

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**MAPEAMENTO DE QTL NOS CROMOSSOMOS 24 E 29 PARA MEDIDAS DE
PESO, RESISTÊNCIA A CARRAPATO E ESTRESSE TÉRMICO EM UMA
POPULAÇÃO F₂ (GIR X HOLANDÊS)**

MARCELO CERVINI

SÃO CARLOS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

MAPEAMENTO DE QTL NOS CROMOSSOMOS 24 E 29 PARA MEDIDAS DE PESO, RESISTÊNCIA A CARRAPATO E ESTRESSE TÉRMICO EM UMA POPULAÇÃO F₂ (GIR X HOLANDÊS)

MARCELO CERVINI

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

São Carlos – SP

2009

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

C419mq

Cervini, Marcelo.

Mapeamento de QTL nos cromossomos 24 e 29 para medidas de peso, resistência a carrapato e estresse térmico em uma população F₂ (Gir X Holandês) / Marcelo Cervini. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
86 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

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

CDD: 591.15 (20^a)

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

MAPEAMENTO DE QTL NOS CROMOSSOMOS 24 E 29 PARA MEDIDAS DE PESO,
RESISTÊNCIA A CARRAPATO E ESTRESSE TÉRMICO EM UMA POPULAÇÃO F₂
(GIR X HOLANDÊS)

Tese de Doutorado de Marcelo Cervini

Banca Examinadora

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge do Amaral

Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira



Handwritten signatures of the five members of the examining committee, each written over a horizontal dotted line.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

**Dedico esse trabalho aos meus pais, Jurandir e Lucia,
por serem pessoas especiais, por sempre acreditarem em mim
e por possibilitarem que eu seguisse o caminho que desejasse.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Jurandir e Lucia, por sempre me proporcionarem toda a estrutura possível para que eu pudesse seguir buscando meus objetivos, sempre me apoiando e comemorando em todos os momentos da minha vida. Pessoas especiais, que acima de tudo, me ensinaram a respeitar as pessoas e não abrir mão de meus objetivos. Agradeço também a toda minha família, que cada vez cresce mais... (Dá-le Pri!!).

Agradeço a Má, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando só falo em "QTL". Obrigado por ser uma pessoa incrível, que simplesmente é a melhor companhia para todas as situações, e agora, por fazendo parte de minha família! A nossa família! Muito bom ficar com você! Ainda mais na casinha! Beijo e me liga!!

Agradeço imensamente a professora e amiga Luciana. Sempre a admirei como pesquisadora, mas não imaginava o quanto especial seria o convívio dentro de seu ambiente de trabalho. Sempre sorridente e solícita, mesmo se estiver carregando o mundo em suas costas. Sou extremamente grato a você, não só pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou, nem também por ter aceito ser minha orientadora, mas principalmente por ser uma pessoa incrível, com um coração gigantesco e caráter íntegro. Obrigado Luciana!

Agradeço também ao Dr. Gustavo Gasparin, por ter sido extremamente prestativo em todos os momentos do desenvolvimento desse projeto, sempre me ajudando e tirando minhas dúvidas ao longo do projeto.

Agradeço a todos os pesquisadores da Embrapa Gado de Leite envolvidos nesse projeto, em especial ao Prof. Marco Antônio e a pesquisadora Ana Luisa, os quais tive maior contato, pela ótima recepção e importante auxílio para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço a Embrapa Pecuária Sudeste e a todos seus pesquisadores e funcionários, por ter permitido a realização do projeto.

Muito obrigado a todos os alunos do Laboratório de Biotecnologia Animal, Dri, Gisele, Poly, João, Suelen e o grande Giba, entre outros tanto que ainda estão ou já passaram pelo laboratório, por serem pessoas importantes tanto dentro como fora do trabalho. Muito obrigado pelas oportunidades e momentos descontraídos que tivemos... mas não vamos para por aqui não.....

Agradeço ao Programa de Pós graduação em Genética e Evolução, assim como o Departamento de Genética e Evolução, por esse convívio de 7 anos, anos esses fundamentais para minha formação. Agradeço a todos os professores, funcionários e alunos do departamento, sem esquecer a Greissi e Regiane, as pessoas que mais devo ter dado trabalho em todo esse período.

Agradeço a CAPES, pelo período inicial da bolsa de doutorado.

Agradeço também ao laboratório de Imunogenética, em nome da Professora Norma Mortari, Pedro, Vanessa, Terumi, Sá, Regina e todos os outros funcionários, pelo convívio ao longo de todo esse tempo no Departamento.

Agradeço aos inúmeros amigos que passaram pelo Departamento ao longo desse período, Alce, Ervilha, Cabeça, Fefe, Artur, Helinho, Artur, Gaúcho, Fernanda (Cabocrinha), Lucy, Claudio, entre muitos outros..... E aos que ainda permanecem por aqui, como Aninha, Paulinho, Ratinho, Sono, Euclides, entre muitos outros.....

Agradeço a Rê, ex-companheira de rep., e claro, sua sombra, a grande Focolina...beijo pra vocês.....

Amigos e amigos!! Muito Obrigado! Faltará folha para descrevê-los todos! Tim-tim!

Resumo

Nos últimos anos, o Brasil tornou-se um dos principais países produtores e exportadores de produtos de origem animal. Melhorias nas condições sanitárias e pesquisas em melhoramento animal são alguns dos fatores que levaram o Brasil a essa posição de destaque. Entretanto, dificuldades no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e no manejo do rebanho em situações de estresse térmico prejudicam o maior desenvolvimento da produção nacional. Uma parte significativa da variação dessas características quantitativas são controladas por vários genes (*Quantitative Trait Loci* - QTL). A identificação desses locos que influenciam essas características é de grande importância para o melhoramento genético. Esse trabalho teve como objetivo identificar e mapear QTL nos cromossomos 24 e 29 para resistência ao carrapato, tolerância ao estresse térmico e para medidas de crescimento em uma população F2 (Gir x Holandês), utilizando a metodologia de varredura cromossômica por microssatélites. Nenhum QTL para contagem de carrapatos foi identificado. No cromossomo 24, foi identificado um indicativo de QTL ($P < 0,10$) para peso ao nascimento. No cromossomo 29, identificamos QTL para taxa de sudação ($P < 0,01$) e frequência respiratória ($P < 0,05$), além de um QTL sugestivo ($P < 0,05$) dentro de uma família para peso padronizado à desmama. Os resultados obtidos poderão auxiliar no conhecimento geral dos fatores que influenciam as características avaliadas, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de seleção mais eficientes para as condições ambientais encontradas nos sistemas de produção brasileiros.

Abstract

In the latest years, Brazil became one of the most important countries regarding the production and exportation of animal-based food. Improvements on the sanitary conditions and animal research applied to animal production were some of the elements which have placed Brazil in this highlight position. However, difficulties on controlling the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and herd management limitations concerning heat stress situations hamper a greater development on the national production. A significant part of the variation on these traits is controlled by many genes (*Quantitative Trait Loci - QTL*). The identification of loci influencing these traits is important for genetic improvement programs. The objective of this study was to identify and map QTL for tick resistance and heat stress tolerance in the chromosomes 24 and 29, as well as QTL related to growth traits in a F2 population (Gir x Holstein) by using the microsatellites scan methodology. No QTL was identified for the tick number found. However, on chromosome 24, an indicative QTL ($P < 0.10$) for birth weight was identified. On chromosome 29, significant QTL for sweating rate ($P < 0.01$) and respiration frequency ($P < 0.05$) were also recognized. In addition, a suggestive QTL ($P < 0.05$) for standardized weaning weight was found in chromosome 29 in one of the families. These results could help to improve the knowledge about the general factors affecting the evaluated traits, making possible the development of more efficient selection strategies for the environment conditions in the Brazilian production systems.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Figura ilustrativa de algumas diferenças morfológicas entre animais <i>Bos p. indicus</i> (A - Nelore) e <i>Bos p. taurus</i> (B - Angus)...	3
FIGURA 2:	Principais raças de bovinos na produção de leite no Brasil. A – Raça Holandesa; B- Raça Gir; C- Raça Girolando.....	9
FIGURA 3:	Produção brasileira de leite. Figura retirada da página (http://www.milkpoint.com.br). Fonte: IBGE.....	11
FIGURA 4:	Imagens do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . A. macho (esquerda) e fêmea (direita); B. Fêmea ingurgitada.....	13
FIGURA 5:	Esquema do delineamento F2. Figura retirada do livro <i>Biologia Molecular Aplicada ao melhoramento animal</i> , pg 66.....	25
FIGURA 6:	QTLs descritos no cromossomo 24 dos bovinos. Linha vermelha: posição do QTL no cromossomo; BD: <i>Body Depth</i> ; BFCI: <i>Body form composite index</i> ; CALEASE: <i>Calving Ease</i> ; CHDPT: <i>Chest depth</i> ; FCR: <i>Feed conversioin ratio</i> ; RFI: <i>Residual feed intake</i> ; STR: <i>Strenght</i> ; UA: <i>Udder attachment</i> ; UCI: <i>Udder composite index</i> ; UDPTH: <i>Udder depht</i> . Dados retirados do banco de dados de QTL de bovinos (http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb).....	27
FIGURA 7:	QTLs descritos no cromossomo 29 dos bovinos. Linha vermelha: posição do QTL no cromossomo; BW: <i>Birth weight</i> ; BWC: <i>Birth weight at castration</i> ; CWT: <i>Carcass weight</i> ; FANG: <i>Foot angle</i> ; FY: <i>Fat Yield</i> ; MSPD: <i>Milking speed</i> ; MY: <i>Milk yield</i> ; PREGRATE: <i>Pregnancy rate</i> ; PTV: <i>Paired testis volume</i> ; PTW: <i>Paired testis weight</i> ; PUBAGE: <i>Age at puberty</i> ; PY: <i>Protein yield</i> ; SCS: <i>Somatic cell score</i> ; SOUND: <i>Structure soundness</i> ; TEND: <i>Tenderness</i> ; TPL: <i>Teat placement</i> ; TWIN: <i>Twinning</i> ; UA: <i>Udder attachment</i> ; UCI: <i>Udder composite index</i> ; WWT: <i>weaning weight</i> ; YIELD: <i>Retail product yield</i> . Dados retirados do banco de dados de QTL de bovinos (http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb).....	27
FIGURA 8:	Delineamento experimental para a obtenção da geração F2. Touros Holandeses cruzados com vacas Gir (geração parental – P), originando população F1. Cruzamento entre indivíduos da geração F1, gerando animais na geração F2.....	32
FIGURA 9:	Mapa de ligação referência utilizado com os respectivos locos e	

