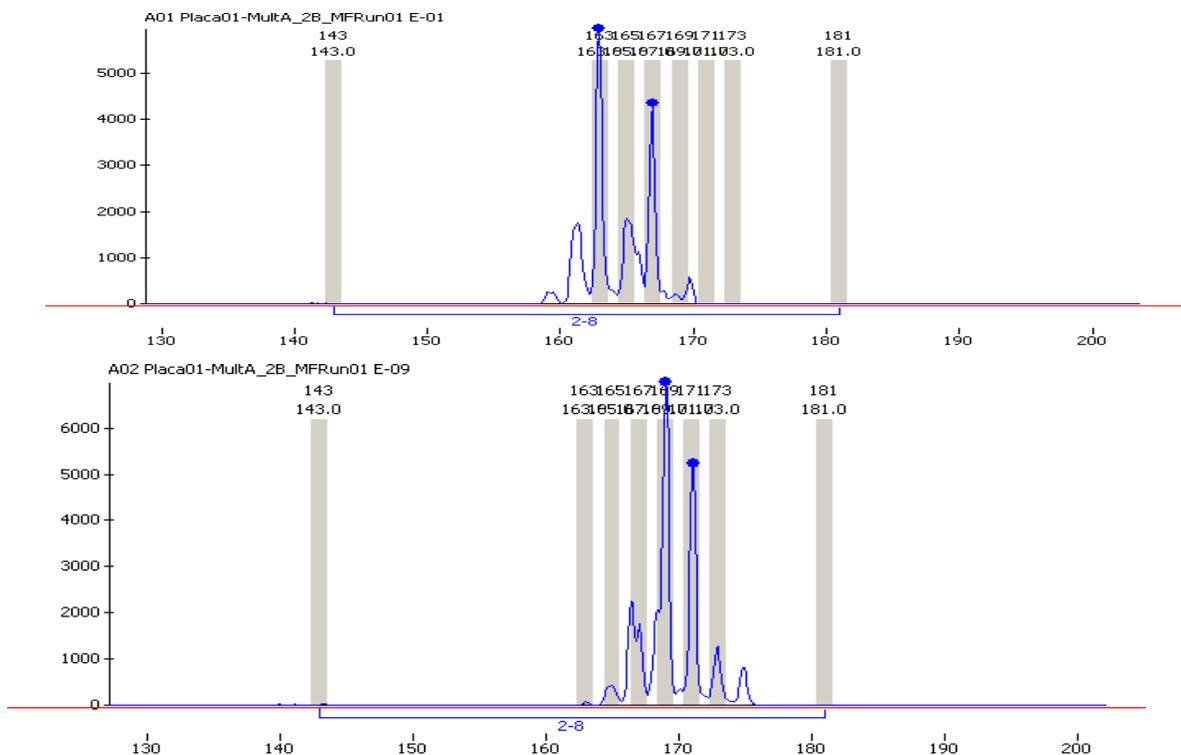


FIGURA 3: Representação gráfica obtida com o programa *Fragment Profiler* mostrando o padrão eletroforético do primer 2-8. Cada gráfico representa um animal heterozigoto, com seus respectivos alelos (163, 167) e (169, 171). O “bin set” foi ajustado para análise das populações F1 e F2 com a exclusão dos alelos ausente nos parentais, neste caso 145 ao 161 e 175, 177 e 179.

Foram realizadas 12.000 genotipagens referentes aos 480 animais que incluem parentais, F1 e F2 utilizando 25 novos marcadores microssatélites. Para os 64 marcadores analisados foi possível identificar 539 alelos com média de 8.4 alelos para cada marcador na população. Com relação aos 64 marcadores, o que apresentou o maior número de alelos foi CYP21 (15), os marcadores BM321 e DIK2272 apresentaram o menor número de alelos (3). Levando em consideração os marcadores adicionados para o MF o marcador DIK5169 apresentou maior número de alelos (14) e BM3010 juntamente com RM029 o menor número de alelos (4). Somente 10 marcadores apresentaram o mesmo número de alelos que o mapa consenso, 34 marcadores apresentaram menor número de alelos e 20 apresentaram maior número de alelos que o mapa consenso (TABELA 3). Para o mapa consenso, 623 alelos foram descritos, com média de 9.7 alelos por marcador. A diferença no número de alelos já era esperada visto que, a construção do mapa de referência foi realizada com uma grande variedade de raças e dessa forma uma maior diversidade foi encontrada.

Foi possível detectar uma média de falhas de 1,86% em toda a população. Esse valor encontra-se dentro do esperado pelo fato de algumas amostras de DNA serem antigas e com isso a qualidade do material pode ter diminuído, além disso, erros durante a etapa de amplificação e injeção no sequenciador automático ocorrem normalmente. Com o objetivo de diminuir a porcentagem de erros e aumentar os dados genotípicos, reações de PCR e injeções no seqüenciador automático foram repetidas com os marcadores que não apresentaram bons resultados. Vários marcadores tiveram 100% de aproveitamento e não apresentaram falhas, o marcador com maior número de falhas foi CSSM022 (11,5%) (TABELA 3).

TABELA 3: Cromossomo, marcador, número de alelos do mapa consenso MARC/USDA, número de alelos encontrados na população F2 da Embrapa Gado de Leite, posição dos marcadores em centimorgans (cM) no mapa MARC/USDA, posição dos marcadores em centimorgans (cM) na população F2 da Embrapa Gado de Leite e as falhas referentes a cada marcador.

Cromossomo	Marcador	Alelos MARC/USDA	Alelos Embrapa	Posição MARC/USDA	Posição Embrapa	Falhas PCR	Falhas ET-Rox 400	% Falhas
2	BM3010	6	4	38,9	32,5	11	1	2,5
2	BMS1300	7	7	50,6	49,2	6	1	1,5
2	DIK4972	8	10	69,7	63,3	7	1	1,7
2	MB106	7	7	95,6	99,2	5	2	1,7
5	CSSM022	16	7	74,2	113,7	40	15	11,5
5	RM029	5	4	81,9	125,6	24	10	7,1
5	DIK4329	9	10	95,5	153,1	6	11	3,5
5	DIK5238	10	9	111	174,7	0	0	0
5	MNB-71	11	13	133,1	202,4	4	0	1,3
10	DIK5169	8	14	0	0	0	0	0
10	DIK4970	10	11	39,5	52,9	0	0	0
10	DIK2245	10	8	60,4	88,9	1	2	1,7
10	DIK1049	8	10	70,6	117,4	0	0	0
10	BMS2641	4	6	87,5	164,3	2	2	1,7
11	MNB-70	9	13	24,6	18	1	2	0,6
11	ILSTS036	9	10	61,6	55,7	1	2	0,6
11	BMS1048	9	7	81,1	80,4	2	0	1,3
21	DIK2913	9	12	57,1	63,5	7	2	1,9
21	BMS743	18	11	75,3	89,1	5	1	1,5
23	NLBCM15	7	11	0	0	6	7	2,7
23	DIK2950	6	8	30,8	29,9	3	2	1
23	RM185	8	7	52,3	53,6	5	1	1,5
23	CSSM024	13	10	65,7	77,7	4	2	1,3
27	TGLA179	7	7	5,4	15	9	5	2,3
27	BMS2650	12	13	12,3	32,4	4	1	1

5.2 Estatística descritiva dos marcadores microssatélites

A heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e conteúdo de Informação Polimórfico (PIC) foram utilizados para verificar o grau de polimorfismo dos marcadores. A média de H_o na população F2 foi 0,79 e no mapa MARC 0,64. O marcador que apresentou o maior valor de H_o foi CYP 21 (0,96) e o menor BM3010 (0,46). Segundo Ott (1992) um loco é considerado polimórfico se H_o apresentar valor superior a 0,1 e altamente polimórfico se superior a 0,7. Dos 64 marcadores utilizados, 53 marcadores apresentaram H_o superior a 0,7 sendo dessa forma considerados altamente polimórficos. A média do PIC na população F2 foi de 0,72, o marcador CYP21 apresentou o maior valor de PIC (0,88) e BM3010 o menor valor (0,39) (TABELA 4). Segundo Botstein et al. (1980), PIC superior a 0,5 é considerado altamente polimórfico, entre 0,25 e 0,5 moderadamente polimórfico e inferior a 0,25 pouco polimórfico. Seguindo esse critério, 96,8% dos marcadores utilizados na população F2 são altamente polimórficos e somente 2% moderadamente polimórficos. Valores de PIC são comumente utilizados para indicar a qualidade de um marcador em estudos genéticos podendo ser utilizados em análises de segregação, identificação de população e teste de paternidade. Com base nos altos valores de PIC e grande quantidade de alelos um painel de marcadores para teste de paternidade e genealogia poderia ser construído para posterior utilização nesses tipos de estudos. Dentre os marcadores que poderão ser utilizados em testes de paternidade podemos destacar BM4440, MNB-71, CYP21 e BMS 2650.

TABELA 4: Marcador, Heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e conteúdo de informação polimórfico (PIC) na população F2.

