

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

GUILHERME LUÍS PEREIRA

**Estudo da associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene
ELTD1 (BTA3) com carga de carrapatos em bovinos da raça Purunã.**

CASTRO

2011

GUILHERME LUÍS PEREIRA

Estudo da associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *ELTD1* (BTA3) com carga de carrapatos em bovinos da raça Purunã.

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de graduação de bacharel de Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Prof. Orientador: Marcelo Ricardo Vicari.

CASTRO

2011

SUMÁRIO

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	8
Avaliação fenotípica da carga de carrapatos.....	8
Análise Molecular.....	8
Análise Estatística.....	10
Resultados e Discussão.....	11
Conclusão.....	19
Referências Bibliográficas.....	20

Estudo da associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *ELTD1* (BTA3) com carga de carrapatos em bovinos da raça Purunã.

Association study of the Single nucleotide polymorphism (SNP) in the *ELTD1* gene (BTA3) from tick-burden in breed Purunã bovine.

Guilherme Luís Pereira,¹ Daniel Perotto,² José Luiz Moletta,² Nilceu Lemos da Silva,² Marcelo Ricardo Vicari.³

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG; Departamento de Zootecnia. Castro – PR, email: guipicoia@hotmail.com.

² IAPAR - Est. Exp. Fazenda Modelo - Caixa Postal 129 - CEP 84001-970 - Ponta Grossa – PR

³ Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG; Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética. Ponta Grossa – PR

Resumo: O carrapato bovino *Rhipicephalus Boophilus microplus* traz enormes prejuízos para bovinocultura mundial e seu controle vem se tornando menos eficaz devido o aumento da resistência aos carrapaticidas. Variantes genéticas em alguns genes têm sido associadas à menor susceptibilidade a carrapatos em bovinos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs43338299 no segundo íntron do gene *ELTD1* com infestação por carrapatos em bovinos de corte da raça Purunã. Para isto, foram desenhados *primers* para a amplificação desta região do gene *ELTD1* por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir da biblioteca *BTAU4*. O SNP foi situado no cromossomo 3, base 70214859, substituição A → G. Foram utilizadas no experimento 127 fêmeas de bovinos de corte do composto racial Purunã desenvolvida na Estação Experimental, Fazenda Modelo, do IAPAR em Ponta Grossa – PR. As contagens de carrapatos foram realizadas do ano de 2004 ao ano de 2009. Os dados analisados mostraram não haver relação do SNP rs43338299 para infestação por carrapatos nas 127 fêmeas analisadas. No entanto para um grupo de 11 animais da 2ª geração do composto racial Purunã, houve associação significativa ($P < 0,0001$) do genótipo favorável com a carga de carrapatos. Ainda para grupo dos animais avaliados no ano de 2009 também houve associação significativa ($P < 0,05$) do genótipo, no entanto desfavorável, com a infestação por carrapatos. A análise conjunta de correlação para as 127 fêmeas não foram significativas ($r = -0,06$), e o tamanho do efeito estimado do genótipo para fenótipo em questão foi $r^2 = 0,4\%$. Embora preliminares estes dados mostraram uma associação do SNP rs43338299 ao fenótipo em um dos grupos genéticos geração/touros e aponta para a necessidade de um maior N amostral de contemporâneos e a utilização de outros marcadores SNPs para o gene *ELTD1* e para outros genes associados à resistência aos carrapatos.

Palavras chave: PCR-RFLP, *Rhipicephalus microplus*, *ELTD1*, Gado de Corte.

Abstract: The cattle tick *Rhipicephalus Boophilus microplus* promotes a huge loss to cattle worldwide and its control has become less effective due to increased resistance to acaricides. Genetic variants in some genes have been associated with susceptibility decrease to ticks in cattle. This study aimed to evaluate the association of single nucleotide polymorphism (SNP) rs43338299 in the second intron of the gene *ELTD1* with tick infestation in beef cattle. For this, primers were designed to amplify this gene region *ELTD1* by Polymerase Chain Reaction (PCR) from the library BTAU4. The SNP was located on the chromosome 3, base 70214859, substitution A → G. In this experiment were used 127 female cattle of the Purunã breed, developed at the Fazenda Experimental Modelo IAPAR - in Ponta Grossa city, - Paraná State. The counts of ticks occurred among the years 2004 to 2009. No one association between the SNP rs43338299 for and ticks infestation in the 127 females analyzed was observed. However, in the 2nd generation of the Purunã breed, one group of the 11 animals showed association significant ($P < 0.0001$) in relation to a genotype with the tick burden. In a group of animals analyzed in the year 2009 was found an unfavorable significant association ($P < 0.05$) genotype AA with the tick burden. The correlation analysis for the 127 females not showed significant results ($r = -0.06$) and the size of the estimated effect of genotype to phenotype in question was $r^2 = 0.4\%$. Although preliminary, these data showed an association of the SNP rs43338299 with the phenotype in a genetic group generation / bulls. These results evidence to the need for a greater N value between contemporary group and the testing to other markers SNPs *ELTD1* and other genes associated with resistance to ticks.

Keywords: PCR-RFLP, *Rhipicephalus microplus*, *ELTD1*, Beef Cattle.