	sua distância (cM) ao longo dos cromossomos 24 e 29.....	39
FIGURA 10:	Localização e distância (cM) dos locos de microssatélites nos cromossomos 24 e 29. Os valores à esquerda de cada cromossomo são do mapa referência (MARC) e os valores à direita, do mapa EMBRAPA.....	48
FIGURA 11:	Distribuição da estatística F na localização do QTL para PPD (131 cM) na família 4 encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$	55
FIGURA 12:	: Distribuição da estatística F na localização do QTL para taxa de sudação (72 cM) encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$ e a linha superior $P < 0,01$	69
FIGURA 13:	Distribuição da estatística F na localização do QTL para movimento respiratório (68 cM) encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$ e a linha superior $P < 0,01$	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Principais QTLs descritos em bovinos. Dados retirados do cattleQTLdatabase (http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb).....	25
TABELA 2:	Características dos marcadores utilizados.....	38
TABELA 3:	Número de alelos (n), heterozigosidade esperada (H_e) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) dos 11 marcadores.....	45
TABELA 4:	Número de meioses informativas e a posição dos marcadores nos cromossomos 24 e 29 obtidos no mapa EMBRAPA e no mapa referência (MARC).....	48
TABELA 5:	Análise de variância (valores de F) dos efeitos sexo e ano/estação sobre as medidas de peso, utilizando o programa SAS (2002).....	49
TABELA 6:	Média dos quadrados mínimos das medidas de peso avaliadas. Ano/estação: ano/estação (01-setembro, outubro, novembro; 02-dezembro, janeiro, fevereiro; 03- março, abril, maio; 04- junho, julho, agosto).....	49
TABELA 7:	Maior valor observado na estatística F para as medidas: Peso ao nascimento (PN), Peso padronizado a desmama (PPD), Peso padronizado a 180 dias (PP ₁₈₀) e Peso padronizado a um ano (PP ₃₆₅) e seus respectivos valores críticos de significância ($P < 0,10^*$, $P < 0,05^{**}$ e $P < 0,01^{***}$) para as avaliações no cromossomo 24 e 29.....	51
TABELA 8:	Estatística F para as características de crescimento dentro das famílias que compõem a população estudada. $^*(P < 0,10)$; $^{**}(P < 0,05)$	54
TABELA 9:	Frequência observada da cor e tipo de pelo da população F2 estudada. Cor do pelo (1 = totalmente clara; 2 = predominância clara; 3 = predominância escura; 4 = totalmente escura); Tipo do pelo (1= curto e liso; 2=curto e lanado; 3= comprido e liso; 4= comprido e lanado).....	57
TABELA 10:	Análise de variância dos efeitos ambientais sobre a característica contagem de carrapatos, utilizando o programa SAS (2002). As fontes de variação significativas foram incluídas no modelo de análise do QTL.....	58

TABELA 11	Maior valor observado na estatística F para as características: \log_{10_chuva} e \log_{10_seca} . A: Efeito aditivo; A+D: efeito aditivo + dominante e valores críticos para $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$	59
TABELA 12	Média e desvio-padrão (DP) das características do pêlo nos animais avaliados na estação das chuvas e da seca....	64
TABELA 13	Média e desvio padrão (DP) dos parâmetros fisiológicos avaliados na população. Os valores de taxa de sudação são referentes apenas as estações chuva/seca. Temperatura retal e Temperatura da pele ($^{\circ}\text{C}$); Movimentos respiratórios (n° de movimentos/minutos); Taxa de sudação ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$).....	65
TABELA 14	. Análise de variância das medidas de Estresse térmico. Δ Temperatura Retal, Δ Movimento Respiratório e taxa de sudação.....	67
TABELA 15	Valores da estatística F e seus respectivos valores de P obtidos para as características Δ Movimento respiratório, Δ Temperatura retal e taxa de sudação nos cromossomos 24 e 29. Os valores críticos do teste F para os níveis de significância de 10 %, 5% e 1% são indicados nas colunas $P<0,05$ e $P<0,01$, respectivamente.....	68
TABELA 16	Valores de efeito aditivo e efeito do QTL observados.....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Sistemática e Nomenclatura.....	2
2.2 Origem e Domesticação.....	3
2.3 Bovinos no Brasil.....	6
2.3.1 Raça Holandesa.....	7
2.3.2 Raça Gir.....	8
2.3.3 Girolando.....	10
2.4 Produção de Leite no Brasil.....	10
2.5 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
2.5.1 Classificação.....	13
2.5.2 Ciclo de Vida.....	13
2.5.3 Resposta dos bovinos à infestação pelo carrapato.....	15
2.6 Estresse térmico.....	16
2.6.1 Genes relacionados à morfologia e cor do pêlo.....	18
2.6.1.1 Comprimento do pêlo.....	18
2.6.1.2 Cor da pelagem.....	18
2.6.2 Genes relacionados à resposta celular ao estresse.....	19
2.7 Marcadores moleculares.....	21
2.8 Detecção e mapeamento de QTL.....	22
2.9 QTL identificados em bovinos.....	24
2.9.1 QTL para características de crescimento.....	26
2.9.2 QTL para resistência ao carrapato.....	28
2.9.3 QTL para tolerância ao estresse térmico.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
4. Material e métodos.....	31
4.1 Delineamento experimental.....	31

4.2 Coleta dos dados fenotípicos.....	31
4.2.1 Medidas de crescimento.....	31
4.2.2 Avaliação da resistência genética ao carrapato <i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus) microplus</i>	34
4.2.3 Avaliação do estresse térmico.....	35
4.3 Extração do DNA.....	39
4.4 Reações de amplificação dos microssatélites.....	40
4.5 Análise dos genótipos.....	40
4.6 Estimativas da variabilidade dos microssatélites.....	41
4.7 Mapa de ligação.....	41
4.8 Identificação dos QTLs.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Marcadores moleculares.....	44
5.2 Mapas de ligação.....	45
5.3 Medidas de crescimento.....	49
5.4 Resistência ao carrapato.....	56
5.5 Estresse térmico.....	62
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. Introdução

Nos últimos anos, o Brasil vem se destacando como um dos maiores criadores de bovinos do mundo, explorando o potencial produtivo desses animais. Desde 2003, o Brasil é o maior exportador de carne bovina, com cerca de 2 milhões de toneladas vendidas para mais de 120 países. Na produção de leite e derivados, o Brasil também é um dos grandes produtores, exportando cerca de 145 milhões de toneladas desses produtos. Entretanto, o país ainda enfrenta alguns problemas na produção, como menor qualidade dos produtos e grandes perdas na produção. Isso se deve, em parte, a ação do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e ao estresse térmico nos sistemas de produção.

A biologia molecular aplicada à bovinocultura tem auxiliado no aumento da produção de toda a cadeia produtiva relacionada, fato esse evidenciado pelas avaliações genéticas já disponíveis aos criadores no direcionamento de acasalamentos com maior desempenho em características produtivas. A identificação de marcadores moleculares permite estudos de associação entre os marcadores e características de interesse, possibilitando uma maior acurácia na determinação de pedigrees e a identificação de regiões que controlam características quantitativas (QTL), como as características de crescimento. Nos estudos de QTL, utiliza-se o conhecimento das interações entre os marcadores e os fenótipos de interesse e do mapa de ligação da região estudada, em delineamentos específicos para determinado estudo.

Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo identificar e mapear QTLs por meio de varredura nos cromossomos 24 e 29 para características de crescimento,

resistência a carrapato e tolerância ao estresse térmico em uma população experimental F2 (Gir x Holandês).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Sistemática e Nomenclatura

Os bovinos são classificados como pertencentes a classe *Mammalia*, subclasse *Ungulata*, ordem *Artiodactyla*, subordem *Ruminantia*, infraordem Pecora, família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, tribo *Bovini*. Na tribo *Bovini*, são reconhecidos os gêneros *Bison* (bisão americano, bisão europeu), *Bubalus* (búfalo asiático, búfalo dos pântanos), *Syncerus* (búfalo africano) e *Bos* (laque, gayal e bovinos domésticos). Existe muita discussão com relação a nomenclatura utilizada para as espécies do gênero *Bos* (RITZ *et al.* 2000; KIKKAWA *et al.* 2003), principalmente referente a nomenclatura dos bovinos domesticados. De acordo com a nomenclatura proposta por Linnaeus (1758), os bovinos são classificados em duas diferentes espécies: *Bos taurus*, bovinos das raças de origem europeia, as quais não apresentam o “cupim” e *Bos indicus*, bovinos das raças asiáticas e africanas que apresentam o “cupim” (Figura1). Entretanto, apesar de existir inúmeras diferenças morfológicas (presença/ausências de cupim; tamanho da barbela), fisiológicas (diferença na tolerância ao estresse térmico), na estrutura do cromossomo Y (GOLDAMMER *et al.*, 1997) e variação na seqüência de algumas regiões do DNA (MARTINS *et al.*, 2008), esses dois grandes grupos não possuem isolamento reprodutivo entre eles, característica esta fundamental na definição de diferentes espécies no conceito biológico. Dessa forma, alguns autores consideram esse dois

grupos como sendo sub-espécies (HIENDLEDER *et al.*, 2008). As principais nomenclaturas utilizadas para os bovinos são: *Bos taurus taurus* (antigo *Bos taurus*)

e *Bos taurus indicus* (antigo *Bos indicus*) ou *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus* (HIENDLEDER *et al*, 2008). Apesar dessa possível modificação da nomenclatura, ainda é aceita a proposta por Linnaeus (1758).

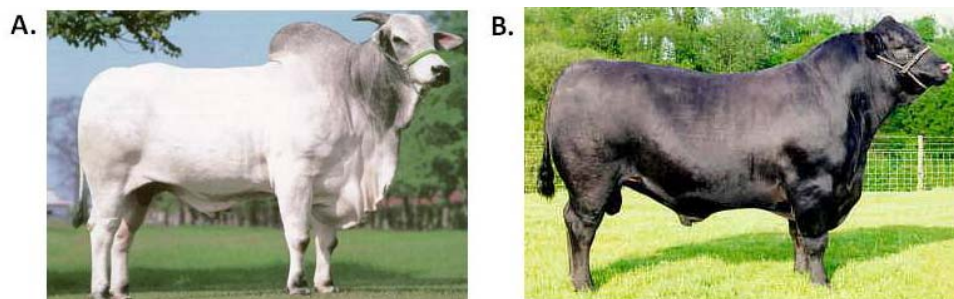


Figura 1. Figura ilustrativa de algumas diferenças morfológicas entre animais *Bos p. indicus* (A - Nelore) e *Bos p. taurus* (B - Angus).

Nesse trabalho, utilizaremos *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus* em substituição a terminologia *Bos taurus* e *Bos indicus*, respectivamente.

2.2 Origem e Domesticação

O processo de domesticação do gado selvagem foi de grande importância para o desenvolvimento da população humana. Os animais domesticados representavam uma importante fonte de carne, leite, pele e força de trabalho. De acordo com estudos arqueológicos (EPSTEIN & MASON, 1984; PAYNE, 1991), acredita-se que todos os bovinos atuais, com exceção do gado de Bali e do gado Mithan, originaram-se de um ancestral comum, o auroque (*Bos primigenius*). Esses animais, extintos a mais de 2000 anos nas regiões onde ocorriam, tiveram seu último representante vivo em 1627, em um zoológico europeu. Segundo Epstein & Mason (1984), esses animais distribuíam-se por toda Europa, nordeste da África e sudeste da Ásia, sendo divididos em 3 raças continentais: *Bos*

primigenius namandicus (Ásia), *Bos primigenius opisthonomus* (África) e *Bos primigenius primigenius* (Europa).

Apesar das evidências de que o centro da evolução dos auroques foi a Ásia, inúmeros estudos estão sendo realizados com a finalidade de se entender sobre o processo de domesticação dos bovinos. Análises do registro fóssil indicam que os bovinos foram domesticados a partir da espécie *Bos p. primigenius*, cerca de 10 mil anos atrás. Além disso, um único evento de domesticação teria ocorrido, originando as primeiras raças de bovinos taurinos. As raças zebuínas teriam sido originadas posteriormente, a partir das raças taurinas (LOFTUS *et al.*, 1994).