Marcador	Ho	He	PIC	Marcador	Ho	He	PIC
TGLA44	0,90	0,84	0,82	BMS2614	0,85	0,80	0,77
MNB-83	0,69	0,65	0,58	BMS424B	0,86	0,84	0,82
BM3010	0,46	0,47	0,39	MNB-70	0,89	0,84	0,81
BMS1300	0,76	0,69	0,64	INRA177	0,79	0,77	0,74
BM4440	0,92	0,87	0,86	BM7169	0,78	0,74	0,71
DIK4972	0,83	0,77	0,74	ILSTS036	0,82	0,79	0,77
TGLA226	0,86	0,79	0,75	RM150	0,84	0,83	0,81
MB106	0,93	0,74	0,71	BMS1048	0,68	0,66	0,63
BMS2519	0,85	0,82	0,79	BL1103	0,87	0,78	0,75
IDVGA-2	0,89	0,83	0,81	BMS655	0,68	0,67	0,62
BM6026	0,88	0,79	0,75	DIK4593	0,89	0,81	0,78
BP1	0,62	0,66	0,62	DIK2272	0,59	0,60	0,52
BM321	0,54	0,50	0,43	DIK4001	0,83	0,81	0,78
BMS1617	0,85	0,76	0,73	MNB-88	0,79	0,79	0,76
BMS490	0,83	0,79	0,76	DIK2913	0,85	0,78	0,75
CSSM022	0,77	0,75	0,71	AFZ1	0,72	0,83	0,81
RM029	0,56	0,60	0,54	BMS743	0,81	0,81	0,78
BMS1248	0,73	0,69	0,65	DIK3023	0,65	0,63	0,56
DIK4329	0,75	0,70	0,66	NLBCMK15	0,91	0,85	0,83
ILSTS034	0,84	0,81	0,79	BM1815	0,90	0,84	0,82
DIK5238	0,89	0,85	0,83	DIK2950	0,73	0,71	0,67
ETH152	0,71	0,65	0,59	CYP21	0,96	0,89	0,88
MNB-71	0,83	0,85	0,84	RM185	0,84	0,75	0,71
DIK5169	0,82	0,77	0,73	BM1818	0,82	0,79	0,76
BM1237	0,86	0,80	0,78	CSSM024	0,76	0,74	0,70
BL1035	0,90	0,85	0,83	BM1905	0,91	0,86	0,85
DIK4970	0,81	0,77	0,74	BM3507	0,74	0,71	0,68
BM875	0,79	0,79	0,76	TGLA179	0,84	0,72	0,67
DIK2245	0,81	0,78	0,75	BMS2650	0,88	0,86	0,85
DIK1049	0,67	0,62	0,57	BMS2137	0,63	0,72	0,68
TGLA44	0,90	0,84	0,82	CSSM036	0,76	0,79	0,76
BMS2641	0,73	0,67	0,61	INRA027	0,77	0,72	0,67

5.3 Mapa de ligação

Novos mapas de ligação foram construídos para a população F2, já que há variações de acordo com o número de marcadores, número de animais utilizados e do tipo da população que está sendo usada (LYNCH & WALSH, 1998).

Para a construção dos mapas de ligação, foi montada uma planilha no programa Excel onde os dados de genótipos foram organizados por famílias com informações de pais e avós para cada conjunto de irmãos completos na população F2. Essa tabela continha informações de 955 animais, considerando as repetições de pais e avós, organizados em 92 famílias. A acurácia do mapa de ligação está diretamente relacionada com o número de indivíduos usados nas análises para gerar o mapa, pois quanto maior o número de meioses informativas, maior a chance de detectar-se recombinação entre pequenas distâncias. Dessa forma, quanto menos eventos de recombinações, menor será a acurácia para determinar o intervalo entre os marcadores.

Os mapas gerados nos estudos da população F2 diferiram quanto à posição dos marcadores e tamanho do mapa quando comparados ao mapa de referência, contudo a ordem dos marcadores permaneceu inalterada. Os cromossomos 2, 5, 10, 21, 23 e 27 apresentaram menor tamanho quando comparados ao MARC, sendo que mapa do cromossomo 11 mostrou-se maior no mapa de referência (TABELA 5). Tal fato pode ser explicado pela menor quantidade de meioses informativas detectadas na população F2.

TABELA 5: Tamanho do mapa cromossômico após análises (Embrapa) comparados ao tamanho do mapa disponibilizado MARC/USDA.

Cromossomo	Tamanho mapa Embrapa	Tamanho mapa MARC/USDA
2	126	140
5	133	202
10	109	184
11	117	111
21	84	122
23	71	88
27	58	75

5.4 Mapeamento Fino de QTL associados à resistência ao carrapato bovino

Novas análises de associação foram realizadas nos cromossomos 2, 5, 10, 11, 21, 23 e 27 confirmando a presença dos QTL encontrados por Machado et al. (2010). Os QTL encontrados no BTA 2 e 27 foram significativos a $P_c < 0.05$, aqueles localizados no BTA 5, 10, 11, 21 e 23 foram significativos a $P_c < 0.01$. Somente o BTA 23 apresentou QTL a nível genômico de 1% (TABELA 6).

No BTA2 foram adicionados 4 novos marcadores e as novas análises de associação foram feitas com 10 marcadores. O QTL ($P_c < 0.05$) foi confirmado na estação seca utilizando o modelo aditivo e dominante. Após a adição de novos marcadores o I.C. sofreu redução de 22 para 10 cM (FIGURA 4). Esse cromossomo possui grande interesse para a bovinocultura, pois nele está localizado o loco da hipertrofia muscular bovina que confere ao animal a característica de musculatura dupla. Trabalhos realizados por Charlier et al. (1995) posicionaram o marcador TGLA44 a 2 cM desse loco, o mesmo marcador foi utilizado no presente estudo. O BTA 2 tem alta similaridade com o cromossomo 2 de humanos (HSA 2). Estudos mostram que a maior parte do BTA2 corresponde ao (HSA2) exceto por uma pequena porção telomérica que corresponde a HSA1p34-36 (HAYES 1995; SOLINAS-TOLDO et al. 1995; CHOWDHARY et al., 1996). Por meio dessa sintonia é possível localizar genes e observar suas funções mesmo que ainda não tenham sido bem descritos em bovinos. Dentre os vários genes presentes no I.C. do QTL identificado no BTA 2, podemos destacar o gene que codifica a proteína CXCR4. Essa proteína corresponde a um receptor de quimiocina que juntamente com seu ligante, CXCL12, são essenciais no desenvolvimento de linfócitos, diferenciação de células T, homeostase, adesão celular, migração celular, inflamação, apoptose celular, metástase de tumor, etc. (HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2002; SUZUKI et al., 2001; MULLER et al., 2001; PROUDFOOT et al., 1999; ZOU et al., 1998). Kabashima et al. (2007) encontraram CXCR4 altamente expresso nas células dendríticas cutâneas durante o processo de migração, dessa forma eles concluíram que a presença do complexo CXCL12-CXCR4 nas células

dendríticas cutâneas tem um importante papel na iniciação da resposta imune na pele potencializando a migração das células dendríticas e contribuindo no processo inflamatório. Antígenos expostos são levados do sítio de alimentação do carrapato pelas células dendríticas (CDs), que processam e apresentam esses antígenos para os linfócitos T, iniciando uma resposta imune celular ou mediada por anticorpos (ALLEN et al, 1979; LARREGINA & FALO, 2005).

TABELA 6: Resultado do mapeamento fino na população F2 mostrando a estação em que o QTL foi detectado, o valor de F, posição onde foi detectado o QTL, intervalo de confiança (I.C.), efeito aditivo e dominante e a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL (σ^2 %).

BTA	Estação	Valor F		Posição	IC	Início	Final	Efeito	Efeito	σ^2 %
		A	AD	cM	cM	IC cM	IC cM	Aditivo	Dominante	
2	Seca	6	6,73	56	10	50	60	-0,198	-0,311	4,1
5	Chuva	12,02	6,8	143	8	141	149	-0,359	0,349	3,8
10	Seca	11,72	5,95	61	27	43	70	0,313	-0,08	3,6
11	Chuva	16,62	8,3	41	19	35	54	0,383	0,014	4,7
21	Chuva	14,32	7,5	103	26	89	115	0,42	0,174	4,3
23	Chuva	21,71	10,9	73	13	67	80	0,423	-0,077	6,4
23	Seca	19,01	10,6	47	12	41	53	0,36	0,218	5,7
27	Chuva	9,63	4,8	0	7	0	7	0,3	0,036	2,9

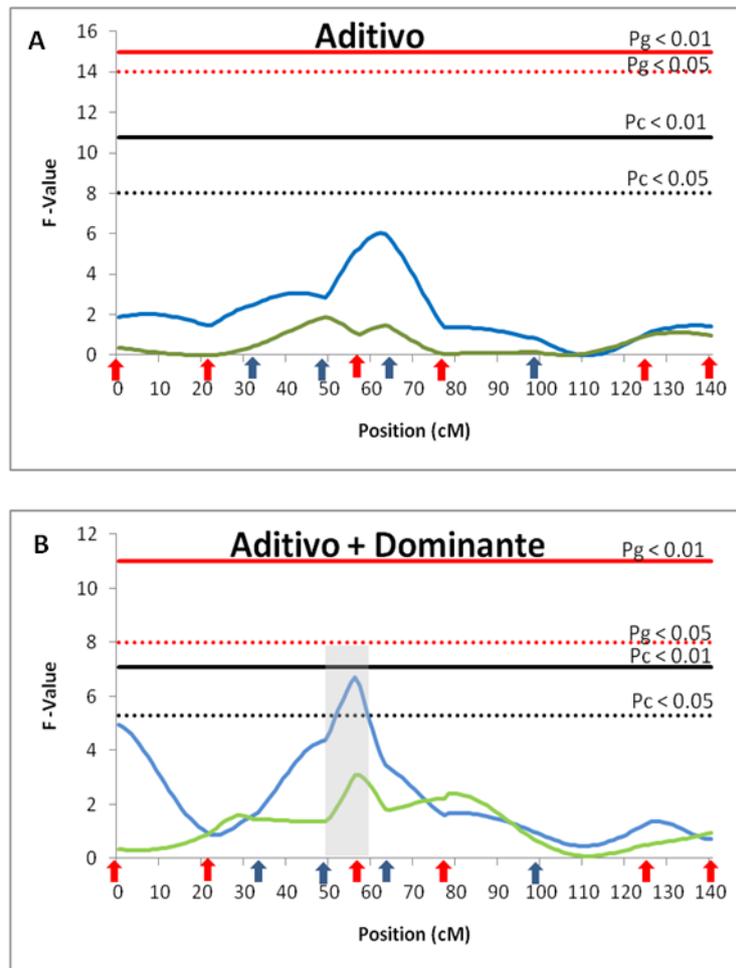


FIGURA 4: Valores de F para o cromossomo 2 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