Introdução

A distribuição do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o carrapato bovino, se estende por todo território nacional, com limite ao sul no paralelo 32°, que corta o extremo sul do Rio Grande do Sul (GONZALES, 1974). Carrapatos são parasitas hematófagos, pertencentes à classe *Arachnidae*, separado em duas famílias principais Argasidae, ou carrapatos moles, e Ixodidae, ou carrapatos duros o qual pertencia o gênero *Boophilus*, que foi incorporado ao gênero *Rhipicephalus* (BOWMAN, 2006; HORAK *et al.*, 2006). O carrapato bovino é responsável por grandes danos aos rebanhos, como doenças infecciosas e fatores como perda de sangue, dor, tumefação das feridas pelas picadas, infecções secundárias, miíases e a absorção de toxinas (BOWMAN, 2009). O carrapato juntamente com berne interferem na qualidade do couro dos bovinos (MARQUES *et al.*, 2000). O controle de carrapatos baseia-se amplamente no uso de acaricidas químicos. No início foram utilizados arsênicos no controle de carrapatos, posteriormente na década de 1940, foi substituída por organofosforados, aplicados por banho de imersão total ou sob a forma de *spray*, ducha ou *spot-on* (URQUHART, 1996). Por estes fatores se tem dado uma grande importância às estratégias de controle de carrapatos, que segundo Grisi *et al.* (2002) trazem um prejuízo a bovinocultura nacional estimado em R\$ 3,5 bilhões por ano.

A alta resistência natural de bovinos a infestações por carrapatos parece ser um caráter hereditário, a seleção de animais resistentes e o cruzamento entre raças européias e zebuínas como formas de controle têm sido investigadas para reduzir populações de carrapatos em rebanhos bovinos (URQUHART, 1996). O gado bovino indiano tem características morfo-fisiológicas adaptadas ao clima quente, apresenta grande rusticidade e tolerância ao calor suportando bem moléstias parasitárias nos trópicos, o que não é encontrado em raças bovinas de origem européia pura (JARDIM, 1991). Tais características podem também ser encontradas em bovinos de origem européia adaptadas ao clima tropical. Esses animais foram trazidos durante a colonização européia e passaram por um longo período de seleção natural, desenvolvendo características adaptativas

importantes como resistência ao calor e ectoparasitas. (SILVA *et al.*, 2000; BIANCHINI *et al.*, 2006). O composto racial Purunã é formado pelos grupos Charolês (41%), Angus (25%), Caracu (25%) e Zebu (9%), trazendo características de precocidade, rusticidade, fertilidade, rápido ganho de peso e, portanto, qualidade de carne ao composto (IAPAR, 2009). A raça Purunã tem em sua constituição além de raças Caracu e Canchim, raças que visam a qualidade de carne com precocidade e rendimento de carcaça como angus e Canchim, respectivamente (MOLETTA & PEROTTO, 2005). A raça Caracu tem sua utilização preconizada por rusticidade, adaptabilidade aos trópicos e indícios de resistência a ectoparasitas (QUINTINO *et al.*, 2004), porém animais da raça Caracu foram mais tardios, com maior deposição de tecido muscular, menor deposição de gordura e menor proporção de traseiro especial quando comparados a raças zebuínas também conhecidas por sua adaptabilidade e rusticidade (VITTORI *et al.*, 2006). A raça Canchim criada no interior Paulista tem em sua constituição $\frac{5}{8}$ (68,5%) da raça Charolês e $\frac{3}{8}$ de raças Zebuínas (ALENCAR, 1994), conferindo ao Purunã 9% de raças Zebuínas, onde o Canchim entra com 25% da composição da raça Purunã.

O princípio da utilização de marcadores moleculares é baseado na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, algumas vezes, diferenças fenotípicas. Entre algumas vantagens de marcadores moleculares, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente. (FALEIRO, 2007). Porto Neto *et al.*, (2010) analisaram o efeito de 2 SNPs (rs29019302 e rs29019303) previamente associado com infestação por carrapatos ($P > 0,0001$) por Baradense (2007), no segundo íntron do gene *ELTD1* (*EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1*) no BTA3 e um adicional de 17 SNP's em uma grande amostra de bovinos, encontrando associação significativa de 3 SNP's com resistência a carrapatos, onde o SNP rs43338299 foi significativamente associado com resistência aos carrapatos ($P > 0,05$). Neste cenário o objetivo deste trabalho foi testar associação do SNP rs43338299 do gene *ELTD1* (BTA3) por meio do marcador PCR-RFLP

(*Polimease chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) com a resistência a carrapatos em fêmeas bovinas de corte do composto racial Purunã.

Material e Métodos

Avaliação fenotípica da carga de carrapatos

A contagem de carrapatos entre os anos de 2004 a 2009 foi realizada em novilhas nascidas no ano anterior ao início contagem e substituídas a cada anos, sendo contabilizada uma observação por mês, provenientes da média de duas observações mensais. A contagem de carrapatos a cada ano teve início ao fim da primavera estendendo-se até o princípio inverno do ano seguinte. Foram contabilizados carrapatos de todo lado esquerdo de cada animal, com tamanho igual ou superior a 4,5mm até 8mm de comprimento, seguindo os procedimentos descritos por Wharton e Utech (1970). Durante o ano todo, as fêmeas que participaram das contagens permaneceram em pastagem de *hemártria altíssima*, cultivar Flórida com suplementação, dois kg de concentrado (15% de PB e 70% de NDT) por animal/dia. As fêmeas foram mantidas sob infestação natural de carrapatos com controle durante as épocas de maior infestação (>150 carrapatos/animal em média), sendo realizados de um a dois controles com carrapaticida durante o ano. As novilhas avaliadas a cada ano pertenciam ao mesmo grupo de manejo (grupos contemporâneos) a cada ano de avaliação.