Os primeiros estudos de origem e domesticação dos bovinos que utilizaram técnicas de biologia molecular como ferramenta de análise de regiões informativas do DNA são do início da década de 90. Loftus *et al.* (1994), analisaram seqüências de DNA mitocondrial de diferentes raças de bovinos: seis raças taurinas européias, três raças zebuínas indianas e quatro raças africanas (3 taurinas e 1 zebuína). Após alinhamento e comparação das seqüências, Loftus agrupou as raças taurinas européias e todas as raças africanas em um mesmo grupo, separado das raças indianas. Dessa forma, descreveram a possibilidade de ter ocorrido dois processos distintos de domesticação, diferente da hipótese aceita na época. O segundo evento de domesticação teria ocorrido a partir de auroques *Bos p. namandicus*, originando bovinos de raças zebuínas de origem indiana atuais. O tempo estimado de separação entre os *Bos p. taurus* e *Bos p. indicus* (origem indiana) foi de 210 mil anos.

Bradley *et al.* (1996), analisando seqüências de DNA mitocondrial de treze raças de bovinos, também observaram a divergência entre os animais de origem indiana com os animais de origem européia/africana. O tempo de divergência estimado entre eles foi de 117-275 mil anos, e de 22-26 mil anos entre as raças européias e africanas.

Apesar de existirem estudos que indicaram a divergência entre animais de origem indiana dos demais grupos (europeu e africano), uma grande dúvida ainda permanecia sobre a origem do gado africano, já que esses animais apresentam características fenotípicas de raças zebuínas da Índia e haplótipos típicos de taurinos. MacHugh *et al.* (1997), utilizando análises de marcadores microssatélites em diferentes raças de bovinos, observou uma freqüência diferente de alguns dos alelos desses locos entre taurinos e zebuínos, sendo alguns desses alelos taurino-específicos e zebuínio-específico. A utilização da análise de marcadores microssatélites permitiu uma abordagem geral sobre a possível origem dos animais na África, já que as análises de DNA mitocondrial e de polimorfismos do cromossomo Y são de heranças específicas de cada um dos sexos. A associação das análises de marcadores nucleares (microssatélites) com análises de DNA mitocondrial e de polimorfismos no cromossomo Y indicam que a distribuição inicial dos bovinos da África eram de origem européia (indicado pelas análises de DNA mitocondrial). Porém, ao longo do tempo, ocorreram algumas introgressões de machos zebuínos (verificado nos estudos de polimorfismo do cromossomo Y), provavelmente por serem animais mais resistentes a parasitas. Esse posterior fluxo gênico mediado pelos machos na África também foram verificados por Bradley *et al.*, (1998); Hannotte *et al.*, (2000).

Gotherstrom *et al* (2005) sugerem que a diversidade genética dos animais domesticados na Europa também tenha sido aumentada devido ao cruzamento de fêmeas domesticadas com auroques selvagens que co-habitavam a Europa, o que torna o processo de domesticação mais complexo do que vem sendo proposto. Essa hipótese de introgressão de material genético de auroques selvagens sugerido por Gotherstrom *et al* (2005) não foi verificada em análises de SNP no cromossomo Y por Bollongino *et al* (2005).

Embora ainda exista muita discussão sobre a domesticação e nomenclatura dos bovinos, estima-se que hoje exista mais de 800 raças de bovinos distribuídos em todo o mundo (FRIES & RUVINSKY, 1999). Esses animais apresentam diferenças em todos os níveis (genético, imunológico, fisiológico, reprodutivo, etc). Essa variabilidade entre as raças é de grande importância no manejo dos bovinos nos diferentes ambientes em que estão distribuídos.

2.3 Bovinos no Brasil

Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Brasil possui hoje cerca de 210 milhões de bovinos, distribuídos em todos os estados da Federação. A grande parte desses animais são *Bos p indicus*, os quais se adaptaram perfeitamente ao clima brasileiro.

O grande número de animais existentes associado com o maior cuidado sanitário do rebanho nacional, fez com que o Brasil fosse reconhecido internacionalmente como um importante produtor de carne, leite e derivados, tendo esses produtos uma grande importância na economia brasileira. Segundo a ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne), o Brasil

é o maior exportador de carne do mundo desde 2003, exportando em 2008 mais de 1.3 bilhões de toneladas de carne para mais de 120 países.

Na produção de leite e derivados, o Brasil produziu cerca de 22 milhões de toneladas. No mercado de exportação, o Brasil exportou, em 2008, cerca de 100 mil toneladas de leite e derivados, para mais de 100 países (MAPA, 2008).

O cruzamento de animais de diferentes raças possibilita a união de características produtivas importantes, refletindo diretamente nos programas de melhoramento animal. O grande volume de produção de carne e leite no Brasil deve-se a adaptabilidade dos animais as condições climáticas e do manejo realizado. Na bovinocultura de leite, a rusticidade de raças zebuínas associadas a alta produção de raças taurinas permite que haja uma elevada produção, mesmo em condições não ideais. Um exemplo da potencialização na produção é a realização de cruzamentos de animais com maior rusticidade e resistência a parasitas, como o gado Gir (*Bos p. indicus*) com animais de alta produção de leite, como animais da raça Holandesa (*Bos p. taurus*).

2.3.1 Raça Holandesa

A raça holandesa (*Bos p. taurus*) é uma das principais raças utilizadas em sistemas de produção de leite (Figura 2 – A). Não existem registros do surgimento da raça. Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (ABCBRH – www.gadoholandes.com.br), estima-se que a raça teve sua origem na Grécia, devido a ilustrações rupestres encontradas em cavernas da região. Estima-se que a domesticação tenha ocorrido cerca de 2000 A.C, nas terras planas e pantanosas da Holanda setentrional, da Frísia (Países Baixos) e Frísia oriental (Alemanha). Desde sua domesticação até os dias atuais, várias epidemias

(anos:1170, 1714, 1744, 1768-1782) dizimaram milhares de populações de bovinos dessa raça, sendo o gado holandês moderno originário dos países baixos, formado na metade do século XVIII. Nessa época, inúmeros animais começaram a ser exportados para vários países do mundo, inclusive para os EUA. O Holstein (como é chamado nos EUA) representa 80% de todo gado leiteiro americano, e 65% de todo o rebanho (ABCBRH, 2008).

Não existem registros da entrada do gado Holandês no Brasil. Segundo a ABCBRH, acredita-se que o gado holandês tenha chegado ao Brasil nos anos de 1530 e 1535. Apresentam as características raciais: Malhadas de preto-branco ou vermelho branco; ventre e vassoura da cauda branca. Barbela e umbigueira pouco pronunciada, dorso reto, garupa comprida, entre outras (ABCBRH, 2008).

2.3.2 Raça Gir

Os bovinos da raça Gir (*Bos p. indicus*) são animais de origem indiana, localizados na península Gir, em Kathawar (Figura 2 - B). Os primeiros registros de importações desses animais da Índia para o Brasil são do início do século XIX, sendo a boa adaptabilidade ao clima brasileiro e sua rusticidade as principais características que despertaram o interesse dos fazendeiros brasileiros na criação desses animais. As importações de gado indiano foram permitidas até 1964, sendo a peste bovina o principal fator para a proibição da importação direta desses animais da Índia pelo Brasil (SANTIAGO, 1986).

O gado Gir é considerado de dupla aptidão, sendo importante na indústria de corte e de leite. Possuem características importantes para a produção de leite no clima Brasileiro, como maior resistência ao carrapato e maior tolerância as variações de temperatura quando comparado a raças de origem européias. De

acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o gado da raça Gir é o segundo maior zebuínio com registros genealógicos realizados nas associações de criadores, correspondendo com cerca de 8% do



Figura 2. Principais raças de bovinos na produção de leite no Brasil. A – Raça Holandesa; B- Raça Gir; C- Raça Girolando

total dos registros, atrás do gado Nelore, principal raça zebuína brasileira, com mais de 80% do total de registros.

Os animais devem ter as características raciais: perfil convexo e ultra-convexo, testa proeminente, com chifres laterais freqüentemente retorcidos, barbela desenvolvida e com pelagens das mais variadas, podendo apresentar pêlos brancos, vermelhos, amarelos e pretos em combinações variadas (Figura 2 - B).

Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Gir leiteiro, a produção média do Gir leiteiro é de 12 Kg/dia (3.777 Kg/ 305 dias), três vezes mais que a média nacional (960 Kg/305 dias). A possibilidade de cruzamentos de animais Gir com raças européias (Holandês, Jersey e Pardo-Suiço) é uma estratégia muito utilizada pelos produtores de leite e derivados no Brasil. Os animais oriundos do cruzamento Gir x Holandês são muito produtivos no clima brasileiro, levando ao desenvolvimento de uma nova raça derivada desse cruzamento, o girolando (Figura 2-C).

2.3.3 Girolando

Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (GIROLANDO), a origem do gado Girolando (Figura 2 - C) é descrita na década de 40, proliferando desde então a todas as regiões brasileiras. Possui boa capacidade de auto-regulação da temperatura corpórea e habilidade materna. Além disso, possui características morfológicas e fisiológicas ideais para a produção em climas tropicais, como boa capacidade e suporte de úberes, alta produtividade e eficiência reprodutiva.

Por apresentarem essas características importantes na produção de leite, em 1989, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, juntamente com a associação de criadores, determinaram os padrões raciais da raça Girolando, sendo o padrão racial bi-mestiço (5/8 Hol + 3/8 Gir) o padrão esperado para a raça.

De acordo com a GIROLANDO, a média de produção leiteira da raça Girolando por lactação é de 3.600Kg (duas ordenhas/dia) em 305 dias, com 4% de gordura, acumulando uma produção vitalícia de 20.000Kg de leite, iniciando normalmente aos 30 meses de idade. O período médio de lactação é de 280 dias.

2.4 Produção de Leite no Brasil

A cadeia produtiva do leite brasileiro vem se desenvolvendo anualmente, tanto no aumento da produção quanto na melhoria da qualidade do leite. Pressionado pela exigência do mercado externo por leite de boa qualidade, os produtores

brasileiros começaram a intensificar recursos e pesquisa em busca da melhoria na qualidade dos produtos produzidos.

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o crescimento médio anual na captação de leite no Brasil é de aproximadamente 6% ao ano (calculado pela média dos últimos 10 anos), sendo que, de 2007 a 2008, houve um aumento na captação de 7,5%. Em 2007, o Brasil produziu mais de 25 bilhões de litros de leite. A evolução da produção brasileira nos últimos anos pode ser visualizada na Figura 3.

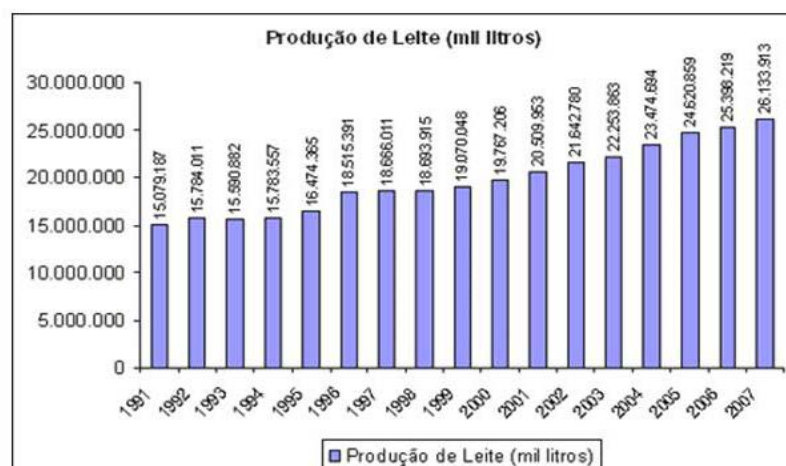


Figura 3: Produção brasileira de leite. Figura retirada da página (<http://www.milkpoint.com.br>). Fonte: IBGE

O Brasil exportou 148,6 milhões de toneladas em 2008, gerando um faturamento de U\$540,8 milhões, o que significa um aumento de 43,5% em volume e 80,9% em valor quando comparado a 2007. Cerca de 55% do produto exportado foi leite em pó. O Brasil ocupa hoje a sétima posição no *ranking* dos maiores exportadores de leite, sendo a qualidade do leite (percentagem de gordura/proteína) ainda abaixo dos padrões exigidos pelo mercado externo.