As novas análises no BTA 5 foram realizadas com 13 marcadores, cinco dos quais foram adicionados para o mapeamento fino. Nesse cromossomo foi confirmado o QTL ($P_c < 0.01$) na estação chuvosa utilizando modelo aditivo que mostrou-se negativo. O I.C sofreu redução significativa de 12 cM, passando de 20 para 8 cM (FIGURA 5). O efeito aditivo negativo indica que os animais da raça Holandesa possuem um menor número de carrapatos, sendo assim esses animais seriam resistentes ao carrapato possuindo genes que atuam contra o parasita. Tal resultado reforça a teoria que nenhuma raça é totalmente resistente ou susceptível ao carrapato. Vários genes foram descritos na região onde foi detectado o QTL, dentre eles o gene *IL2R β* (Receptor de interleucina 2 Beta), *CLC7A* em humanos *CLEC7A* (C-type lectin domain family 7, member A) e também *FGF6* (Fator de crescimento de fibroblasto). *IL2R β* é uma

subunidade que juntamente com IL2R α e IL2R γ formam o receptor de IL-2. Além de participar da formação do receptor de IL-2 ele também faz parte do receptor de IL-15. Linfócitos T em repouso expressam baixos níveis de complexos IL2R $\alpha\beta\gamma$. A expressão da subunidade β é aumentada quando os linfócitos T CD4+ e CD8+ são ativados. As principais funções da IL-2 ligada ao seu receptor são: sobrevivência e manutenção da função das células T regulatórias suprimindo resposta contra antígenos; sobrevivência, proliferação e diferenciação de linfócitos T ativados por antígeno; proliferação e diferenciação de células *natural killer*; em linfócitos B a IL-2 parece atuar como estímulo para síntese de anticorpos (ABBAS et al., 2008; COMMINS et al., 2009). Piper et al. (2009) analisaram entre outras características a expressão de IL-2 e a subunidade IL2 α no sangue das raças Brahman e holandesa e verificou uma maior expressão nos animais Brahman que são zebuínos e conseqüentemente mais resistentes ao carrapato que os taurinos. Como os animais tiveram maior expressão de IL2 α espera-se também que a expressão de IL2 β também seja significativamente maior já que ela é essencial para a formação do receptor de IL-2 juntamente com IL2 α . O CLC7A é um receptor de superfície celular que reconhecem moléculas de patógenos e dessa forma direcionam a resposta imune. Ela é altamente expressa em células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células B e T CD4+ (HERRE et al., 2004). Willcocks et al. (2006) identificaram e estudaram a expressão gênica desse gene em bovinos, além de descreverem a expressão em algumas células do sistema imune como NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Ainda de acordo com esse trabalho, CLC7A foi detectado em infecções bacterianas. CLC7A é de grande importância no controle de infecções fúngicas e como mostrado no trabalho citado anteriormente também está envolvido na defesa de infecções bacterianas e dessa forma pode representar um importante gene candidato envolvido na resistência de algumas doenças. Como o carrapato é vetor de outras infecções, principalmente um carreador de infecções bacterianas, esse gene pode representar um elo para controle dessas infecções e conseqüentemente desencadear resposta contra o carrapato. De acordo com os dados mostrados por Willcocks et al. (2006) este gene está localizado próximo ao marcador BM1248 sendo que o mesmo marcador foi utilizado no presente estudo e dessa forma poderá ser usado para direcionar

na localização do gene. O BTA5 possui outros genes de importância como IFN γ e IGF-1 sendo o último localizado a 15,4 cM do marcador BMS1248 (MACHADO et al., 2003). O IFN γ é secretado pelos linfócitos T citotóxico CD8+, CD4+, células NK, células B e células apresentadoras de antígeno, atuando na regulação da resposta imunológica. O IGF1 atua como modulador de crescimento, função metabólica do sistema nervoso central, sobrevivência de oligodendrócitos e mielinização. Ozawa et al. (2000) mostraram por meio de mapeamento comparativo grupos sintênicos entre BTA5 e HSA12, HSA22, MMU6, MMU10 e MMU15 e a localização dos genes IGF1 e IFN γ nessas regiões.

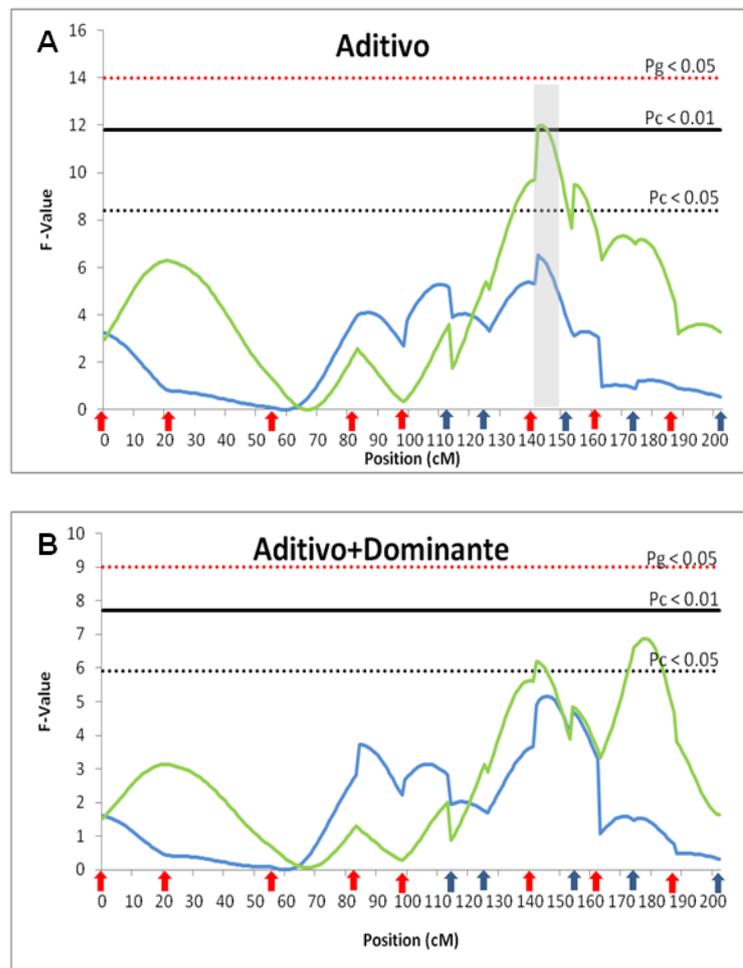


FIGURA 5: Valores de F para o cromossomo 5 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

No BTA 10, após a adição de cinco marcadores foi possível confirmar a presença dos dois QTL encontrados na estação de seca por Machado et al. (2010) porém com picos mais definidos. Esse QTL sofreu a maior redução de I.C. O intervalo inicial de 47 cM não possibilitava a distinção entre os dois picos, com a redução desse intervalo para 27cM foi possível distinguir as duas regiões do QTL (FIGURA 6). Band et al. (2000) e Hayes et al. (2003) demonstraram sintonia conservada entre o BTA10, HSA14 e MMU12 que posteriormente foi confirmada com o mapeamento físico feito por Kuiper et al.

(2005). Esses trabalhos facilitaram a identificação de genes presentes no BTA 10 para posteriores estudos de expressão e funcionamento de tais genes em bovinos. Um dos genes presentes no I.C. é RasGRP1, a proteína produzida por este gene tem papel essencial na sinalização de receptores de células T, sinalização mediada por IgE e na sinalização que leva ao funcionamento de células NK (LEE et al., 2009). Estudos de Dower et al (2000) mostraram que o desenvolvimento das células T é parcialmente bloqueado em animais RasGRP1^{-/-}, o que mostra a grande importância desse gene no processo de resposta imunológica para o animal.

No BTA 11, o QTL ($P < 0.05$) previamente identificado por Machado et al. (2010) foi confirmado na estação chuvosa e o intervalo de confiança sofreu uma pequena redução passando de 26 para 19 cM (FIGURA 7). A redução no intervalo de confiança foi relativamente pequena, contudo o pico gerado mostrou-se mais definido que o anterior após a adição dos marcadores. O mapa comparativo (SOLINAS-TOLDO et al., 1995) mostrou que há sintonia entre BTA11 e HSA2. Nesse cromossomo foram descritos o gene CD8A e vários genes da família da Interleucina 1 (IL1), dentre eles o IL1A e seu receptor IL1RA (YOO et al. 1994) e IL1B (LÓPEZ-CORALLES et al., 1998). O gene CD8A produz proteínas de superfícies para células T que media a interação entre células no sistema imunológico. Estudos realizados por Constantinoiu et al. (2010) mostraram o padrão de células que participam da resposta imune frente a infestação pelo carrapato sendo a presença de CD8⁺ foi mais significativa na pele dos animais zebuínos que taurinos. O mesmo estudo também demonstrou o comportamento de CD8⁺ durante todo o período de infestação avaliado. Já os membros da família da IL1 são conhecidos por atuarem na resposta inflamatória, infecciosa que possui um papel essencial na imunidade inata, sendo altamente induzido após a sinalização por receptores toll-like. Esses receptores atuam na detecção de invasão de bactérias e vírus, contudo também reconhecem moléculas produzidas por tecidos danificados (TIZARD, 2004) que é o ocorrido na fixação do carrapato, dessa forma, esses genes podem ser importantes na resposta do animal frente a infecções causadas por esse parasita.