Análise molecular

Foi coletado 4ml sangue periférico das 127 novilhas de corte Purunã submetidas a contagem de carrapatos utilizando tubos a vácuo de 4ml contendo EDTA e K₃ e agulhas para tubos a vácuo de 8mm x 25mm. A extração do DNA genômico foi realizada a partir do protocolo de extração de DNA de leucócitos, segundo (REGITANO, 2001). Foi realizada a quantificação do DNA extraído, utilizando 2 µL do produto da extração de DNA com posterior análise de integridade em gel de agarose 0,8%. A análise do SNP rs43338299 A→G (posição cromossomo 3, 70214859, biblioteca BTAU4) do gene *ELTD1* foi realizada pela técnica de PCR-RFLP (HINGORANI & BROWN, 1995).

Os oligonucleotídeos *sense* rs43338299 *primer Forward (F)*: 5' GCCAGCATTAACACAGAAAG 3' e *antisense* rs43338299 *primer Reverse (R)*: 5' GTTTAGAGGAACGTATGAGCTAGG 3' foram desenhados nos flancos da região do SNP rs43338299 para a amplificação de um fragmento de tamanho esperado de 505pb. A reação de PCR consistiu de 20 ngDNA molde, 1x *Taq*DNA polimerase tampão, 2mM MgCl₂, 40 μM dNTPs, 2 μM de cada primer e 0,05 U/μL *Taq*DNA polimerase sob as seguintes condições: (1x) 94 °C 5 min; (35x) 90 °C 1 min, 58°C45 s, 72 °C 30 s, e (1x) 72 °C 5 min.O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, o fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Hin*III (5'...CATG↓.3'), de acordo com instruções do fabricante (Fermentas), e os resultados das clivagens foram analisados em gel de agarose 3%. Com a presença de uma Guanina (G) ao invés de uma Adenosina (A) há o reconhecimento do sítio de restrição pela enzima *Hin*III, gerando dois fragmentos, um com 144pb e outro com 361pb, em um fragmento previamente amplificado pelo método PCR (Figura 1). A genotipagem dos alelos AA (505 pares de bases), AG (505 pares de bases, 361 pares de bases e 144 pares de bases) e GG (361 pares de bases e 144 pares de bases) foi determinada de acordo com o padrão de bandas visualizadas no gel de agarose 3%.

Figura 1 - Esquema representativo do sítio de restrição da enzima *Hin*III em um fragmento de 505 pares de base (pb), produto da PCR.

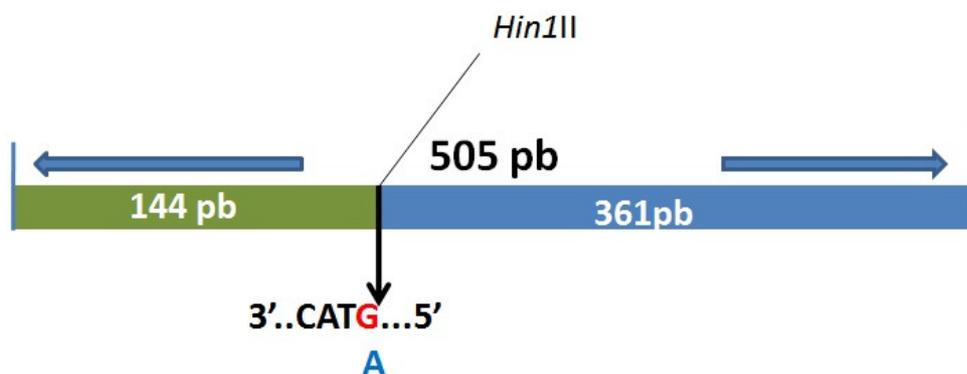


Tabela 1- Descrição dos *Primers* . (F) *Forward*, (R) *Reverse* (Tm) temperatura melting, (GC) guanina e timina % e (bp) pares de base. Fragmento amplificado com 505pb. Em realce grifado, sítio de restrição para o polimorfismo analisado. Fragmento sublinhado, possível sítio que por mutação T → A, geraria a banda de 450 pb visualizada no gel.