O Brasil importou 78,5 milhões de toneladas de leite e derivados em 2008, sendo o soro do leite o maior produto importado (49%).

Mesmo estando em significativa expansão, inúmeros problemas afetam a produção de leite brasileira, fatores esses de origem organizacional, de distribuição, ambientais e genéticos. A mensuração dessas perdas, associada ao correto manejo dos rebanhos, é de fundamental importância para a o desenvolvimento da bovinocultura brasileira. Dentre esses fatores, podemos destacar as perdas relacionadas a ação do carrapato e ao estresse térmico.

2.5 O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *Rhipicephalus B. microplus* (CANESTRINI, 1887), anteriormente chamado de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), é artrópode hematófago de distribuição cosmopolita, que transmite uma variedade de doenças aos humanos e bovinos (Figura 4). Possui uma ampla distribuição, estando presente entre os paralelos 32^oN ao 32^oS, estando presente em todas as regiões do Brasil. A infestação por carrapato leva a grandes prejuízos econômicos na produção mundial, perdas essas diretas e indiretas. Segundo o SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal) estima-se que as perdas no Brasil são em torno de 1 bilhão de dólares a cada ano, sendo 40% na produção de leite, 27% na mortalidade dos bovinos, 11% sobre o desempenho reprodutivo, 9% com gastos em acaricidas, 5% na redução de ganho de peso, 3% pela má qualidade do couro e outras despesas.

2.5.1 Classificação

O carrapato é classificado no filo *Arthropoda*, sub-filo *Chelicerata*, classe *Arachnida*, sub-classe *Acari*, superordem *Parasitiformes*, ordem *Ixodida*, família *Ixodidae*, sub-família *Rhipicephalinae*, gênero *Rhipicephalus* subgênero *Boophilus*. São artrópodes vetores de arboviroses, ricketisioses, espiroquetoses e protozooses, para animais e humanos (KAUFMAN, 1989).

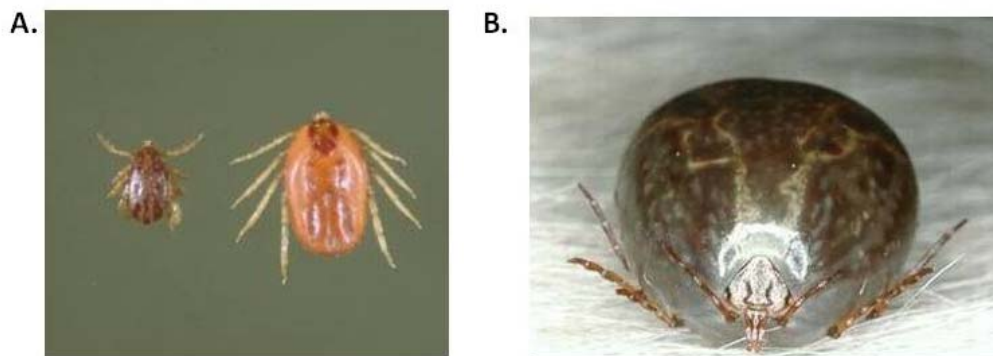


Figura 4: Imagens do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*. A. macho (esquerda) e fêmea (direita); B. Fêmea ingurgitada.

2.5.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida do carrapato pode ser dividido em duas fases: Fase de vida livre e fase parasitária. A primeira inicia-se após a queda da teleógina com o período de pré-postura e se estende até a eclosão dos ovos e a transformação das neolarvas em larvas infectantes (GONZALES, 1974). A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infectante instala-se no hospedeiro, transformando-se em metalarva, seguida da fase de ninfa. Segue a transformação para partenógina, e finalmente teleógina (GONZALES, 1975).

Como qualquer outro organismo parasita, o ciclo de vida do carrapato sofre algumas alterações, principalmente com variações na temperatura e umidade do ambiente. Estudos indicam um menor tempo no ciclo de vida nos meses quentes (novembro a abril) e maiores nos meses frios (maio a outubro)(SANTARÉM, 2003).

Furlong, (1993) descreve o ciclo de vida do carrapato no Brasil central da seguinte forma: na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura; de 22 a 30 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, quando se transformam em larvas infestantes. O autor afirma ainda que uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos durante a postura, que é única. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas.

Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com várias fêmeas. O ingurgitamento e queda da fêmea do *R. (B.) microplus* são bastante rápidos e, de 8 a 12 horas, fêmeas ingurgitadas de 4-6 mm (10-30 mg) podem ingurgitar rápido à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg) e se destacar do animal nas primeiras horas do dia. Porém, os padrões de ingurgitamento se diferenciam entre as estações.

O conhecimento da biologia e das formas componentes de seu ecossistema, além das relações ambientais, como a duração de seu ciclo de vida, principalmente da fase livre, permitirá a elaboração de estratégias de controles mais eficientes.

2.5.3 Resposta dos bovinos à infestação pelo carrapato

A infestação dos bovinos pelo carrapato desencadeia uma série de eventos do sistema imunológico nos animais parasitados, levando a diferentes respostas de combate ao parasita. Estudos indicam que essa resposta varia de acordo com as raças (SILVA *et al*, 2007; CARVALHO *et al*, 2008). Diferentes graus de resistência também são observados dentro das raças. De acordo com a literatura, há uma maior suscetibilidade nos animais *Bos p. taurus* quando comparados com cruzamentos entre animais *Bos p. taurus* x *Bos p. indicus* e raças *Bos p. indicus* (WAMBURA *et al*, 1998; KASHINO *et al*, 2005; MORRIS, 2007).

Davis (1993) reportou média de 0,34 em estimativas de herdabilidade a resistência ao carrapato em um trabalho de revisão, valores esses próximos aos reportados em animais brasileiros (ANDRADE, 1998; CARDOSO *et al*, 1999).

A ação do carrapato na pele do bovino leva a mobilização de inúmeras células e moléculas do sistema imune, como citocinas, mastócitos, basófilos, eosinófilos, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B, anticorpos, complemento entre outras (BROSSARD & WIKEL, 1997).

De acordo com Ribeiro (1989), a primeira resposta dos bovinos ao carrapato é a liberação de histamina (principal mediador da resposta inflamatória) por basófilos e mastócitos, e intensa migração de eosinófilos para o local da inflamação.

Grande parte da resposta é realizada pela atuação das interleucinas. As interleucinas são citocinas sintetizadas principalmente por leucócitos, executando mais de uma função nos próprios leucócitos. Dentre as inúmeras interleucinas existentes, podem ser destacados:

- IL-4: produzida por linfócitos T“helper” ativados, basófilos, mastócitos e linfócitos T citotóxicos, sendo a principal citocina a estimular a “troca” de classe de outras imunoglobulinas para IgE.
- IL-2: produzida por linfócitos T“helper” ativados: Induz a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. Estimula a imunidade humoral.
- IL-10: Induz as células B ativadas a produzirem altos níveis de IgM, IgG e IgA, mas não IgE.

A resposta a infestação por artrópodes ectoparasitas é semelhante a infestação por endoparasitas, com o aumento da expressão de IL-4 e IL-10 e diminuição dos níveis de IL-2 e IFN γ (interferon gama) (Apud:GASPARIN, 2007).

Ferreira & Silva (1999), em estudos de análise da resposta imunológica de camundongos infectados por *Rhipicephalus sanguineus*, verificaram que a saliva do carrapato pode modular a resposta imune do hospedeiro.

Além da necessidade de maiores estudos da cascata de eventos imunológicos dos bovinos quando parasitados pelo carrapato, é de grande importância o entendimento da biologia e genômica do próprio carrapato, possibilitando a identificação de proteínas importantes nos vários estágios de seu ciclo de vida, o que permitiria o desenvolvimento de vacinas e medicamentos mais eficientes no combate desses parasitas.

2.6 Estresse térmico

Yousef (1984) define estresse térmico como a soma de forças externas em animais homeotérmicos que atuam no aumento ou diminuição da temperatura desses animais em repouso. Variações na temperatura ambiental podem

influenciar o estado de conforto térmico dos animais. A elevação da temperatura ambiental, e conseqüentemente, da temperatura do animal, desencadeia uma série de modificações fisiológicas com o objetivo de minimizar os efeitos provocados pelo estresse térmico.

Animais de raças zebuínas (*Bos p. indicus*) possuem um maior intervalo de termo-tolerância que os animais de raças européias (*Bos p. taurus*). Além disso, a exposição a altas temperaturas tem um menor efeito deletério nas células dos zebuínos do que nos europeus (HANSEN, 2004). Dessa forma, a utilização de cruzamentos onde haja a introgressão de genoma zebuíno em sistemas de produção de carne e leite são importantes nos trópicos.

Nos bovinos, o estresse térmico é um fator de grande importância a ser considerado na produção animal, já que a resposta fisiológica ao estresse é diferente entre bovinos da raça *Bos p. taurus* e *Bos p. indicus*. Isso pode ser evidenciado na menor eficiência alimentar, na menor produção de leite (West, 2003), menor desempenho reprodutivo (HANSEN, 1999; BRITO, 2004; COLLIER *et al*, 2006) e na secreção de hormônios importantes para a homeostase (AL-HAIDARY *et al*, 2001) nos animais *B. p. taurus* em comparação aos *B. p. indicus*, quando em situação de estresse.

Segundo Gebremedhin and Wu (2001), quando a temperatura corporal está acima da zona de conforto, as maiores perdas de calor são via evaporação pela pele, seguido do aumento da taxa de sudorese e movimentos respiratórios. Maia *et al* (2003) observaram que quando a temperatura do ambiente ultrapassa 30°C, a evaporação cutânea é responsável por 85% da “perda” de calor para o ambiente, sendo os 15% restantes às perdas por evaporação respiratória. Dessa forma, os fatores que influenciam na maior perda de calor por evaporação nos

bovinos são: a área da superfície da pele, tipo e densidade das glândulas sudoríparas, densidade do pêlo, espessura, comprimento e cor do pêlo, cor da pele e fatores hormonais.

2.6.1 Genes relacionados à morfologia e cor do pêlo

2.6.1.1 Comprimento do pêlo

Inúmeros genes estão envolvidos na resposta dos bovinos ao estresse térmico. Para comprimento de pêlo, Olson *et al*, (2003) identificaram um gene de herança dominante (*slick hair gene*) em animais da raça Senepol (*Bos p. taurus*). Mariasegaram *et al*. (2007) identificaram possíveis genes candidatos para esse tipo diferente de pêlo (curto, liso e brilhante) encontrado na raça Senepol (*slick hair*) no cromossomo 20 . Em seu estudo, tanto o gene *PRLR* (gene receptor de prolactina) quanto o gene *SRD5A2* (esteróide 5 alfa redutase, tipo 2), estaria localizados no intervalo entre os marcadores microssatélites que apresentaram associação com a característica. Olson *et al* (2002) verificaram que animais com pêlos pequenos e claros apresentaram uma menor temperatura retal (-0.34⁰C) e menor número de movimentos respiratórios (12.4 movimentos respiratórios a menos) que animais com pêlos normais (normal = pêlo de animais da raça Holandesa pura). Esses valores indicam a importância em estudar os genes envolvidos na morfologia do pêlo dos bovinos.

2.6.1.2 Cor da pelagem

Pouco se sabe sobre os genes e a interação entre eles (epistasia) na determinação da cor da pelagem em bovinos. Grande parte desses genes é da família das tirosinases, principais genes responsáveis pela produção da

melanina, a mais importante proteína envolvida na pigmentação (SEO *et al*, 2007).