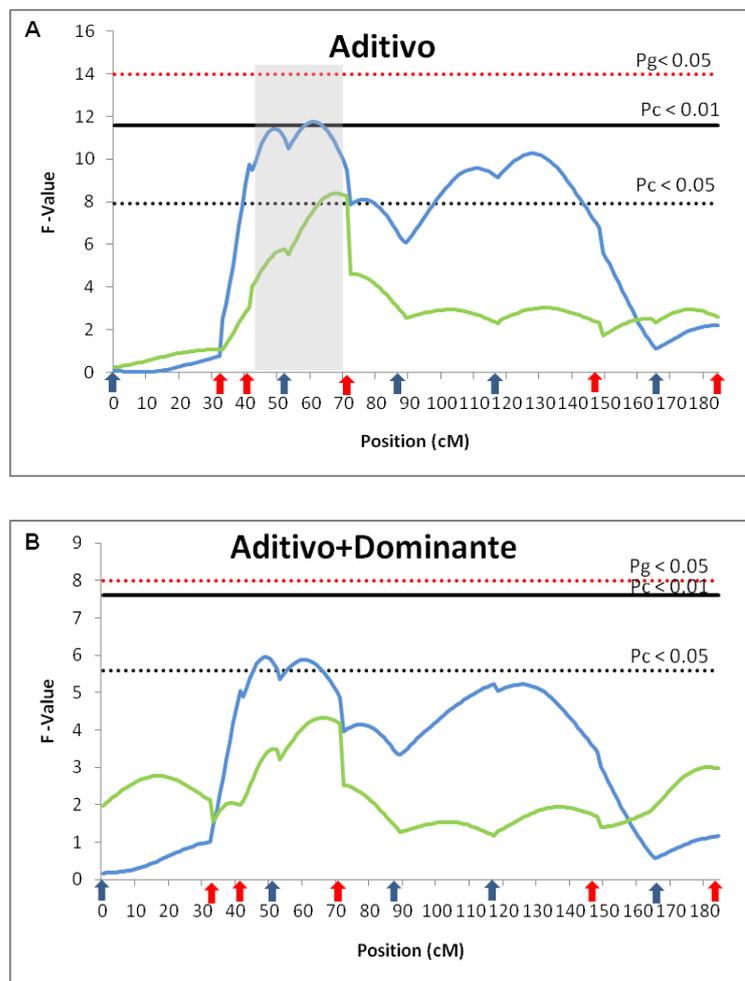


FIGURA 6: Valores de F para o cromossomo 10 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

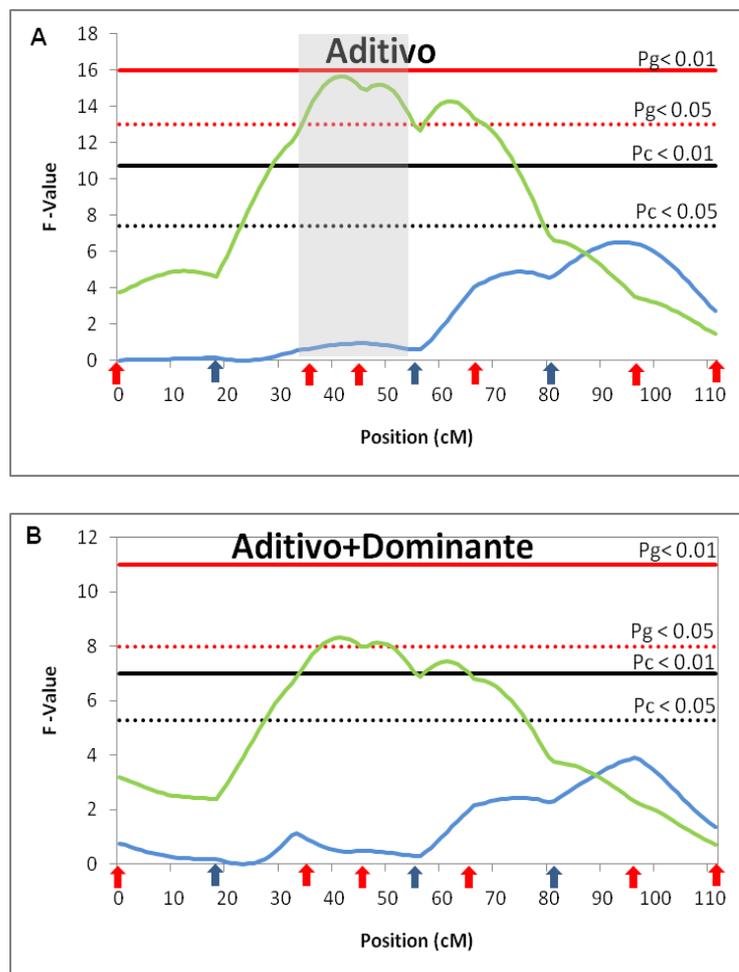


FIGURA 7: Valores de F para o cromossomo 11 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

No cromossomo 21, um QTL ($P_g < 0.05$) foi detectado na estação chuvosa usando o modelo aditivo em um I.C. de 26 cM, anteriormente de 36cM (FIGURA 8). Oito marcadores foram utilizados para fazer as análises nesse cromossomo, sendo dois deles adicionados para o mapeamento fino. Jiang et al. (2002) avaliaram regiões conservadas entre humanos e bovinos e identificaram sintonia entre o BTA21 e HSA14, HSA15. Além do QTL para resistência ao carrapato, foi também encontrada, nessa região, QTL para peso de carcaça (MCCLURE et al., 2010), carga de nematóides gastrointestinais

(COPPIETERS et al., 2009), produção de leite (BAGNATO et al., 2008) dentre outros. A coincidência da presença de QTL relacionados com carga de parasitas intestinais e resistência ao carrapato dá indícios que nessa região pode haver genes atuando nas duas características e que animais resistentes a carrapatos podem ser também resistentes a helmintos ou outros parasitas.

O BTA23 apresentou o QTL mais significativo ($P_g < 0.01$). Nesse cromossomo foi detectado QTL em ambas as estações. O intervalo de confiança manteve-se inalterado na estação seca (12 cM) e sofreu uma pequena redução na estação chuvosa passando de 17 para 14 cM (FIGURA 9). A adição de novos marcadores no BTA 23 não ocasionou a redução esperada no I.C. do QTL encontrado anteriormente, mas resultou na detecção de um novo QTL na estação seca não identificado por Machado et al. (2010). A presença do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) bovina denominado BoLA, fez com que esse cromossomo fosse o mais bem estudado e caracterizado (FRIES et al., 1993). Esses genes são particularmente interessantes para o melhoramento animal, pois estão associados à resposta imunológica e a características produtivas. Martinez et al (2006) demonstrou o efeito do loco BoLADBR3 na resistência ao carrapato na população F2 em estudo, o mesmo loco apresentou associação com produção de leite em bovinos da raça Gir (Machado et al., 2005). Na região inicial do cromossomo onde foi detectado o QTL foi possível identificar a presença dos locos DYA, DOA, DMA e DMB pertencentes à classe IIb do BoLA. Os genes DY são encontrados somente em ruminantes e possuem similaridade com os genes DQA1 e DQB2 em humanos, que normalmente exibem baixo nível de polimorfismo e são expressos em células dendríticas (BALLINGALL et al., 2004). Os genes DM em humanos e camundongos possuem função na apresentação de antígenos via MHC de classe II (ALFONSO & KARLSSON, 2000), onde DOA e também DOB codificam proteínas que podem estar atuando na regulação da função da molécula DM. Em bovinos, os genes DM e DO tem sido sequenciados a partir de cDNA utilizando primers derivados do sequenciamento humano. Além dos genes citados acima, a região referente a classe IIb do BoLA contém os genes TAP1 e TAP2 que codificam moléculas envolvidas no transporte de peptídeos.