	Tamanho	Tm	GC
<i>Primer F</i> 5'GCCAGCATTAAACACAGAAAG 3'	20bp	56.1°C	45.0 %
<i>Primer R</i> 5'GTTTAGAGGAACGTATGAGCTAGG 3'	24 bp	57.8°C	45.8 %

Fragmento amplificado

GCCAGCATTAAACACAGAAAGTGAGCTGCTGCTGCTAAGTCAGTTAATAATATGCCAAAA
 TTAGCACAGAAAATGAGATAACTAGAGTAAAGGAATTCACCTTCATTCAATAATTATTT
 AAAGAATTTCTTCTGTTTTAAATATTTATAAAAAGATAAACGGTATTCAGTTTTAGAGTAA
 AACTAAGGGGCCTGTATGACCCTCTAGTTAAATGGAATGATTAATATACAGAACTGTA
 TGGAAGACACATTGGTTCATTGATTTACAGACTAGGACAGTGTGACCCTGTTTCATTTAGGT
 TTCTAGGAAAGTTTACAGGACTCATTTTTGGATATCCTTTCTAAAGTCCATCCATCTTAC
CATA/GAGAGAATCCAGTTATCTCTCCCGTTATAGCAGCAAGAGTAAAAAATAATTC
 AGGGAACACTTTCCATTTCTTAGAGAAAGTATGTTTGTATTTTTTCTGTTTTTCAG
 ATAATTCCTAGCTCATAACGTTCCCTCTAAAC

Fonte: adaptado de Baradense (2007)

Análise estatística

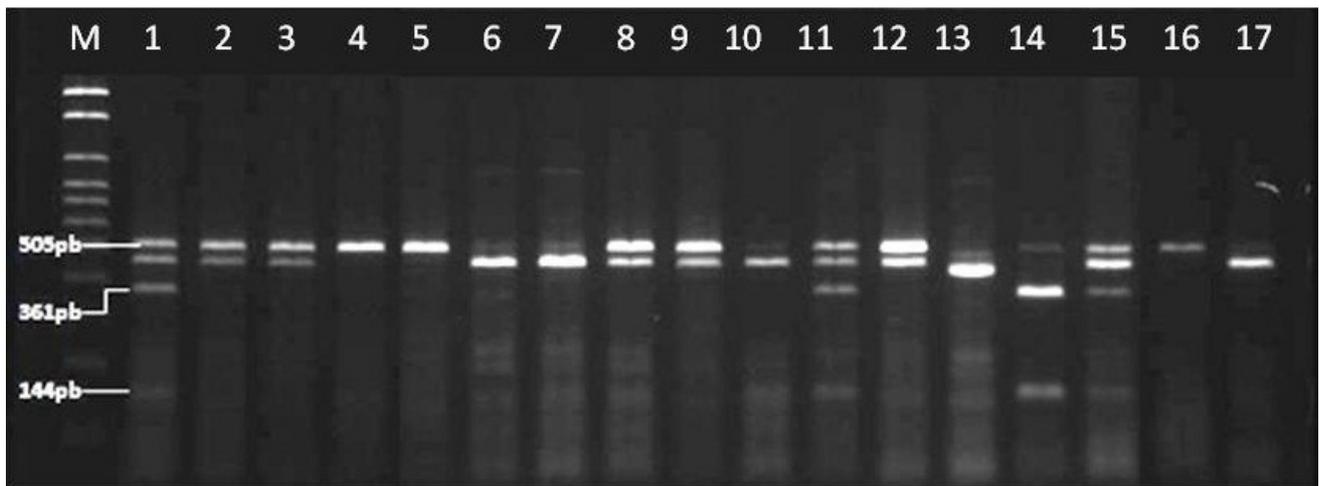
Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS, 1993). Foram utilizadas, análise da variância; teste de médias; correlação e regressão linear. A análise foi conduzida com o grupo geral, composto pelas 127 fêmeas Purunã; com os animais subdivididos em nove grupos genéticos (a saber: E, F, G, H, I, J, K, L e P) e; por ano de geração de amostragem da carga de carrapatos (2004, 2005, 2006, 2007, 2008 e 2009). A análise de variância foi gerada pelo método GLM. A correlação foi analisada entre os três possíveis genótipos (AA, AG e GG) com a média de carrapatos para os animais. O teste de Duncan foi utilizado para verificação das médias de

carrapatos em cada genótipo. A regressão linear foi avaliada com os genótipos sobre a contagem dos carrapatos usando a fórmula geral $y = a+bx$ onde: y - é a contagem de carrapatos; a - é valor intercepto; b é o fator de regressão; x - é o genótipo, onde foram considerados para os genótipos os valores 1(AA), 0(AB) e -1(GG).

Resultados e Discussão

Estudos de associação de marcadores genéticos moleculares à resistência a carrapatos já tem sido realizados em gado (ACOSTA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2006; UNTALAN *et al.*, 2007; GASPARIN *et al.*, 2007; REGITANO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010; PORTO NETO *et al.*, 2011). A maior parte destes estudos associam esta resistência a marcadores moleculares no sistema de histocompatibilidade principal - MHC bovino - (STEAR *et al.*, 1989, 1990), antígenos linfocíticos bovinos (ACOSTA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2006; UNTALAN *et al.*, 2007) e a um *Quantitative trait loci* (QTL) presente no cromossomo 6 (REGITANO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010). Recentemente, Porto Neto *et al.* (2011) associaram polimorfismos (SNPs) presentes no gene *ELTD1* à resistência aos carrapatos. Por sua vez, o composto racial Purunã é dito possuir características de precocidade, rusticidade, fertilidade, rápido ganho de peso e qualidade de carne (IAPAR, 2009). Neste estudo foram avaliadas 127 fêmeas Purunã para a associação do SNP rs43338299 (BTA3) ao fenótipo contagem de carrapatos. Os genótipos obtidos podem ser analisados na Figura 2, além dos genótipos descritos é possível verificar a ocorrência de uma banda em torno de 450 pb. Essa banda é decorrente a um possível sítio restrição para *HinIII* ao fim do produto amplificado. Este alelo 450 pb não foi considerado nesta análise.