Em resposta a exposição ao sol, dois principais grupos de genes estão envolvidos no aumento/diminuição da expressão da produção de melanócitos, e, conseqüentemente, da melanina: O gene *Kit*, que codifica um receptor de membrana com atividade tirosina-quinase (*c-kit*), e genes com informação para codificar o receptor do fator de células tronco (*stem cells factor - SCF*) (SEO *et al*, 2007).

Segundo Barsh (2001) a melanina é dividida em duas classes: eumelanina e feomelanina, sendo a razão entre elas que determina a coloração da pelagem em bovinos. Reinsch *et al* (1999) identificou um QTL para grau de manchas brancas em bovinos da raça Holandesa em sintonia com o loco *Kit* no cromossomo 6.

Os principais locos responsáveis pela diferença de coloração em bovinos são: agouti (proteína *ASP* – cromossomo 13), marrom (proteína *tyrp-1*; cromossomo 8), albino (*stop-codon* no aminoácido 316 do loco *tyr*, localizado no cromossomo 29), diluição (dilui a cor natural – genes não conhecidos), extensão (loco *MSH* ou *MC1r* – cromossomo 18) e ROAN (gene *SCF* – cromossomo 5). Tão importante quanto os alelos nesses locos é a interação entre esses genes, influenciando no fenótipo final da cor da pelagem.

2.6.2 Genes relacionados à resposta celular ao estresse

De acordo com Sonna *et al* (2002), calcula-se que exista cerca de 100 genes que tem sua expressão alterada em situação de hipertermia e 10 genes em situação de hipotermia. A grande maioria dos genes envolvidos no controle de

grandes mudanças térmicas são os genes que codificam proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico.

As proteínas de choque térmico têm sua expressão aumentada em condições de estresse térmico, tendo um papel importante na fisiologia celular dos indivíduos (LINDQUIST, 1986). São as principais proteínas sintetizadas após os minutos iniciais de hipertermia. Segundo Lindquist (1986), a grande maioria dos genes que codificam as proteínas de choque térmico não possui íntrons, o que facilitaria sua rápida expressão.

Segundo Sonna *et al* (2002), as proteínas de choque térmico possuem importantes atividades bioquímicas, como: Regulação do potencial de redução (REDOX) celular; regulação do *turnover* protéico e atividade chaperona. Essa atividade chaperona é importante tanto para evitar a desnaturação de algumas proteínas quanto para reestabelecer a conformação original de proteínas que desnaturaram pelo calor. A estabilidade estrutural dada por essas proteínas é importante para a manutenção do ciclo celular e do sistema imune. Para Sonna *et al* (2002), inúmeras mudanças são provocadas pelo estresse térmico, como a inibição da síntese de DNA, transcrição, processamento do RNA e tradução, desnaturação de proteínas, alterações metabólicas que levariam a diminuição no ATP celular, mudanças na permeabilidade das membranas, etc.

Collier *et al* (2006), avaliando os efeitos do estresse térmico na expressão gênica no desenvolvimento de células mamárias epiteliais de bovinos, identificou a diminuição da expressão de inúmeros genes associados ao metabolismo celular e genes relacionados com quantidade de proteínas expressas no leite. Esses resultados são indicativos do efeito negativo que o estresse térmico pode ter em características de produção.

2.7 Marcadores Moleculares

A utilização de marcadores moleculares é de grande importância em estudos de genética animal. Estudos de variabilidade genética entre raças (Kantanen *et al*, 2000), verificação de pedigree (FARIA *et al*, 2009), estudos de mapeamento de QTL (*Quantitative Trait loci*)(DRUET *et al*, 2008; DAETWYLER *et al*, 2008), associação de marcadores com características de importância econômica (PAGE *et al*, 2002; JUSZCZUK-KUBIAK *et al*, 2004) e detecção de doenças são algumas das possíveis áreas em que os marcadores podem ser utilizados de maneira eficiente.

Existem inúmeros tipos de marcadores moleculares, distribuídos por todo o genoma. Podemos destacar RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), minissatélites e microssatélites, sendo o último descrito a seguir.

2.7.1 Microssatélites

Os microssatélites são seqüências de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidos em *tandem* (em seqüência) ao longo de todo o genoma. O polimorfismo dos microssatélites está no número de repetições das seqüências dos nucleotídeos. Esses locos podem ser amplificados utilizando a técnica do PCR, utilizando iniciadores que flanqueiam as regiões polimórficas dos locos. São marcadores muito utilizados em estudos de melhoramento por apresentar características como alto polimorfismo, herança co-dominante, possibilidade de análise automatizada e de vários locos ao mesmo tempo (*multiplex*) e facilidade de genotipagem.

Em bovinos, existem cerca de 3800 locos de microssatélites descritos em todos os cromossomos (IHARA *et al*, 2004), possibilitando a escolha de locos específicos para cada tipo de estudo.

2.8 Detecção e Mapeamento de QTL

QTL (*Quantitative Trait Loci*) é um segmento do cromossomo que afeta determinada característica quantitativa, não sendo necessariamente um único gene (FALCONER & MACACKAY, 1996). Estudos de QTLs são interessantes quando a característica fenotípica estudada é de difícil mensuração, baixa herdabilidade ou quando o fenótipo de interesse é determinado em um estágio mais avançado da vida do animal.

Nos trabalhos em que o objetivo é a identificação de QTL, é necessária a utilização de marcadores moleculares informativos que possam estar ligados às regiões que controlam a característica de interesse. Até o momento, a maioria dos trabalhos de identificação de QTLs utilizou os marcadores microssatélites, já que a localização e a grande quantidade de locos descritos em espécies de interesse econômico foram determinadas desde a década de 1990. Entretanto, com o avanço das técnicas de seqüenciamento, foi possível identificar inúmeros SNP ao longo de todo o genoma, sendo a utilização de análises de QTL com alta densidade de SNP a mais nova metodologia utilizada na identificação mais precisa dessas regiões de interesse (ALAN *et al*, 2009; RINCÓN *et al*, 2009).

O conceito implícito para a localização de QTL utilizando marcadores moleculares é o desequilíbrio de ligação. Desequilíbrio de ligação pode ser definido como uma associação não-aleatória de alelos em dois ou mais locos,

não necessariamente localizados no mesmo cromossomo. Para Mackay (2001), haverá uma diferença nos valores médios da característica quantitativa entre os indivíduos com diferentes genótipos no loco marcador caso um QTL esteja ligado ao marcador. Portanto, o desequilíbrio de ligação é fundamental para estudos de identificação e mapeamento de QTLs.

Lynch & Walsh (1998) relataram que através do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas é possível criar o desequilíbrio de ligação entre os locos que diferem entre as linhagens parentais, criando a associação entre os locos marcadores e o QTL segregante. Outros delineamentos experimentais também são utilizados com o objetivo de criar o desequilíbrio de ligação. Para a escolha do melhor delineamento a ser utilizado, deve-se levar em conta aspectos biológicos, econômicos, genéticos e estatísticos (MARTINEZ, 2001).

Existem dois tipos principais de populações que podem ser utilizadas para a detecção de QTL: populações naturais e populações derivadas de linhagens endogâmicas.

Em bovinos, o delineamento experimental mais utilizado é o delineamento F2 (Figura 5). Nesse delineamento, duas raças de bovinos (chamadas parentais), diferentes para as características que serão analisadas, são cruzadas produzindo indivíduos da geração F1. Dessa forma, espera-se que os QTLs para as características estudadas estejam fixados dentro de cada raça, já que essas diferentes raças passaram por diferentes processos de seleção ao longo do tempo. Com o cruzamento entre indivíduos, forma-se a geração F2. Na geração F2 é esperado que exista uma grande variabilidade fenotípica e genotípica, facilitando uma possível associação do marcador com o loco QTL.

A associação entre os marcadores e o QTL pode ser avaliada utilizando um, dois ou múltiplos marcadores, com diferentes análises estatísticas para cada uma das possibilidades. Dentro dessas diferentes metodologias de análise, Lander & Botstein (1989) propuseram a metodologia de mapeamento por intervalo. Essa metodologia fundamenta-se na relação de ligação entre um QTL e os marcadores flanqueadores que serão utilizados na análise, estimando a cada ponto (a cada cM) a possibilidade de haver ou não haver um QTL segregante. Como todos os intervalos entre os marcadores são investigados, faz-se necessário o conhecimento prévio da localização e distância dos marcadores utilizados, ou seja, do seu mapa de ligação. Inúmeros mapas de ligação de bovinos foram construídos (BISHOP *et al*, 1994; BARENDSE *et al*, 1994; BARENDSE *et al*, 1997), possibilitando a escolha de marcadores específicos, distribuídos por todo o cromossomo ou apenas na região onde um possível QTL segregante foi identificado.

2.9 QTLs identificados em bovinos

De acordo com o banco de dados de QTL identificados nessa espécie (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>), foram identificados em bovinos cerca de mil trezentos e setenta e cinco (1.375) QTLs descritos em todos os cromossomos autossômicos e no cromossomo X (Tabela 1).

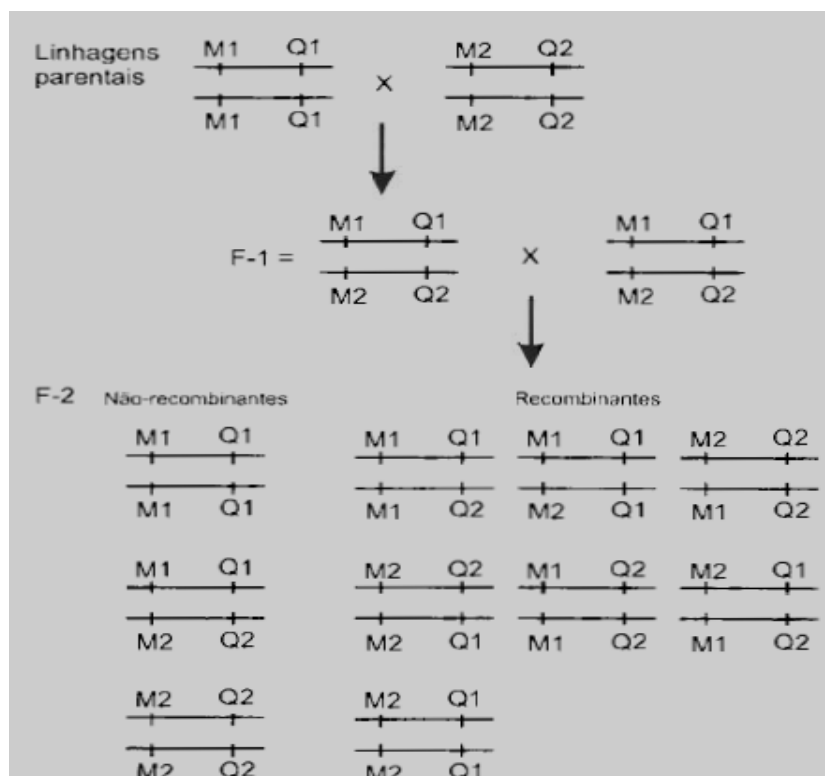


Figura 5: Esquema do delineamento F2. Figura retirada do livro *Biologia Molecular Aplicada ao melhoramento animal*, pg 66.

Tabela 1. Principais QTLs descritos em bovinos. Dados retirados do *catleQTLdatabase* (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>).