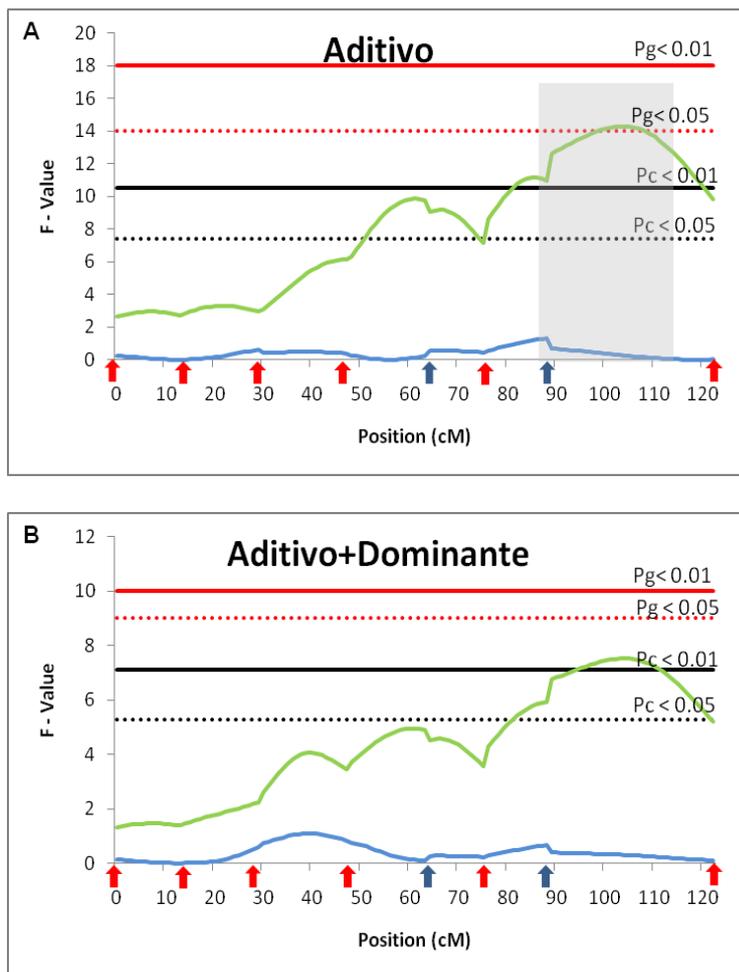


FIGURA 8: Valores de F para o cromossomo 21 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

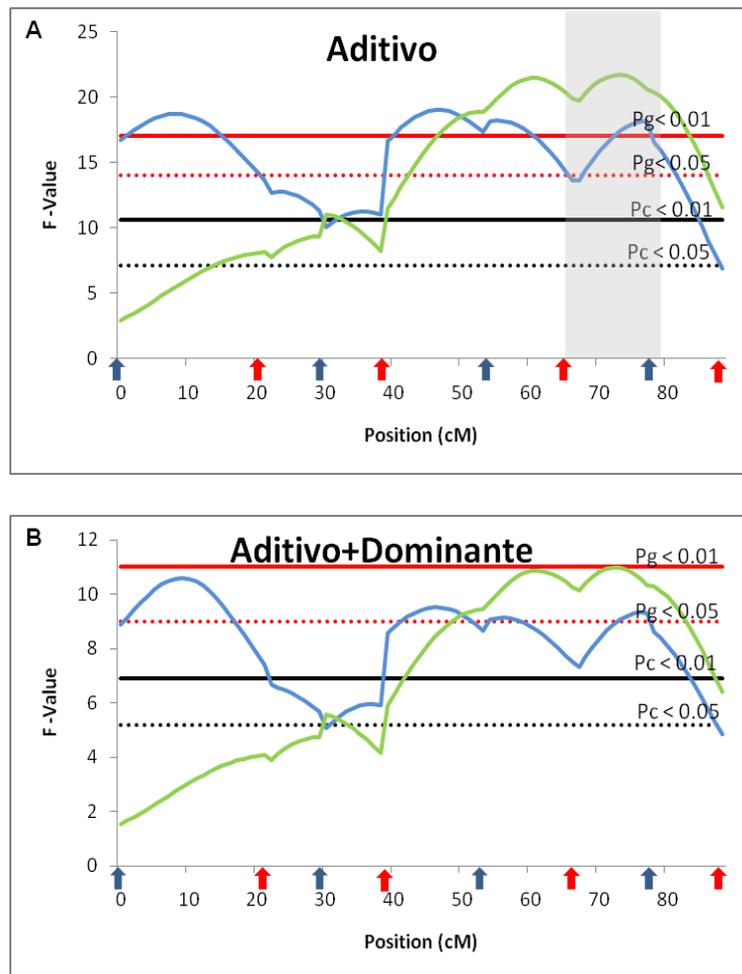


FIGURA 9: Valores de F para o cromossomo 23 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

No BTA27 as novas análises foram realizadas com seis marcadores que confirmou a presença de um QTL ($P_c < 0.05$) na estação chuvosa no início do cromossomo utilizando o modelo aditivo (FIGURA 10). Este QTL foi encontrado em um intervalo de confiança de 7 cM. Dentro do mesmo intervalo de confiança foram detectados QTL relacionados à porcentagem de gordura no leite (RON et al., 2004), produção de leite (BAGNATO et al., 2008), produção de gordura no leite (ASHWELL et al., 2004), conteúdo de células somáticas (KUHN et al., 2003). Estudos de mapeamento comparativo revelaram uma conservada

sintenia entre o BTA27 e HSA4 e HSA8 (HAYES, 1995; SOLINAS & TOLDO et al., 1995). O BTA 27 abriga o cluster de genes da beta defensina que se localiza em HSA8p23-p22 (GALLAGHER et al., 1995). As betas defensinas são peptídeos antimicrobianos, quimiotáticos para células dendríticas imaturas e células T de memória e participam da resposta imune inata. Elas regulam a expressão de citocinas, estimulam proliferação de células epiteliais e fibroblastos e promove a liberação de histamina dos mastócitos (YANG et al., 1999). Todos os fatores citados acima podem estar relacionados de forma indireta ou direta contra o carrapato fixado no bovino. As células dendríticas como já mencionado são de extrema importância para a apresentação de antígenos e precisam ser atraídas para o local da injúria provocada pelo carrapato e a partir de então ativar células T que farão a defesa do organismo. Além disso, as betas defensinas estimulam a proliferação das células epiteliais no local lesionando, auxiliando na cicatrização e evitando dessa forma que ocorram outros tipos de infecções.

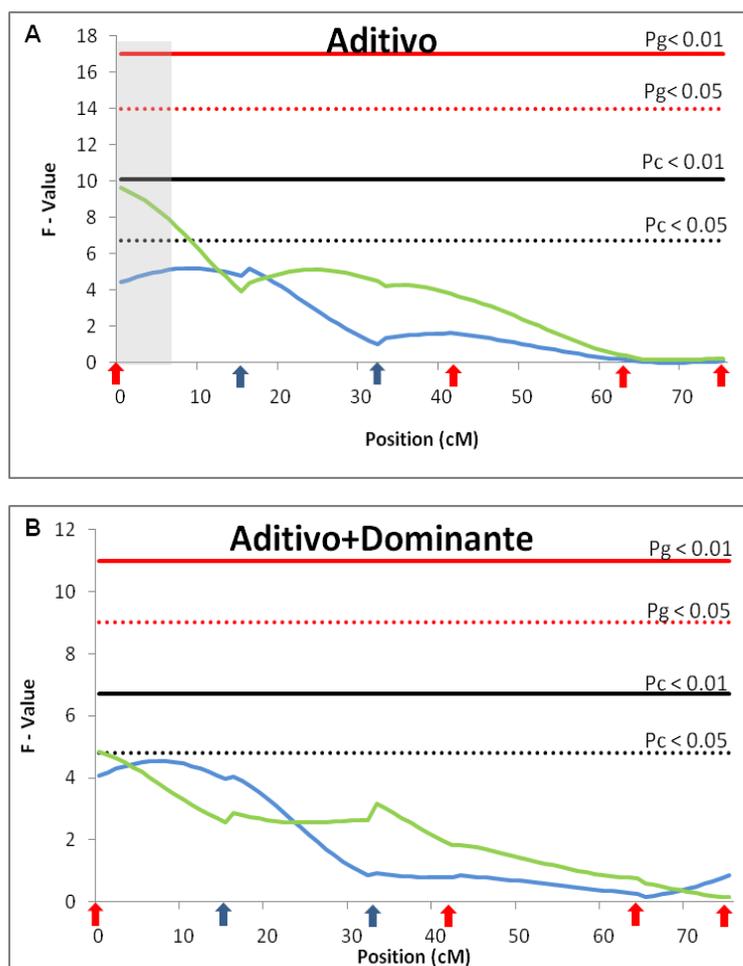


FIGURA 10: Valores de F para o cromossomo 27 utilizando o modelo aditivo (A) e aditivo + Dominante (B). A linha em verde é referente à estação de chuva e a azul à seca. As setas vermelhas são referentes aos marcadores utilizados antes do Mapeamento Fino e as azuis são referentes aos marcadores adicionados no Mapeamento Fino. P_c = nível de significância do QTL à nível cromossômico; P_g = nível de significância do QTL à nível genômico.

Por mais que os genes descritos nas regiões onde foram localizados os QTL possam não estar atuando diretamente contra o carrapato, eles podem estar de forma indireta auxiliando no controle de infecções secundárias causadas por bactérias que estão associadas ao parasita além de contribuírem para ativação da resposta imune, pois muitos genes participam de vias que levam a resposta contra o carrapato.

Outros estudos devem ser realizados após o mapeamento fino nos cromossomos onde foram detectados os QTL. A busca detalhada por genes candidatos, identificação de SNP nas regiões onde foram identificados QTL

além do estudo desses polimorfismos em populações comerciais correspondem ao próximo passo que poderá auxiliar e antecipar o uso da MAS na bovinocultura. A validação dos marcadores em animais Girolando seria o principal interesse para a bovinocultura brasileira já que essa raça forma 80% do rebanho leiteiro do Brasil sendo um mercado imediato para a utilização da MAS.