Figura 2- Padrão de bandas do produto da clivagem pela enzima *HinIII* aplicada em gel de agarose. Genótipos gerados: AA (505pb): 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,12, 13, 16 e 17; AG (505pb, 361pb, 144pb): 1, 11 e 15; GG (161pb, 144pb): 14.



Neste estudo foram avaliadas 127 fêmeas Purunã para a associação do SNP rs43338299 (BTA3) ao fenótipo contagem de carrapatos. A análise de variância conjunta das 127 fêmeas não apresentou diferenças significativas (tabela 2). Ainda, estes animais foram alocados em dois grupos: grupo ano da contagem dos carrapatos e grupo genético geração/touros. Entre os grupos analisados por ano de contagem (2004 a 2009) não foram encontradas diferenças significativas para a análise de variância, exceto para o grupo avaliado em 2009 ($<0,05$) (tabela 3). Da mesma forma, para a análise dos grupos genéticos geração/touros a análise de variância mostrou diferença significativa ($<0,0001$) somente para o grupo L (tabela 4).

Tabela 2- Análise de variância das 127 fêmeas quanto à contagem de carrapatos.

	Análise de variância conjunta		
	G.L.	QM	F
Genótipo	2	463,206	0,7586ns
Resíduo	124	1672,953	
Média	50,80		
C.V. (%)	80,49		

** significativo $P<0,01$, *significativo $P<0,05$, ns não significativo.

Tabela 3 – Análise de variância por ano de contagem de carrapatos.

	G.L.	QM	F	Média	C.V. (%)
Ano 2004	1	48,434	0.0826ns	10,16	32,91
	6	11,186			
Ano 2005	1	6,176	0.2978ns	8,36	23,58
	9	5,057			
Ano 2006	1	138,379	0.8308ns	96,10	56,13
	13	2910,934			
Ano 2007	2	82,180	0.8528ns	57,50	39,24
	12	509,279			
Ano 2008	2	2237,203	0.0758ns	89,64	31,23
	26	783,881			
Ano 2009	2	389,344	0.0309*	28,07	36,28
	46	103,761			

** significativo P<0,01, *significativo P<0,05, ns não significativo

Tabela 4 – Análise de variância por gerações.

	G.L.	QM	F	Média	C.V. (%)	
Grupo E	Genótipo	1	3350,713	0,1521ns	47,96	78,41
	Resíduo	11	1414,851			
Grupo F	Genótipo	2	223,664	0,8663ns	48,23	82,79
	Resíduo	7	1594,501			
Grupo G	Genótipo	2	854,880	0,1537ns	79,55	19,03
	Resíduo	3	229,307			
Grupo H	Genótipo	1	457,277	0,7681ns	76,48	88,58
	Resíduo	4	4590,594			
Grupo I	Genótipo	1	1037,973	0,5393ns	47,81	107,08
	Resíduo	14	2621,531			
Grupo J	Genótipo	1	2876,922	0,2299ns	39,71	107,15
	Resíduo	13	1810,684			
Grupo K	Genótipo	2	613,436	0,7463ns	52,82	85,08
	Resíduo	8	2020,453			
Grupo L	Genótipo	2	12129,703	<0,0001**	51,78	37,32
	Resíduo	9	373,657			
Grupo P	Genótipo	1	1932,984	0,1623ns	48,61	63,39
	Resíduo	36	949,895			

** significativo P<0,01, *significativo P<0,05, ns não significativo

O teste de médias realizado em conjunto para os 127 animais não apresentou diferenças significativas entre os genótipos (AA, AG e GG) obtidos (tabela 5). Embora não significativa esta análise evidenciou uma menor taxa de carrapatos para o genótipo AA (49,1), seguido de AG (54,683) e GG (57,297 carrapatos). Estes valores estão de acordo com o esperado para o genótipo AA e corrobora os resultados encontrados por Porto Neto *et al.* (2011). Também não foram encontradas diferenças significativas para as médias de contagem de carrapatos por genótipo entre os nos grupos ano da contagem (tabela 6). Por sua vez, o teste de médias nos grupos genéticos geração/touros mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) para o grupo L (tabela 7). No grupo L o genótipo AA apresentou médias de carrapatos de (26,38), AG (141,08) e GG (101,83), no entanto, algum cuidado com o N amostral ainda é necessário.

Tabela 5 – Teste de médias para cada genótipo dos 127 animais analisados.

Genótipos	Médias	Desvio Padrão
AA	49,100 ^a	±37,496
AG	54,683 ^a	±49,565
GG	57,297 ^a	±35,098

Para letras minúsculas diferem na mesma coluna com significância $P < 0,05$.

Tabela 6 – Teste de médias por ano de contagem.