Características	Número de QTL
Geral	244
Crescimento	209
Proteína (leite)	194
Gordura (leite)	142
Qualidade carne	108
Consumo diário (alimento)	93
Fertilidade	82

Nos cromossomos 24 e 29 foram identificados dezessete e quarenta e cinco QTLs, respectivamente (Figura 6 e 7). No cromossomo 24 foram identificados QTLs para profundidade corporal, facilidade de parto, profundidade do peito, profundidade de úbere, etc.

No cromossomo 29, foram identificados QTLs para maciez da carne, peso ao nascimento, peso a desmama, peso ao abate, taxa de gestação, produção de proteína no leite, entre outros.

2.9.1 QTL para características de Crescimento

De acordo com a Tabela 1, pode-se verificar que foram identificados duzentos e quatro QTLs para crescimento. Do total, trinta e seis foram descritos para Peso ao Nascimento (cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 12, 14, 19, 20, 21, 25 e 29), 4 para peso a desmama (cromossomos 11, 12, 16 e 29) e 7 para peso a 1 ano de idade (cromossomos 1, 2, 5, 6, 13 e 25). Esses QTLs foram identificados em diferentes cruzamentos e delineamentos experimentais.

A maior parte desses QTLs foram identificados em gado de corte, visto que medidas de peso nesses animais são extremamente importantes para peso final ao abate. Em estudos com gado de leite, as medidas de peso citadas também são importantes, visto que inúmeros problemas de parto podem ocorrer caso o bezerro tenha um peso elevado ao nascimento. Esses problemas no parto (distocias) geram prejuízos na produção de carne e de leite. As principais perdas são: Morte do bezerro, morte da vaca, despesas veterinárias, menor produção de leite em vacas que tiveram problemas no parto, além de um maior intervalo entre partos (MEE, 2008).

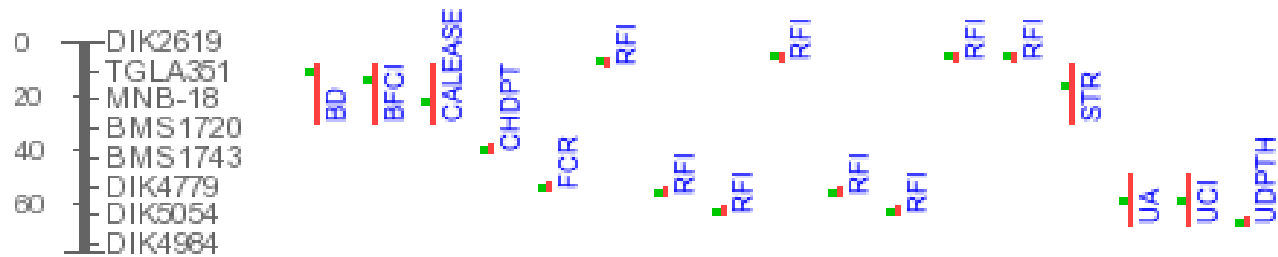


Figura 6. QTLs descritos no **cromossomo 24** dos bovinos. Linha vermelha: posição do QTL no cromossomo; **BD**: *Body Depth*; **BFCI**: *Body form composite index*; **CALEASE**: *Calving Ease*; **CHDPT**: *Chest depth*; **FCR**: *Feed conversion ratio*; **RFI**: *Residual feed intake*; **STR**: *Strength*; **UA**: *Udder attachment*; **UCI**: *Udder composite index*; **UDPTH**: *Udder depth*. Dados retirados do banco de dados de QTL de bovinos (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>).

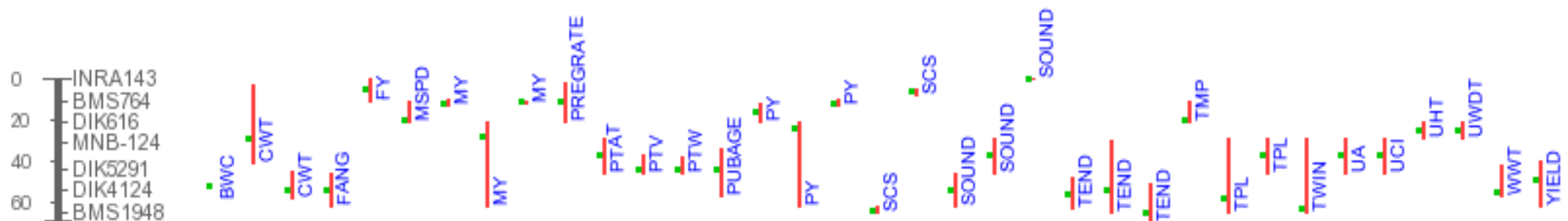


Figura 7: QTLs descritos no **cromossomo 29** dos bovinos. Linha vermelha: posição do QTL no cromossomo; **BW**: *Birth weight*; **BWC**: *Birth weight at castration*; **CWT**: *Carcass weight*; **FANG**: *Foot angle*; **FY**: *Fat Yield*; **MSPD**: *Milking speed*; **MY**: *Milk yield*; **PREGRATE**: *Pregnancy rate*; **PTV**: *Paired testis volume*; **PTW**: *Paired testis weight*; **PUBAGE**: *Age at puberty*; **PY**: *Protein yield*; **SCS**: *Somatic cell score*; **SOUND**: *Structure soundness*; **TEND**: *Tenderness*; **TPL**: *Teat placement*; **TWIN**: *Twinning*; **UA**: *Udder attachment*; **UCI**: *Udder composite index*; **WWT**: *weaning weight*; **YIELD**: *Retail product yield*. Dados retirados do banco de dados de QTL de bovinos (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>).

Nenhum QTL para medidas de peso foi identificado no cromossomo 24. No cromossomo 29, alguns QTLs para medidas de crescimento foram identificados. Casas *et al.* (2003) identificaram um QTL sugestivo para peso a desmama (PD) em uma população de animais Brahman e Hereford. Kim *et al.* (2003) identificaram 35 QTLs (5 significativos e 30 sugestivos) em uma população experimental (Angus x Brahman), sendo um QTL sugestivo para peso final de carcaça. Alexander *et al.* (2007) identificou um QTL significativo para peso ao nascimento (PN) em uma população F2 (Wagyu-Limousin).

2.9.2 QTL para resistência ao carrapato

Existem poucos trabalhos de identificação de QTL para resistência a carrapato, existindo também alguns estudos de associação entre marcadores e genótipos. Ashton (1968) encontrou associação entre fenótipo da amilase sérica com infestação de carrapatos, no cromossomo 3. Pannepucci *et al.* (1989) encontrou resultados similares, utilizando marcadores genéticos-bioquímicos em animais da raça Canchin.

Miyata (2006) identificou a presença de um QTL significativo ($p < 0.01$) no cromossomo 14 para resistência a carrapato, utilizando a mesma população experimental F2 (Gir x Holandês) deste trabalho. Gasparin *et al.* (2007), em um estudo com a mesma F2 (Gir x Holandês), identificou QTL significativo ($P < 0.01$) no cromossomo 5, e um QTL sugestivo ($P < 0.10$) no cromossomo 7 na estação das chuvas (outubro-março), além de um QTL sugestivo ($P < 0.05$) no cromossomo 7 e um QTL significativo ($P < 0.01$) no cromossomo 14 na estação seca (abril-setembro). Esses QTLs foram identificados utilizando apenas efeito aditivo no modelo de

análise. Incluindo efeito de dominância no modelo, foi identificado um QTL sugestivo ($P < 0.05$) no cromossomo 5 na estação de chuvas e um QTL sugestivo ($P < 0.05$) no cromossomo 14 e no cromossomo 5 ($P < 0.10$).

2.9.3 QTL para tolerância ao estresse térmico

Até o presente momento, existem poucos estudos de identificação de QTL relacionado ao estresse térmico. Columbiano (2007) identificou a existência de um QTL ($p < 0,01$) para a característica comprimento do pêlo no cromossomo 10 (72 cM) com os dados coletados no verão (novembro a abril), utilizando a mesma população experimental F2 (Gir x Holandês) avaliada no presente trabalho. Columbiano (2007) também identificou um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para taxa de sudação no cromossomo 11 (0 cM) e um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para a característica comprimento do pêlo no cromossomo 12 (28 cM) com dados coletados no inverno (maio a setembro).

3. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi identificar e mapear QTLs para características de crescimento, resistência ao carrapato (*Rhipicephalus B. microplus*) e tolerância ao estresse térmico por meio da varredura dos cromossomos vinte e quatro e vinte e nove de bovinos, utilizando marcadores microssatélites em uma população F₂ (Holandês x Gir).

4. Material e Métodos

4.1 Delineamento Experimental

A formação da população em estudo foi realizada na Estação Experimental Santa Mônica, pertencente a Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Valença, estado do Rio de Janeiro.

Para o desenvolvimento inicial do trabalho, 28 fêmeas da raça Gir (em um trabalho de superovulação e transferência de embriões) foram inseminadas artificialmente por quatro touros da raça Holandesa. Desses cruzamentos, 150 animais F_1 (entre machos e fêmeas) foram obtidos. Desses 150 indivíduos F_1 , cinco machos foram escolhidos para serem pais da geração F_2 . Cinco grandes famílias foram formadas na geração F_2 a partir do cruzamento dos cinco machos F_1 com todas as fêmeas F_1 , evitando-se parentesco entre o reprodutor e as fêmeas acasaladas com cada um deles. Dessa forma, foram obtidos cerca de 400 animais na geração F_2 , sendo que grande parte desses animais (aproximadamente 375) foi utilizado nas análises.

O delineamento experimental utilizado nesse trabalho pode ser visualizado na Figura 8.

4.2 Coleta dos dados fenotípicos

4.2.1 Medidas de crescimento

A avaliação das características fenotípicas foi feita no Campo Experimental da Santa Mônica, pertencente a Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Valença, estado do Rio de Janeiro.

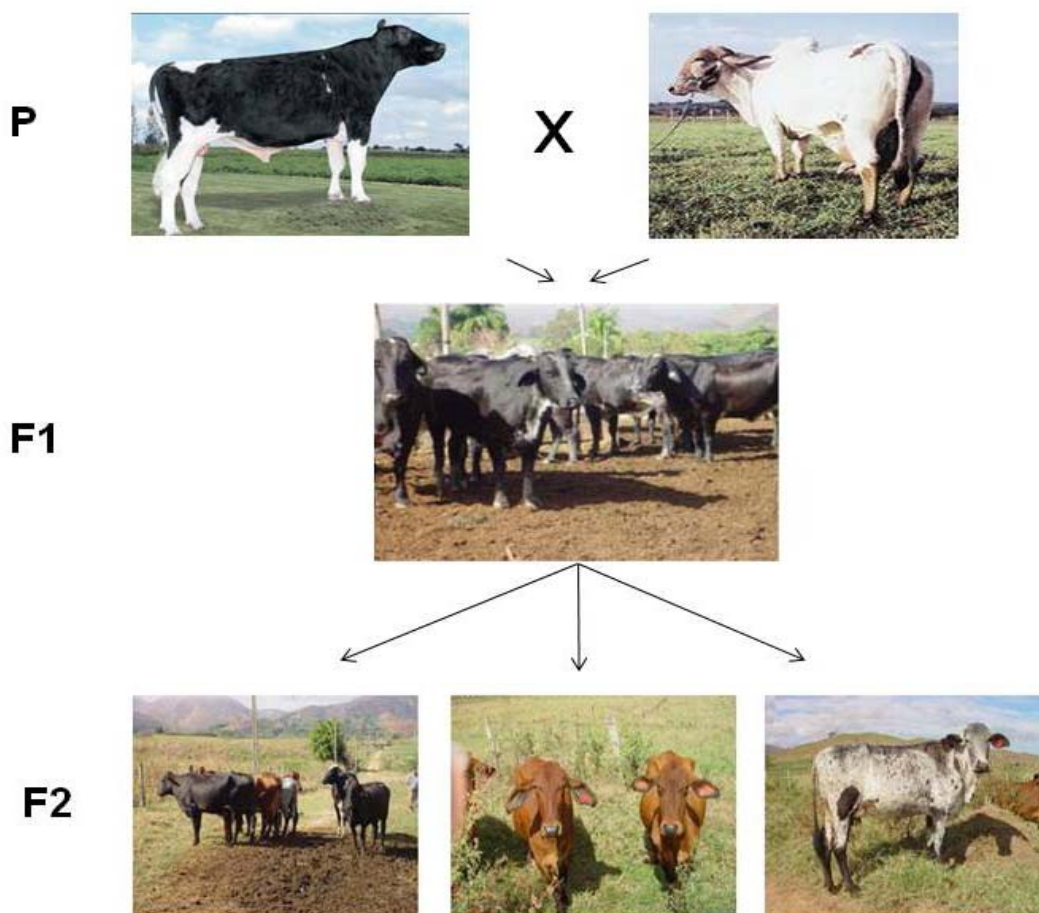


Figura 8: Delineamento experimental para a obtenção da geração F2. Touros Holandeses cruzados com vacas Gir (geração parental – P), originando população F1. Cruzamento entre indivíduos da geração F1, gerando animais na geração F2.