6 CONCLUSÕES

A realização do mapeamento fino, com a adição de novos marcadores, reduziu significativamente a maioria dos intervalos de confiança dos QTL detectados por Machado et al (2010), exceto para o BTA 23 que teve uma redução muito pequena. A redução do intervalo de confiança poderá facilitar a validação e identificação de genes candidatos presente na região do QTL. Com a identificação de marcadores associados a esses genes, a implementação da MAS para seleção dos animais mais resistentes seria facilitada.

7 Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. 2008. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

ABIOLA, O. ; ANGEL, J. M.; AVNER, P.; et al. 2003. The nature and identification of Quantitative Trait Loci: a community's View. **Nat. Rev. Genet.**, **4**: 911-916.

ALFONSO, C.; KARLSSON, L. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. **Annual Rev Immunological**, **18**:113-42.

ALLEN, J.R.; HHALIL, H.M.; WIKEL, S.K. 1979. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **Journal Immunology**, **122**: 563-565.

ALLEN, J.R.; DOUBE, R.M.; KEMP, D.H. 1977. Histology of bovine skin reaction to *Ixodes holocyclus*. **Canadian Journal of comparative Medicine**, **41**: 26-35.

ALLEN, J.R. 1973. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistance guinea pigs. **International Journal of Parasitology**, **3**: 195-200.

ANDERSSON, L. 2001. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature Reviews Genetics**, **2**: 130-138.

ASHWELL, M. S.; HEYEN, D. W.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P.; DA, Y.; VANRADEN, P. M.; RON, M.; WELLER, J. I.; LEWIN, H. A. 2004. Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production, Health, and Reproductive Traits in Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science**, **87**: 468-475.

BAGNATO, A.; SCHIAVINI, F.; ROSSONI, A.; MALTECCA, C.; DOLEZAL, M.; MEDUGORAC, I.; SOLKNER, J.; RUSSO, V.; FONTANESI, L.; FRIEDMANN, A.; SOLLER, M.; LIPKIN, E. 2008. Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three country Brown Swiss population. **Journal of Dairy Science**, **91**: 767-783.

BALLINGALL, K.T.; ELLIS, S.A.; MACHUGH, N.D.; ARCHIBALD, S.D.; MCKEEVER D.J. 2004. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. **Immunogenetics**, **55**: 748-755.

BAND, M.R.; LARSON, J.H.; REBEIZ, M.; ET AL. 2000. An Ordered Comparative Map of the Cattle and Human Genomes. **Genome Research**, **10**: 1359-1368.

BARENDSE, W.; VAIMAN, D.; KEMP, S. J. ; SUGIMOTO, Y. ; ARMITAGE S. M. ;et al. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, **8**: 21-28.

- BARENDSE, W.; ARMITAGE, S. M.; KOSSAREK, L. M. ; SHALOM, A. ; KIRKPATRICK, B. W. ; et al. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, **6**: 227-235.
- BASTOS, R.G.; JOHNSON, W.C.; MWANGI, W.; GOFF, W.L. 2008. Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN-gamma after stimulation by *Mycobacterium bovis* BCG or *Babesia bovis* exposed splenic dendritic cells. **Veterinary Immunology and Pathology** ,15, 124 (3-4), 302-312, 2008.
- BIRON. C.A.; GAZZINELLI, R.T. 1995. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current Opinion in Immunology**, **7(4)**: 485-496.
- BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M. ; KEELE, J. W. ; STONE, R. T. ; SUNDEN, S. L. ; et al. 1994. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, **136** : 619-639.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DARVIS, R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics** 32: 314-331.
- BOWMAN, A.S.; NUTTAL, P.A. 2004. Ticks: biology, disease and control. **Parasitology** 129,1.
- BROSSARD, M. and WIKEL, S.K. 2004. Tick immunology. **Parasitology**, **129**: 161-176.
- BROSSARD, M.; FIVAZ, V. 1982. *Ixodes ricinus* .: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. **Parasitology**, **85**: 583-592.
- CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; GROBET, L.; LEROY, P.L.; MICHAUX, C.; MNI, M.; SCHWERS, A.; VANMANSHOVEN, P.; HANSET, R.; GEORGES, M. 1995. The *mh* causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. **Mammalian Genome** **6**: 788–792.
- CHER, D.J.; MOSMANN, T.R. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **Journal Immunology**, **138**: 3688 – 3694.
- CHOWDHARY, B.P.; FRONICKE, L.; GUSTAVSSON, I.; SCHERTHAN, H. 1996. Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. **Mammalian Genome** **7**: 297–302.
- CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. 2005. Mapping genomes at the chromosome level. *Mammalian Genomics*. Edited by A. Ruvinsky and J. A. Marshall Graves. CABI Publishing, Oxfordshire, UK, 23-65.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics** **138**: 963-971.

COMMINS S.P.; BORISH. L.; STEINKE, J.W. 2009. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **Journal Allergy Clin Immunol**, Nov 23.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEWTABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. 2010. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International Journal for Parasitology**, 40: 865-875.

COPPIETERS, W.; MES, T.H.; DRUET, T.; FARNIR, F.; TAMMA, N.; et al. 2009. Mapping QTL influencing gastrointestinal nematode burden in Dutch Holstein-Friesian dairy cattle. **BMC Genomics** 10:96-109.

DARVASI, A. 1998. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. **Nature Genetics**, 18: 19-24.

DARVASI, A.; and SOLLER, M. 1995. Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. **Genetics**, 141: 1199-1207.

DOWER, N.A.; STANG, S.L.; BOTTORFF, D.A.; DICKIE, P.; OSTERGAARD, J.C. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. **Nature immunology**, 1(4): 317-321.

DRUET. T.; FRITZ, S.; BOUSSAHA, M.; BEN – JEMAA, S.; GUILLAUME, F.; DERBALA, D.; ZELENKA, D.; LECHNER, D.; CHARON, C.; BOICHARD, D.; GUT, I.V.; EGGEN, A.; GAUTIER, M. 2008. Fine mapping of quantitative trait loci affecting fertility in dairy cattle on BTA 03 using a dense single – nucleotide polymorphism map. **Genetics**, 178: 2227-2235.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D. 1998. Intestinal nematode parasites\ cytokines and efector mechanisms. **International Journal Parasitology**, 28: 1145-1158.

FARNIER, F.; GRISART, B.; COPPIETERS, W.; RIQUET, J.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; KARIM, L.; MNI, M.; MOISIO, S.; SIMON, P.; WAGENAAR, D.; VILKKI, J. & GEORGES, M. 2002. Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. **Genetics**, 161: 275-287.

FERLAZZO , G.; TSANG, M.L. MORRETA, L.; MELIOLE, G.; ET AL. 2002. Human dendritic cell activated resting natural killer (NK) cell and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. **J. Exp. Med**, 195 (3): 343-351.

FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, 96: 434-39.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA/CERNAGEN, 220.

FRIES, R.; EGGEN, A.; WOMACK, J.E. 1993. The bovine genome map. **Mammalian Genome**, 4: 405–428.

FURLONG, J.; DERES, F. 1996. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on feed intake and milk yield of Holstein X Zebu crossbred cows. In: 15 Congresso Panamericano de veterinária. Campo Grande, 1996. **Anais. Campo Grande**,350.

GALLAGHER, D.S.JR.; RYAN, A.M.; DIAMOND, G.; BEVINS, CL.; WOMACK, J.E. 1995. Somatic cell mapping of b-defensin genes to cattle syntenic group U25 and fluorescence in situ localization to chromosome 27. **Mammalian Genome**, 6: 554–556.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. 1997. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to simulate CD4 cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the the tick fixation site. **Parasitology**, 115: 91-96.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L.L.; MARTINEZ, M.L.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; SONSTEGARD, T.S.; REGITANO, C.A. 2007. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosome 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, 38: 453-459.

GEORGES, M.; NIELSEN, D; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R. et al. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, 139: 907-920.

GEORGES, M. 2001. Recent progress in livestock genomics and potencial impact on breeding programs. **Theriogenology**, 55: 15-21.

GEORGES, M. 2007. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, 8: 131-162.

GEORGES, M.; NIELSEN, D; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R.; PASQUINO, A.T. ; SARGEANT, L. S. ; SORENSEN, A. ; STEELE, R. R. ; ZHAO, X.; WOMACK, J. E. AND HOESCHELE, I. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, 139:907–920.

GEORGES, M.; ANDERSSON, L. 2003. Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Springfield, 2003. Springfield: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 68.

GOMES, A.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A.; CURVO, J. B. E. 1989. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Iba-jé and Nellore xEuropean crossbreds in the Brazilian Savanna. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, 21: 20-24.

GONZALES, J.C. 1974. **O carrapato do boi**: vida, resistência e controle. São Paulo: Mestre Jou, 101.

GONZALES, J.C. 1975. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 104.

GOFF, W.L.; STORSET, A.K.; JOHNSON, W.C.; BROWN, W.C. 2006. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response IL-12 containing supernatants from *Babesia bovis* exposed monocyte cultures. **Parasite Immunology**, **28(5)**, 221-228.

GRAPES, L.; DEKKERS, J. C. M.; ROTHSCHILD M. F.; FERNANDO, R. L. 2004. Comparing linkage disequilibrium-based methods for fine mapping quantitative trait loci. **Genetics**, 166: 1561–1570.

GRAPES, L.; FIRAT, M. Z.; DEKKERS, J. C.M.; ROTHSCHILD, M. F.; FERNANDO, R. L. 2006. Optimal haplotype structure for linkage disequilibrium-based fine mapping of quantitative trait loci using identity by descent. **Genetics**, **172**: 1955–1965.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS S. 1990. CRIMAP Documentation version 2.4 St. Louis: Washington University School of Medicine.

GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J.J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRERE, J.M.; COPPIETERS, W.; GEORGES, M. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101**: 2398–403.

GRISART, B., W. COPPIETERS, F. FARNIR, L. KARIM, C. FORD, N. CAMBISANO, M. MNI, S. REID, R. SPELMAN, M. GEORGES, AND R. SNELL. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, **12**: 222–231.

HALLERMAN, E.M.; NAVE, A.; SOLLER, M.; BECKMANN, J.S. 1988. Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphism using homologous and heterologous desoxyribonucleic acid probes. **Journal of Dairy Science**, **71**: 3378-3389.

HAMMOND, K. 1994. Small holder milk recording for developing countries. In: **International committee for animal recording**, 29., Ottawa,. Ottawa: ICAR, 32.

HASTBAKA, J.; DE LA CHAPPELLE, A.; KAITILA, I.; SISTONEN, P.; WEAVER, A.; LANDER, E. 1992. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. **Nature Genetics**, **2**: 204–211.

HAYES, H. 1995. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, **71**: 168–174.

HAYES, H.; ELDUQUE, C.; GAUTIER, M.; SCHIBLER, L.; CRIBIU, E.; EGGEN, A. 2003. Mapping of 195 genes in cattle and updated comparative map with man, mouse, rat and pig. **Cytogenetic Genome Res**, 102:16–24.

HERNANDEZ-LOPEZ, C.; VARAS, A.; SACEDON, R.; JIMENEZ, E.; MUNOZ, J.J.; ZAPATA, A.G.; AND VICENTE, A. 2002. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. **Blood**, **99**: 546–554.

HERRE, J.; WILLMENT, J.A.; GORDON, S.; BROWN, G.D. 2004. The role of Dectin-1 in antifungal immunity. **Crit. Rev. Immunol.** **24**: 193–203.

HOCQUETTE, J.F. 2005. Where are we in genomics? **Journal of physiology and Pharmacology**, **56 (3)**, 37-70.

HOOGSTRAAL, H. AND KIM, K. C. 1985. Tick and mammal coevolution, with emphasis on Haemaphysalis, pp. 505-568. In Kim, K. C., ed. Coevolution of Parasitic Arthropods and Mammals. John Wiley & Sons, New York, xiv + 80.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M. et al. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. **Genome Res.**, **14**: 1987-1998.

ITO, T.; WATANABE, T.; IHARA, N.; MARIANI, P.; BEATTIE, C. W. et al. 2005 A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics**, **85**: 413-424.

JANEWAY, C.A. TAVERS, P.; WALPORT, M. e SHOLMCHIK. 2002. **Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença**, Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

JONSSON, N.N. 1997. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. **Australian Veterinary Journal**, **75(11)**: 802-807.

KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; MCGRAW, R. A.; SONSTEGARD, T. S. et al. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Res.**, **7**: 235-249.

KAPPES S.M.; CORRALES, N.L.L.; HEATON, M.P.; BEATTIE, C.W. 1998. Estimation of genomic coverage and genetic length of the bovine genome, in: **Plant & Animal Genome VI Conference**, January 18–22, San Diego, CA, USA, 298 p.

KABASHIMA, K.; SHIRAISHI, N.; SUGITA, K.; MORI, T.; ONOUE, A.; KOBAYASHI, M.; SAKABE, J.; YOSHIKI, R.; TAMAMURA, H.; FUJII, KAYO INABA, N.; TOKURA, W. 2007. CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. **The American Journal of Pathology**, **171(4)**: 1249-1257.

KEREM, B. S.; ROMENS, J. M.; BUCHANAN, J. A.; MARKIEWICS, D.; COX, T. K.; LEHESJOKI, A.; KOSKINIEMI, J.; NORIO, R.; TIRRITO, S.; SISTONEN, P.; LANDER, E. S.; DE LA CHAPELLE, A. 1993. Localization of the EPM1 gene for progressive myoclonus epilepsy on chromosome 21: linkage disequilibrium allows high resolution mapping. **Human Molecular Genetics**, **2**: 1229–1234.

KEARSEY, M.J. 1998. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). **Journal of Experimental Botany**, **49**: 1619-1623.

KHATIB, H.; ZAITOUM, I.; WEIBELHAUS-FINGER, J.; CHANG, Y.M.; ROSA, G.J.M. 2007. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. **Journal of Dairy Science**, **90**: 2966-2970.

KIM, J.J.; FARNIR, F.; SAVELL, J.; TAYLOR, J.F. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos Taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. **Journal of Animal Science**, **81**:1933-1942.

KUBES, M.; KOCAKOVA, P.; SLOVAK, M.; SLAVIKOVA, M.; et al. 2002. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. **Parasite Immunology**, **24(1)**: 23-28.

KÜHN, C.; BENNEWITZ, J.; REINSCH N.; XU, N.; THOMSEN, H.; LOOFT, C.; BROCKMANN, G.A.; SCHWERIN, M.; WEIMANN, C.; HIENDLEDER, S.; ERHARDT, G.; MEDJUGORAC, I.; FORSTER, M.; BRENIG, B.; REINHARDT, F.; REENTS, R.; RUSS, I.; AVERDUNK, G.; BLUMEL, J.; KALM, E. 2003. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. **Journal of Dairy Science**, **86**: 360-368.

KUIPER, H.; SPOTTER, A.; WILLIAMS, J.L.; DISTL, O.; DROGENMULLER, C. 2005. Physical mapping1 of CHX10, ALDH6A1, and ABCD4 on bovine chromosome 10q34. *Cytogenetic and Genome Research*, **109**: 533C.

LARREGINA, A. T., & FALO, L. D. 2005. Changing paradigms in cutaneousimmunology: Adapting with dendritic cells. *Journal of Investigative.Dermatology*, **124**: 1–12.

LEE, H.; DEKKERS, J. C.; SOLLER, M.; et al. 2002. Application of the false discovery rate to quantitative trait loci interval mapping with multiple trait. **Genetics**, **161**: 905-914.

LEE, S.H; YUN S.; LEE, J.; KIM, M.J.; PIAO, Z.H.; JEONG,M.; CHUNG, J.W.; KIM, T.D.; YOON, S.R.; GREENBERG, P.D.; CHOI, I. 2009. RasGPP1 is required for human NK cell function. **Journal immunology**, **183**: 7931-793.

LEMOS, A.M. 1986. **A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato**. Documento EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, 6, 42p.

LONG, A.D.; LANGLEY, C.H. 1999. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. **Genome Research**, **9**: 720–731.

LEONARD, S.; KHATIB, H.; SCHUTZKUS, V.; CHANG, Y.M.; MALTECCA, C. 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production trait in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, **88**: 4083-4086.

LÓPEZ-CORRALES, N.L.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P. 1998. Comparative gene mapping: cytogenetic localization of PROC, EN1, ALPI, TNP1, and IL1B in cattle and sheep reveals a conserved rearrangement relative to the human genome. **Cytogenetic Cell Genetics**, **83**(1-2): 35-38.

LYNCH, M.; WALSH, B. 1998. **Genetics and analysis of Quantitative Trait**. Massachusetts, Inc. Publishers Sunderland, 980.

MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. 2001. **Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino**. Informe Agropecuário 22, 94-104, 2001.

MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.F. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, **57**(3): 380-389.

MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.S.; TEODORO, R.L.; PIRES, M.F.A.; et al. 2010. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos Taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, **11**: 280.

MACHADO, M.B.B.; ALENCAR, M.M.; PEREIRA, A.P.; OLIVEIRA, H.N.; CASAS, E.; COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genetics and Molecular Biology**, **26**(3):259-265.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.H.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. 1985. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.VIII, 2, 361-75.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.; PEMBERTON, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, **7**: 639-655.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; FERREIRA, A.M. 2000. **Biotecnologia na pecuária: genética molecular**. Informe Agropecuário 21: 67-78.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. 2002. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, Campo Grande, 2002. Anais... Campo Grande.

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. et al. 2004. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: Simpósio nacional da sociedade brasileira de melhoramento animal, 5, Pirassununga, 2004. Anais. Pirassununga:SBMA.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; Nascimento, C.S.; Silva M.V.G.B.; Teodoro, R.L.; Furlong, J.; Prata, M.C.A.; Campos, A.L.; Guimarães M.F.M.; Azevedo, A.L.S.; Pires, M.F.A.; Verneque, R.S. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and molecular Research**, **5**: 513-524.

MCCLURE, M. C.; MORSCI, N. S.; SCHNABEL, R. D.; KIM, J. W.; YAO, P.; ROLF, M. M.; MCKAY, S. D.; GREGG, S. J.; CHAPPLE, R. H.; NORTH CUTT, S. L.; TAYLOR, J. F. 2010. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Animal Genetics*, **41**:597–607.

MEUWISSEN, T. H. E.; GODDARD, M.E. 2000. Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. **Genetics** **155**: 421–430.

MEUWISSEN, T. H. E.; KARLSEN, A.; LIEN, S.; OLSAKER, I.; GODDARD, M. E. 2002. Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. **Genetics**, **161**: 373–379.

MORAES, F.R., COSTA, A.J., WOELZ, C.R. et al. Ecologia de carrapato. XV: Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebrinos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n.1, p.45-53, 1986.

MORETA, A. 2002. Natural killer cell and dendritic cells: rendezvous in abuse tissues. **Nat. Rev. Immunology**, **2 (12)**: 957-964.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N. et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, **410**: 50-56.

MURREL, A.E.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology** **56**, 169-172, 2003.