Genótipos	Número de carrapatos por contagem anual					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
AA	9.230 ^a	8.718 ^a	97.30 ^a	58.03 ^a	81.08 ^a	30.836 ^a
AG	16.670 ^a	6.775 ^a	88.37 ^a	50.46 ^a	105.28 ^a	22.576 ^a
GG				65.36 ^a	72.17 ^a	19.500 ^a

Para letras minúsculas diferem na mesma coluna com significância $P < 0,05$.

Tabela 7- Teste de médias por geração de animais.

Genótipos	Número de carrapatos por grupo								
	E	F	G	H	I	J	K	L	P
AA	54.81 ^a	40.72 ^a	85.21 ^a	85.21 ^a	43.16 ^a	32.79 ^a	56.74 ^a	26.38 ^b	53.17 ^a
AG	10.32 ^a	49.13 ^a	94.00 ^a	67.75 ^a	61.77 ^a	67.41 ^a	55.29 ^a	141.08 ^a	37.44 ^a
GG		65.36 ^a	42.50 ^a				19.50 ^a	101.83 ^a	

Para letras minúsculas diferem na mesma coluna com significância $P < 0,05$.

Não foi encontrada correlação significativa entre genótipo e número de carrapatos contados ($r = -0,065$) para análise conjunta dos 127 animais (tabela 8). Entre os grupos de ano de contagem de carrapatos foi observada uma correlação positiva ($< 0,01$) para os animais avaliados em 2009 (tabela 9). Por sua vez, entre os grupos genéticos geração/touros foi observada uma alta correlação negativa ($< 0,01$) para número de carrapatos e genótipo no grupo L (Tabela 10). A correlação positiva para ano 2009 e negativa para o grupo L é explicada por não haver similaridade dos genótipos favoráveis entre os dois grupos, a qual, também foi representada pelo teste de médias. De maneira similar, na averiguação da inter-relação da carga de carrapatos e componentes de produção de leite em vacas taurinas Turner *et al.*, (2007) encontraram baixa correlação ($r = \leq 0,10$) entre genótipo e carga de carrapatos e alta correlação para genótipo e fenótipos de produção leiteira ($r = 0,66$), tal resultado se deve aos genes estudados estarem associados principalmente a produção de leite e seus componentes.

Tabela 8- Correlação do genótipo com numero de carrapatos contados nos 127 animais.

Genótipo	Numero de Carrapatos	
		-0,065

Tabela 9- Análise de correlação por ano de contagem.

	Contagem (número de carrapatos) por ano					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Genótipo	-0.64743	0.34564	0.06036	-0.00914	-0.19315	0.36950**
	0.0826	0.2978	0.8308	0.9742	0.3154	0.0090

** significativo P<0,01.

Tabela 10 – Análise de correlação por geração de Purunã.

	Grupos de Animais (contagem de carrapatos)								
	E	F	G	H	I	J	K	L	P
Genótipo	0.4209	-0.0513	0.6514	0.1558	-0.1658	-0.3300	0.1981	-0.7761**	0.2313
	0.1521	0.8880	0.1611	0.7681	0.5393	0.2296	0.5593	0.0030	0.1623

** significativo P<0,01.

O SNP rs43338299 tem um pequeno tamanho de efeito sobre a infestação por carrapatos $r^2=0,004$ abaixo do encontrado por Porto Neto *et al.* (2011) . Um SNP isolado ou até mesmo haplótipos tem mostrado pequeno efeito sobre a resistência a carrapatos variando de $r^2 = 0,005$ a $r^2 = 0,012$, em grandes amostras (Porto Neto *et al.*, 2010, 2011). Neste estudo não foi considerado o tamanho do efeito residual nos grupos significativamente associados ($r^2=0,13$ e $r^2=0,60$), (tabelas 11 e 12), devido ao baixo número de animais amostrados, o que pode superestimar o resultado. Em um amplo mapeamento do genoma para detecção de QTL's, por marcadores microssatélites, foram encontrados marcadores significativos ($P<0,01$; $P<0,05$ e $P<0,10$) em diferentes estações e diferentes cromossomos (REGITANO *et al.*, 2008). O tamanho de efeito estimado para esses QTL's foi de $r^2=1,7\%$ a $r^2=6,20\%$, onde os autores concluíram que há predominância de efeitos não aditivos e uma forte interação entre muitos loci para a característica avaliada (REGITANO *et al.*, 2008).

Tabela 11- Regressão Linear por geração de Purunã

Grupo	Equação de regressão Linear	R ²
E	$y=10,31+44,49x$	0,1772
F	$y=49,53-02,60x$	0,0026
G	$y=71,03+17,05x$	0,4244
H	$y=67,75+17,46x$	0,0243
I	$y=61,76-18,60x$	0,0275
J	$y=67,41-34,62x$	0,1089
K	$y=47,36+14,01x$	0,0392
L	$y=91,59-59,71x$ **	0,6025
P	$y=37,44+15,72x$	0,0535

Tabela 12 – Regressão Linear por ano de contagem.