As medidas de peso ao nascimento (PN) foram feitas logo após o nascimento dos bezerros, os quais foram induzidos a ingerir o colostro, permanecendo com a mãe nas primeiras 24 horas de vida, período no qual foram pesados. Em seguida, foram levados para gaiolas individuais, recebendo quatro litros de leite por dia, além de feno, ração concentrada e água à vontade até os 56 dias. Após esse período, foram agrupados em lotes de acordo com a idade, e recriados em piquetes de grama estrela (*Cynodon nlemfuensis*), até a idade de 12 meses, quando foram

transferidos para pastos de braquiária (*Brachiaria sp*), tendo sido pesados mensalmente durante todo o experimento.

Peso ao nascimento (**PN**), peso a desmama (**PD**), peso à 180 dias (**P₁₈₀**) e peso a um ano (**P₃₆₅**) foram as medidas de peso utilizadas neste trabalho.

Os valores de PD, P₁₈₀ e P₃₆₅ foram padronizados levando-se em conta a taxa de ganho diário de peso do animal entre os intervalos de cada medida de peso. Esse cálculo da taxa de ganho diário de peso pode ser representado na seguinte fórmula:

Peso Padronizado à Desmama:

$$(GPD_1) = \frac{PD - PN}{IDD}$$

Sendo que: (GPD₁) – Ganho diário de peso (PN a PD)

PD – Peso à desmama

PN – Peso ao nascimento

IDD – Idade à desmama

PPD = (GPD_p) X 71 + PN ; sendo 71 dias a moda das medidas de desmama na amostra estudada.

Peso Padronizado à 180 dias:

$$(GPD_2) = \frac{P_{180} - PD}{ID_{180} - IDD}$$

Sendo que: GPD₂= Ganho diário de peso (PD a P₁₈₀)

PD – Peso à desmama

P₁₈₀ – Peso à 180 dias

IDD – Idade à desmama

ID₁₈₀ – Idade à 180 dias

$$PP_{180} = (GPD_2) \times 180 + PD$$

Peso Padronizado à 365 dias:

$$(GPD_3) = \frac{P_{365} - P_{180}}{ID_{365} - ID_{180}}$$

Sendo que : GPD₃ = Ganho diário de peso (P₁₈₀ a P₃₆₅)

P₁₈₀ – Peso à 180 dias

P₃₆₅ – Peso à 365 dias

ID₁₈₀ – Idade à 180 dias

ID₃₆₅ – Idade à 365 dias

$$PP_{365} = (GPD_3) \times 365 + P_{180}$$

A verificação da normalidade dos dados foi realizada através do programa *BioStat 1.5.0* (<http://www.programurl.com/biostt.htm>).

4.2.2 Avaliação da resistência genética ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os níveis de resistência de cada animal foram estimados por avaliação absoluta, que se dá pela contagem das fêmeas do carrapato que completam seu ciclo, após uma infestação artificial, com um número de larvas conhecidas. No presente trabalho, as infestações continham aproximadamente 10.000 larvas fêmeas (equivalente a 1 grama de ovos) por animal. As contagens foram feitas no 21^o dia

após a infestação (dia modal da queda dos carrapatos). As larvas foram inseridas em um colar adaptado que foi colocado na região cervical do animal, para que as larvas pudessem alcançar ambos os lados do corpo do animal.

Os animais foram avaliados em grupos de contemporâneos, com cerca de 20 a 30 animais por grupo, com 10 a 14 meses de idade, mantidos em baias desde a infestação até a contagem (21 dias), sendo as contagens realizadas nas primeiras horas do dia. O total de carrapatos contados foi o número de fêmeas semi-engurgitadas (4,5 a 8,0 mm de diâmetro) de um dos lados do corpo do animal, multiplicado por dois. As avaliações ocorreram em duas estações do ano (seca – abril a setembro; chuvosa – outubro a março).

Os dados fenotípicos de contagem de carrapato foram transformados por meio do uso de $\log_{10}(x+1)$, para a normalização dos dados.

4.2.3 Avaliação do estresse térmico

As características fenotípicas utilizadas para calcular a tolerância / suscetibilidade dos animais ao estresse térmico foram: espessura, densidade e comprimento do pêlo, temperatura retal, movimentos respiratórios, temperatura da pele e cor da pele.

- **Medidas do pêlo:** A espessura de capa foi medida utilizando um paquímetro de precisão, onde a leitura (mm) é feita com a parte do instrumento que se projeta para fora de sua extremidade ao se deslocar o cursor. A densidade numérica de pêlos é calculada a partir da coleta de pêlos por um alicate. A área depilada é igual a das mandíbulas do alicate, que são pressionadas em ângulo reto com a pele do animal, e arrancadas em um movimento rápido.

Após a coleta, os pêlos foram colocados sobre uma folha de papel e contados. O comprimento dos pêlos foi realizado com o auxílio de um paquímetro.

- **Medidas da temperatura:** as medidas da temperatura dos animais avaliados foram realizadas em duas etapas, ambas dentro da câmara bioclimática: em termoneutralidade (22^oC e 70% de umidade) e estresse (42^oC e 60% de umidade); em duas épocas distintas (verão e inverno). Os animais avaliados eram mantidos na sala em condições de termoneutralidade, permanecendo nessas condições por 12 horas. A primeira coleta de dados foi realizada às 6h do dia do tratamento. Após a coleta dos dados, as condições da sala foram ajustadas para situação de estresse, em que os animais permaneceram por 6 horas, sendo os dados coletados após esse período. Durante o período do experimento na câmara, os animais foram privados de água e alimentação, com a finalidade de não interferirem na resposta dos animais. As medidas realizadas nos animais foram: **A) Temperatura Retal:** Obtida por meio de um termômetro clínico digital, inserido a aproximadamente 7,5 cm no reto dos animais. **B) Temperatura do corpo:** A temperatura da superfície corporal foi tomada utilizando termômetro infravermelho, sendo o valor estimado a média das temperaturas tomadas em quatro diferentes posições do corpo dos animais (cabeça, cernelha, virilha e canela).
- **Taxa de sudação:** As taxas de sudação dos animais foram coletadas apenas no período da tarde. A metodologia utilizada para determinar a taxa de

sudação dos animais estudados foi de Schleger & Turner (1965). Papel tipo Whatman é imerso em solução aquosa a 10% de cloreto de cobalto (seco ao ar livre e em estufa a 90⁰C). Esse papel é da cor azul-violeta quando seco, e roseo-claro quando saturado de água. Discos de 0,5 cm de diâmetro são presos em três diferentes regiões do corpo dos animais com fita adesiva tipo “durex”, após raspagem da área onde os discos serão aplicados. Imediatamente após a aplicação dos discos na pele do animal, inicia-se a cronometragem do tempo necessário para a completa mudança da cor de cada disco. Segundo Schleger & Turner (1965), a quantidade de água absorvida necessária para a mudança de cor dos discos em uma solução de cloreto de cobalto a 10% é de 22gm⁻².

A taxa de sudação foi calculada de acordo com Silva (2000 a), pela fórmula:

Taxa Sudação = (38.446,6/ tempo da mudança da cor).

- **Movimentos respiratórios:** A frequência respiratória foi realizada por meio da contagem dos movimentos dos flancos, por 1 minuto.
- **Cor da pele:** A cor da pele dos animais avaliados foi classificadas em 4 categorias: **1**=totalmente clara; **2**=predominância clara; **3**=predominância escura; **4**=totalmente escura).

4.3 Marcadores microssatélites

Inúmeros marcadores microssatélites estão descritos nos cromossomos 24 e 29. Para escolher quais os locos de microssatélites que usaríamos no trabalho, utilizamos como referência o mapa produzido pelo *Meat Animal Research Center*

(MARC), sendo que o mapa de todos os cromossomos bovinos está disponível no site: www.marc.usda.gov. A posição dos marcadores no mapa (distância média entre os marcadores de aproximadamente 20 cM) o número de alelos foram alguns dos critérios iniciais de escolha dos microssatélites. Na Figura 9 são indicados as posições dos marcadores segundo o mapa de referência MARC. As características dos marcadores utilizados podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2: Características dos marcadores utilizados.

Cromossomo	Loco	Fluoróforo	Multiplex	Tamanho (pb)	Posição
Crn 24	MNB60	HEX	M1	141-175	3.7
	DIK5395	FAM	M1	192-200	15.9
	DIK4426	TAMRA	M2	197-209	32.2
	MNB90	HEX	M2	145-175	62.5
	DIK4971	FAM	M2	184-202	78.1
Crn 29	INRA143	HEX	M3	98-114	0.0
	DIK4188	FAM	M3	112-128	15.5
	BMS1600	HEX	M4	139-153	29.2
	DIK4966	HEX	M4	204-211	32.0
	RM040	HEX	M4	106-114	40.1
	DIK5057	FAM	M4	220-230	69.7

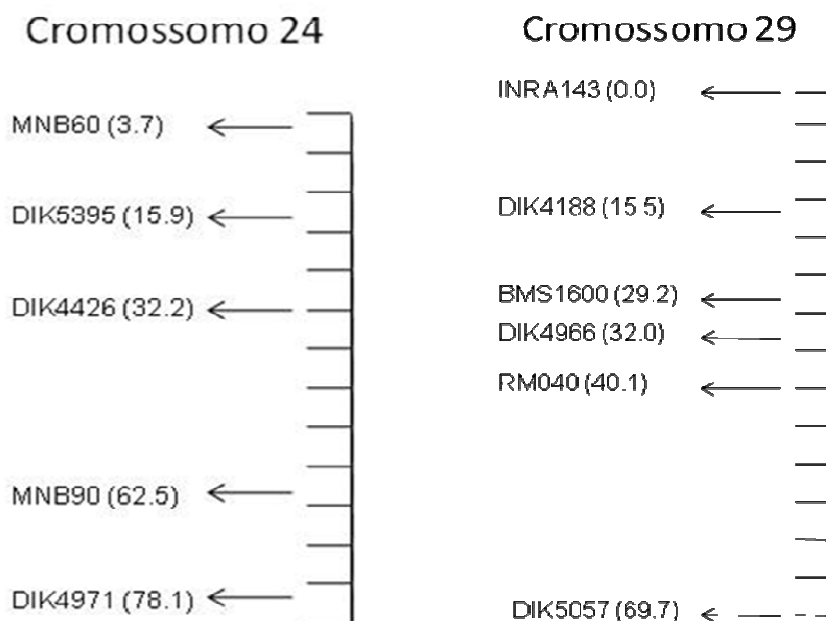


Figura 9: Mapa de ligação referencial utilizado com os respectivos locos e sua distância (cM) ao longo dos cromossomos 24 e 29.