O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.C. 1987. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in genetically different types of calves in early life. **Journal of Parasitology**, **62(2)**: 312-317.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. 1987. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **22**: 433-438.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. 1990. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, **42(2)**: 127-35.

OLIVEIRA, G.P., ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. 1989. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 24(10): 1267-1271.

OLSEN, W.O. 1974. Parasites: **their life cycles and ecology** (3rd edition). university park place, baltimore.

OLSEN, H. G. LIEN, S.; SVENDSEN, M.; NILSEN, H.; ROSETH, A.; AASLAND OPSAL, M.; MEUWISSEN, T. H. E. 2004. Fine Mapping of Milk Production QTL on BTA6 by Combined Linkage and Linkage Disequilibrium Analysis. **Journal of Dairy Science**, **87**: 690–698.

OLSEN, H.G.; LIEN, S.; GAUTIER, M.; NILSEN, H.; ROSETH, A.; BERG, P.R.; SUNDASAASEN, K.K.; SVENDSEN, M. 2005. Mapping of a milk production quantitative *trait locus* to a 420-kb region on bovine chromosome 6. **Genetics**, **169**: 275–283.

OTT, J. 1992. Strategies for characterization highly polymorphic markers in human gene human. **American journal of human genetics**, **51**: 283-290.

OZAWA, A.; BAND, M.R.; LARSON, J.H.; DONOVAN, J.; GREEN, C.A.; WOMACK, J.E.; LEWIN, H.A. 2000. Comparative organization of cattle chromosome 5 revealed by comparative mapping by annotation and sequence similarity and radiation hybrid mapping. **PNAS**, 97 (8): 4150-4155.

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

PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J.L.; OVILO, C.; COLL, A; FOLCH, J.M.; BABOT, D; ESTANY, J.; OLIVER, M.A.; DIAZ, I.; SANCHEZ, A. 2000. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of animal science* 78: 2525-2531.

PIPER, E.K.; JONSSON, N.N; GONGRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.E.; JACKSON, L.A. 2009. Immunological profiles of Bos Taurus and Bos indicus cattle infested with the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Clinical and vaccine immunology**, **16 (7)**: 1074-1086.

PLASTOW, G.S. Molecular genetics in the swine industry. Anais do Simpósio Nacional de melhoramento Animal 3. Belo Horizonte, MG: SBMA, 21-30, 2000.

PORTO NETO, L.R.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B. E. AND BARENDSE, W. 2010. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Animal Genetics**, **42**: 50-55.

POWELL, R.T. e REID, T.J. 1982. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, 108(6): 279-300.

PROUDFOOT, A. E.; WELLS, T. N.; CLAPHAM, P. R. 1999. Chemokine receptors-future therapeutic targets for HIV? **Biochem. Pharmacol.** **57**: 451-463.

RAULET, D.H.; VANCE, R.E.; MCMAHON, C.W. 2001. Regulation of natural killer host, independent of concurrent infection with *Babesia microti*. **Parasitology**, **19**: 291-330.

REXROAD, C. E.; OWENS, E. K. ; JOHNSON J. S. ; WOMACK, J. E. 2000. A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: Characterization of the centromeric end of chromosome 1. **Anim. Genet.** **31**: 262-265.

RIEK, R.F. 1962. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J.Agric.Res.****13**: 532-552.

RIQUET, J.; COPPIETERS, W.; CAMBISANO, N.; ARRANZ, J.-J. ; BERZI, P.; DAVIS, S. K. ; GRISART, B. ; FARMIR, F. ; KARIM, L. ; MNI, M. ; SIMON, P. ; TAYLOR, J. F. ; VANMANSHOVEN, P. ; WAGENAAR, D. ; WOMACK, J. E. ; AND M. GEORGES. 1999. Identity-by-descent fine-mapping of QTL in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**: 9252–9257.

ROBERTS, J.A. 1968. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 1. Development of ticks on *Bos Taurus*. **Journal Parasitology**, **54**: 663-666.

ROCHA, J.L.; POMP, D.; VLECK, D.V. 2002. QTL analyses in livestock. **Methods in molecular Biology**., 195: 311-346.

ROLSTAD, B.; NAPER, C.; LOVIK, G.; ET AL. 2001. Rat natural killer cell receptor system and recognition of MHC class I molecules. **Immunol. Rev.**, **181**: 149-157.

RON, M.; FELDMESSER, E.; GOLIK, M.; ET AL. 2004. A complete genome scan of the Israeli Holstein population for quantitative trait loci by a daughter design. **Journal of Dairy Science**, **87**:476–90.

RUVINSKY, R.; GRAVES, J.M. 2005. **Mammalian Genomics**. Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: CABI Publishing, p600.

SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSER, J. 2001. Test to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, **95**: 53-62.

SAHANA, G.; LUND, M.S.; VILKKI, J.; ANDERSSON, L.; THOMSEN, B.; FERNANDEZ, A.; HASTINGS, N. 2006. Fine mapping of clinical mastitis QTL on BTA 9 in three Nordic red cattle breeds. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, Belo Horizonte, MG, Brasil.

SCHNABEL, R.D.; KIM, J.J.; ASHWELL, M.S.; SONSTEGARD, T.S.; TASSELL, C.P.V.; CONNOR, E.E.; TAYLOR, J.F. 2005. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102(19)**: 9896-9901.

SEATON, G.; HERNANDEZ, J.; GRUNCHEE, J.A. et al. 2006. Grid QTL: A Grid portal for QTL mapping of compute intensive datasets. In: Proc of the 8th WCGAL, Belo Horizonte, MG, Brasil.

SLATKIN, M. 1999. Disequilibrium mapping of a quantitative trait locus in an expanding population. **American Journal of Human Genetics**, **64**: 1765–1773.

SNELL, R., LAZAROU, L., YOUNGMAN, S., QUARRELL, O., WASMUTH, J., SHAW, D. & HARPER, P. 1989. Linkage disequilibrium in Huntington's disease: an improved localisation for the gene. **Journal of Medical Genetics** **26**: 673–675.

SOLLER, M.; ANDERSSON, L. 1998. Genomic approach to the improvement of disease resistance in farm animals. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** **17**: 329-345.

SOLINAS-TOLDO, S.; LENGAUER, C.; FRIES, R. 1995. Comparative genome map of human and cattle. **Genomics**, **27**: 489–496.

SPELMAN, R.J.; FORD, C.A.; MCELHINNEY, P.; GREGORY, G.C.; SNELL, R.G. 2002. Characterization of the DGAT1 Gene in the New Zealand Dairy Population **Journal Dairy Science**, **85**: 3514–3517.

SUTHERST, R. W.; KERR, J. D.; MAYWALD, G. F.; STEGEMAN, D. A. 1983. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, **34**: 329-339.

SUZUKI, Y.; RAHMAN, M.; AND MITSUYA, H. 2001. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. **J. Immunol.** **167**: 3064–3073.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuclei Acids Research**, **17**: 6563-6571.

THIESEN, W.L. 1979. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminário nacional sobre parasitose dos bovinos, I. Campo Grande, 1979, 207-215, Anais...., Campo Grande.

TIZARD, I. 2004. Veterinary immunology – an introduction. 7 ed. Saunders, Philadelphia.

UTECH, K.B.W., WHARTON, R.H., KERR, D.J. 1978. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal Agricultural Research.**, East Melbourne, **29(4)**: 885-895.

VERÍSSIMO, C.J. 1991. **Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UEP, 170p. (Dissertação- Mestrado em Produção Animal).

VILLARES, J.B. 1941. Climatologia Zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *B. microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, 4(1): 60-79.

ZIMIN, A.V.; DELCHER, A.L.; FLOREA, L.; KELLEY, D.R.; SCHATZ, M.C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; TASSELL, C.P.V.; SONSTEGARD, T.S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.; YORKE, J.A.; SALZBERG, S.L. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos Taurus*. **Genome Biology**, 10 (4): R42.1-R42.10

ZOU, Y.-R.; KOTTMANN, A.H.; KURODA, M.; TANIUCHI, I.; AND LITTMAN, D.R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, 393: 595–599.

WAGLAND, B.M. 1975. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. response of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. **Aust.J.Agric.Res.**, 26: 1073-1078.

WEINER, M.P.; HUDSON, T.J. 2002. Introduction to SNPs: Discovery of markers for disease. **Bio techniques**, 32: S4-S13.

WIKEL, S.K. 1997. Tick host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, 13: 383-389.

WILLCOCKS, S.; YAMAKAWA, Y.; STALKER, A.; COFFEY, T.J.; GOLDAMMER, T.; WERLING, D. 2006. Identification and gene expression of the bovine C type lectin dectin-1. **Veterinary immunology and immunopathology**, 113: 234-242.

WILLIAMS, J. L.; EGGEN, A.; FERRETTI, L.; FARR, C.J.; GAUTIER, M. et al. 2002. A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. **Mamm. Genome** 13: 469-474.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, 110: 43-50.

WOMACK, J. E.; Johnson, J. S. ; Owens, E. K. ; Rexroad C. E ; Schlapfer, J. et al. 1997. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. **Mamm. Genome**, 8: 854-856.

WOMACK, J.E. 2005. Advances in livestock genomics: opening the barn door. **Genome Research**, 15: 1699-1705.

YANG, D.; CHERTOV, O.; BYKOVSKAIA, S.N.; et al. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, 286:525–528.

YOO, J.; STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W. 1994. Linkage analysis of bovine interleukin receptor types I and II (IL-1R I, II). **Mammalian Genome**, 5: 820–821.