Ano de contagem	Equação de regressão Linear	R ²
2004	$y=16,67-07,44x$	0,4192
2005	$y=06,77+01,94x$	0,1195
2006	$y=88,36+08,93x$	0,0036
2007	$y=57,74-0,326x$	0,0001
2008	$y=94,02-09,08x$	0,0373
2009	$y=23,10+07,60x$ **	0,1365

O fato do grupo L apresentar baixa contagem de carrapatos no genótipo AA pode estar ligado a uma configuração favorável no gene *ELTD1*, que além do SNP avaliado pode apresentar outros SNP's favoráveis, em possível desequilíbrio de ligação. Além desta hipótese, o grupo L pode apresentar uma ampla combinação de variantes favoráveis entre os vários genes associados a resistência a carrapatos, constituindo um grupo de animais com maior rusticidade. Esta hipótese é possível devido ao fato do grupo L ter sido constituído a partir de dois touros, os quais, devido ao acaso, poderiam apresentar maior resistência a carrapatos. Por outro lado, o grupo que foi avaliado no ano 2009, apresentou o genótipo AA, associado a uma maior carga de carrapatos. Este fato pode ser

explicado devido a associação SNP rs43338299 a outros SNPs no gene *ELTD1* e, a outros genes desfavoráveis. Nesta região do gene *ELTD1* foram encontrados outros dois SNPs (rs43338300 e 43338303) relacionados com sobrecarga de carrapatos (PORTO NETO *et al.*, 2011). O SNP rs43338300 é ligado e com alto desequilíbrio de ligação (*LD*) ao SNP rs43338299. Estes SNPs constituem um haplótipo de 3-locos favorável à resistência a carrapatos após correção pelo teste Bonferroni. Ainda, este haplótipo está associado a outro haplótipo de 9-locos também significativo após correção por Bonferroni à resistência a carrapatos (PORTO NETO *et al.*, 2011).

O gene *ELTD1* (BTA3) não está diretamente relacionado com o sistema imune e a primeira vista não é gene candidato a associação com grau de infestação por carrapatos. Este gene se expressa no endotélio vascular onde têm sido observadas diferentes reações quanto a infestações por carrapatos em bovinos, no entanto, não foram observadas diferenças quanto à expressão deste gene (WALLGARD *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007; PIPER *et al.*, 2008, 2010). Em varreduras genômicas por marcadores microssatélites não houve associação de QTL's, no cromossomo BTA3, à infestação por carrapatos (MACHADO *et al.*, 2010; GASPARIN *et al.*, 2007; REGITANO *et al.*, 2008). Em uma meta-análise, combinando resultados obtidos em estudos de expressão gênica (GES) e estudo amplo do genoma (GWAS) (SNP), entre os dez genes mais fortemente associado ao fenótipo em questão, Porto Neto *et al.* (2011) encontraram um possível gene candidato (*MFSD2A*) localizado no BTA3, mesmo cromossomo do gene *ELTD1*. No entanto, não é conhecida a possível associação deste gene *MFSD2A* e *ELTD1* em estudos de resistência aos carrapatos.

Desta forma, neste estudo foi realizada uma avaliação do SNP rs43338299 à possível resistência aos carrapatos no composto racial Purunã. Foi encontrada uma associação significativa para o grupo genético geração/touros L. No entanto, não foi possível afirmar ao certo se a associação do SNP rs43338299 no grupo L foi ao acaso ou se este SNP está em *LD* com alguns outros SNPs e outros genes e QTLs para resistência aos carrapatos.

Conclusão

O SNP rs43338299 não foi significativamente associado a infestações por carrapatos na amostra total avaliada. No entanto, o SNP rs43338299 no grupo contemporâneo de 2009 ($P < 0,05$) (desfavorável) e no grupo genético L ($P < 0,001$) (favorável) foi associado com a carga de carrapatos em bovinos de corte. Embora preliminares estes dados mostraram uma associação do SNP rs43338299 ao fenótipo e aponta para a necessidade de um maior N amostral de contemporâneos e a utilização de outros marcadores SNPs para o gene *ELTD1* e para outros genes associados à resistência aos carrapatos. Deste modo, é possível afirmar que a utilização de um quadro de marcadores moleculares e estudos de expressão gênica para a resistência aos carrapatos podem ser extremamente úteis na identificação de matrizes e para o melhoramento desta característica em gado.

Referências Bibliográficas:

- ACOSTA-RODRIGUEZ R., ALONSO-MORALES R., BALLADARES S., AGUILAR-FLORES H., GARCIA-VAZQUEZ Z., GORODEZKY C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Veterinary Parasitology* v. 127, p. 313-321, 2005.
- ALENCAR M.M. de. Utilização de touros Canchim em cruzamento commercial. EMBRAPA-CPPSE. 20p. 1994.
- BARADENSE W. Assessing tick resistance in a bovine animal for selecting cattle for tick resistance by providing a nucleic acid from the bovine animal and assaying for the occurrence of a single nucleotide polymorphism (SNP). Patent application WO2007051248-A1, p1–146, 2007.
- BIACHINI E., MCMANUS C., LUCCI C. M., FERNANDES M. C. B., PRESCOTT E., MARIANTE A. da S. e EGITO A. A. do. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. *Pesquisa agropecuária Brasileira* v. 41, p.1443-1448, 2006.
- BOWMAN, D. D. et al. tradução Cid figueiredo e Thais H. Bitencourt Figueiredo. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. Edição 8, 2006.
- FALEIRO, F. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. *Embrapa Cerrados* p. 102, 2007.
- GASPARIN G., MIYATA M., COUTINHO L.L., MARTINEZ M.L., TEODORO.L., FURLONG J., MACHADO M.A., SILVA M., SONSTEGARD T.S., REGITANO L.C.A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics* v. 38, p. 453–459, 2007.
- GONZALES, J.C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: Editora Mestre Jou. 1974.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*. Porto Alegre n. 21, p. 8-10, 2002.
- HORAK I.G., CAMICAS J.L., KEIRANS, J .E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology* v. 28, p. 27-54, 2002.
- IAPAR-INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. Pesquisadores do IAPAR apresentam o Purunã em Cascavel. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/noticias/article.php?storyid=675>. Acesso em: 30 de out. de 2011.
- JARDIM, W. R. Curso de bovinocultura. 4 ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola p. 12-14, 1991.
- MACHADO M.A., AZEVEDO A.L., TEODORO R.L. et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). *BMC Genomics* v. 11, p. 280, 2010.

- MARQUES, F.A.C.; YAMURA, M.H.; VIDOTTO, O. Lesões no couro bovino causadas pelos principais ectoparasitas nas regiões Noroeste do Estado do Paraná e Sudoeste do Estado do Mato grosso. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina n. 1, v. 21, p. 33-39, 2000.
- MARTINEZ M.L., MACHADO M.A., NASCIMENTO C.S. et al. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genetics and Molecular Research* v. 5, p. 513–524, 2006.
- MOLETTA, J.L.; PEROTTO, D. Características de carcaça de bovinos bi e quadrimestiços produzidos em dois sistemas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. Campo Grande: SBZ, 2005.
- PIPER E.K., JACKSON L.A., BIELEFELDT-OHMANN H., GONDRO C., LEW-TABOR A.E., JONSSON N.N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology* v. 40, p. 431–441, 2010.
- PIPER E.K., JACKSON L.A., BAGNALL N.H., KONGSUWAM K.K., LEW A.E., JONSSON N.N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* v. 126, p. 110–119, 2008.
- PORTO NETO L.R., BUNCH R. J, HARRINSON B.E., PRAYAGA K.C., BARADENSE W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. *BMC Genetics* v. 11, p. 55, 2010.
- PORTO NETO L.R., BUNCH R. J., HARRINSON B.E., BARADENSE W. DNA variation in the gene *ELTD1* is associated with tick burden in cattle. *Animal Genetics* v. 42, p. 50-55, 2011.
- PORTO NETO L.R., PIPER E. K., JONSSON. N. N., BARADENSE W., GONFRO C. Meta-analysis of Genome Wide Association and Gene Expression Studies to Identify Candidate Genes for Tick Burden in Cattle. In: Georg Erhardt, Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany p. 1-6, 2011.
- QUINTINO H.P., FERRAZ J.B.S., ELER J.P., MATTOS E.C., FIGUEIREDO L.G.G., BALEIRO J.C.C., PENTEADO I. Estudo da tendência genética e fenotípica para bovinos da raça Caracu. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga- São Paulo. Julho de 2004.
- REGITANO L.C.A., IBELLI A.M.G., GASPARIN G. et al. On the search for markers of tick resistance in bovines. *Animal Genomics for Animal Health* p. 225–230, 2008.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Embrapa Informação Tecnológica p.183-184, 2001.
- SAS. *User's Guide*, Version 6, Cary, NC: SAS Institute Inc.1993.
- SILVA, R.G. *Introdução à bioclimatologia animal*. Nobel, São Paulo, p. 286, 2000.
- TURNER L.B., HARRINSON B.E., BUNCH R.J., PORTO NETO L.R., Li Y.T., BARADENSE W. A genome wide association study of tick burden and milk composition in cattle. *Animal Production Science* v. 50, p. 235–245, 2010.

- UNTALAN P.M., PRUETT J.H., STEELMAN C.D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Veterinary Parasitology* v. 145, p. 190–195, 2007.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. Trad. QUINTANILHA, A.M.N.P. *Parasitologia veterinária* v. 2, p. 218-220, 1996.
- VITTORI A., QUEIROZ A.G. de, RESENDE F.D. de, GESUALDI JÚNIOR A., ALLEONI G.F., RAZOOK A.G., FIGUEIREDO A. de, GESUALDI A.C.L.S. Características de carcaça de bovinos de diferentes grupos genéticos, castrados e não-castrados, em fase de terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.35, n.5, p.2085-2092. 2006.
- WALLGARD E., LARSSON E., He L.Q., HELLSTROM M., ARMULIK A., NISANCIOGLU M.H., GENOVE G., LINDAHL P., BETSHOLTZ C. Identification of a core set of 58 gene transcripts with broad and specific expression in the microvasculature. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* v. 28, p. 1469–1476, 2008.
- WANG Y.H., RERVERTER A., KEMP D., McWILLIAM S.M., INGHAM A., DAVIS C.K., MOORE R.J., LEHNERT S.A. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. *Australian Journal of Experimental Agriculture* v. 47, p. 1397, 2007.
- WHARTON R. H., UTEC K. B. W. The Relation between Engorgement and dropping of *Boophilus Microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of ticks number on cattle. *Australian Journal of Entomology* v. 9, p. 171-182, 1970.