4.3 Extração do DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir de amostras de sangue e sêmen (apenas para os touros holandeses) conforme o protocolo de Hallerman *et al.* (1988) e Zadworny & Kuhnlein (1990), respectivamente. No protocolo de Hallerman *et al.* (1988), amostras de aproximadamente 30 mL de sangue (com 0,5% EDTA) foram centrifugadas e o plasma retirado. As células vermelhas foram lisadas em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaCl), seguido de centrifugação (2.500 rpm, 10 minutos). Esse passo de lise de células vermelhas foi repetido três vezes, para obter um precipitado de células brancas. As células brancas foram suspendidas e incubadas em um tampão de digestão (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM EDTA pH 8,0; 50 mM NaCl, 0,02 % SDS, com 3mg proteinase K por amostra) a 42^oC por 12 horas. Após a digestão, as amostras extraídas duas vezes em fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1), duas vezes com clorofórmio

isoamil (24:1), seguido de precipitação com etanol gelado. O DNA foi ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) e congelado. O protocolo de Zadworny & Kuhnlein (1990) é semelhante ao descrito anteriormente, com exceção do passo de lise de células vermelhas.

Após a extração do DNA, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro (HITACHI modelo 2000), sendo todas as amostras padronizadas para a concentração de 40 ng/μL.

4.4 Reações de amplificação dos microssatélites

Para as reações de amplificação, inúmeros testes foram realizados para a obtenção do *multiplex*, o que diminuiria os custos e tempo das amplificações. Os *multiplex* padronizados podem ser vistos na Tabela 2. Para as reações de amplificação, foi utilizado aproximadamente 50ng de DNA, 20 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl; 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂; 3pmol de cada iniciador, 1U *Taq* DNA polimerase em um volume final de 15 μL. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). As condições de amplificação constituíram de desnaturação inicial a 94^oC, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94^oC por 1 minuto, temperatura de hibridização (T_m) de cada *multiplex* (Tabela 2) por 1 minuto, e extensão a 72^oC por 1 minuto. Uma extensão final a 72^oC por 1 hora foi adicionada ao final da reação.

4.5 Análise dos genótipos

Após a amplificação dos locos microssatélites, os produtos do PCR foram diluídos 10 vezes, e, do produto diluído, 2μL foram adicionados a 7,75 μL de formamida e 0,25 μL de padrão de tamanho GeneScanTM 500 (*Applied Biosystems*).

Os amplificadores foram visualizados em seqüenciador automático ABI 3100 *Avant* (*Applied Biosystems*). Os produtos foram analisados através dos programas *GeneScan 3.1* e *Genotyper 3.11*. Com o objetivo de minimizar possíveis erros de genotipagem, as análises dos genótipos foram realizadas com o perfil alélico dentro de cada família, sendo que, nessas análises, os eletroferogramas dos pais e filhos sempre foram analisados juntos.

4.6 Estimativas da variabilidade dos marcadores

As frequências alélicas dos marcadores do cromossomo 24 e 29 foram calculadas por contagem direta. Estimativas de heterozigosidade, equilíbrio de Hardy-Weinberg, conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foram calculadas com o auxílio do programa *Cervus v.2.2* (MARSHALL *et al.*, 1998).

4.7 Mapa de ligação

A construção dos mapas de ligação dos cromossomos 24 e 29 foi realizada com o auxílio do programa CRIMAP (GREEN *et al.*, 1990). Com os genótipos completos dos microssatélites dos cromossomos 24 e 29 nas três gerações (Parentais, F₁ e F₂), foi determinado a ordem e a distância (cM) entre os marcadores em cada cromossomo, utilizando a função de mapeamento de Kosambi. As opções utilizadas no CRI-MAP foram: **a) PREPARE**: opção que gera arquivos de parâmetros que serão utilizados em outras funções do programa; gera informações sobre fases (herança materna, paterna ou desconhecida) do cromossomo para cada marcador e indivíduo, número de meioses informativas, ordem dos marcadores entre outros; **b) BUILD**: ordena os marcadores de acordo com a taxa de recombinação entre eles, construindo um mapa de ligação pela incorporação seqüencial dos marcadores.

c) *TWO POINTS*: determina possível ligação para cada par de marcadores, gerando valores de *LOD score*. d) *ALL*: ordena todas as posições possíveis para os marcadores, gerando um valor de log para cada uma das possíveis posições dos marcadores. e) *CHROMPIC*: indica a fase de ligação dos marcadores alinhados no cromossomo, para cada indivíduo. Com essa opção, é possível identificar dupla ou tripla recombinação, indicando possível erro no genótipo do indivíduo. Quando algum indivíduo apresentou esse padrão, o genótipo foi conferido no arquivo de saída do programa *GeneScan* ou amplificado novamente.

4.8 Identificação dos QTLs

A detecção de QTLs foi realizada com o auxílio do programa *QTL Express* (SEATON *et al.*, 2002), disponível pelo endereço eletrônico <http://qtl.cap.ed.ac.uk>. O método de mapeamento de QTLs utilizado foi o de mapeamento por intervalos múltiplos na opção *F₂ LINE CROSS*, onde é utilizada a metodologia de quadrados mínimos e regressão linear (HALEY *et al.*, 1994). O modelo utilizado no mapeamento por intervalo do programa *QTL Express* foi:

$$\hat{y}_j = \mu + \beta_a x_{aj} + \beta_d x_{dj} + e_j$$

em que: \hat{y}_j : valor predito para cada característica fenotípica no *j*-ésimo animal; β_a : coeficiente de regressão do efeito aditivo; x_{aj} : preditor genético para o efeito aditivo; β_d : coeficiente de regressão do efeito de dominância; x_{dj} : preditor genético para efeito de dominância; e_j : erro aleatório.

O nível de significância foi calculado através do teste de permutações de acordo com Churchill & Doerge (1994), com 10.000 permutações para obter estimativas estáveis de $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$. O intervalo de confiança (IC) da presença de um possível QTL foi calculado utilizando teste *bootstrap* de acordo com Visscher *et al.* (1996).

A porcentagem da variação fenotípica que pode ser explicada pelo QTL foi calculada pela fórmula:

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

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

Em que:

MS full = quadrado médio do modelo completo;

MS reduced = quadrado médio do modelo reduzido.

Análises de variância (ANOVA) foram realizadas nos dados fenotípicos para identificar quais seriam os efeitos fixo, para que o modelo de análise de mapeamento de QTL fosse determinado. Essas análises foram realizadas através do procedimento GLM (SAS, 2002).

5. Resultados e Discussão

5.1 Marcadores microssatélites

Um total de 72 alelos foram identificados nos onze locos de microssatélites analisados, sendo quarenta e cinco alelos no cromossomo 24 e vinte e sete alelos no cromossomo 29, com médias de 9 e 4,5 alelos, respectivamente. As informações sobre o número de alelos, heterozigosidade esperada (H_o) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) podem ser visualizadas na Tabela 3.

A estimativa de heterozigosidade observada variou de 0,716 a 0,892, com média de 0,788 (cromossomo 24) e entre 0,357 e 0,736, com média de 0,610 (cromossomo 29). O loco menos informativo foi o DIK4966, com baixos valores de H_o e PIC, visto que foram identificados apenas dois alelos nesse loco.

O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) dos locos genotipados variaram de 0,292 (DIK4966) a 0,877 (MNB60). Altos valores de PIC indicam grande número de meioses informativas. As meioses informativas são importantes na construção de mapas de ligação, já que a fase de ligação de cada marcador é um dos fatores utilizados para a correta inferência da posição e distância dos marcadores no mapa. Esses valores de conteúdo informativo de polimorfismo não levam em conta apenas o número de alelos, como também a distribuição das frequências entre eles. Dos onze locos analisados, apenas dois (DIK4966 e DIK4188) apresentaram valores de $PIC < 0,5$. Botstein *et al.* (1980) relataram que marcadores com valores acima de 0,5 podem ser considerados altamente informativos. Dessa forma, os marcadores escolhidos para as análises da geração F2 são informativos, o que indica uma grande variação genotípica na população avaliada e sua utilidade em estudos de mapeamento.

Tabela 3. Número de alelos (n), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) dos 11 marcadores analisados nesse estudo.

Cromossomo	Locos	n	Ho	PIC
Cromossomo 24	MNB60	14	0,892	0,877
	DIK5395	9	0,718	0,669
	DIK4426	5	0,716	0,667
	MNB90	8	0,748	0,715
	DIK4971	9	0,869	0,850
Cromossomo 29	INRA143	7	0,736	0,694
	DIK4188	3	0,516	0,402
	BMS1600	5	0,689	0,631
	DIK4966	2	0,357	0,292
	RM040	6	0,678	0,606
	DIK5057	4	0,687	0,624

5.2 Mapas de ligação

Após a genotipagem dos locos de microssatélite dos animais das três gerações (P, F1 e F2), as informações do perfil alélico e da genealogia desses animais estudados foram inseridas no programa *CRIMAP* para a construção dos mapas de ligação dos cromossomos 24 e 29. A ordem dos marcadores e as distâncias entre eles do mapa gerado em nosso estudo (mapa EMBRAPA) e do mapa referência (mapa MARC) podem ser visualizadas na Tabela 4 e na Figura 10.

O comprimento total do mapa do cromossomo 24 foi de 139.1 cM, com médias de distâncias de 34 cM entre os marcadores. Para o cromossomo 29, foi obtido o comprimento total de 121.2 cM, com médias de distâncias de 24 cM entre os marcadores. A ordem dos marcadores é a mesma que a do mapa de referência em ambos os cromossomos, variando apenas a distância entre os marcadores. O mapa EMBRAPA obtido é maior que outros mapas descritos para o cromossomo 29 (BARENDSE *et al*, 1997; REED *et al*, 2002). Uma maior distância entre os

marcadores, acarretando em maior tamanho do cromossomo também foi observado em outros estudos. Em trabalhos utilizando essa mesma população F2 (Gir x Holandês), Miyata (2006) obteve o mapa de ligação do cromossomo 14 com aumento de 71% no comprimento total, quando comparado ao mapa de referência MARC. Gasparin (2007) construiu mapas para os cromossomos 5 e 7, com aumento no comprimento total de 46% e 58%, respectivamente. Columbiano (2007) obteve mapa 87% maior no cromossomo 12. Essas diferenças também foram observadas em outros estudos com diferentes populações (MALTECA *et al*, 2008).

Inúmeros fatores podem influenciar a distância estimada entre os marcadores, e, conseqüentemente, no tamanho total do cromossomo. Dentre esses fatores, podemos destacar o tamanho amostral, número de marcadores utilizados, diferença nos delineamentos experimentais e erros de genotipagem.

O mapa de ligação foi gerado a partir das informações das meioses informativas entre os marcadores. Delineamentos experimentais em que são realizadas análises de famílias permitirão a identificação de meioses informativas mais facilmente do que o acúmulo de informações de genótipos de diferentes populações e delineamentos experimentais. Além disso, existe um limite no número de marcadores que devem ser utilizados, já que, marcadores próximos entre si apresentarão menores taxas de recombinação, não contribuindo para a construção do mapa. Na Tabela 4 é informado o número de meioses informativas obtidas entre os marcadores utilizados para a construção do mapa EMBRAPA. Podem-se perceber diferenças significativas no número de meioses informativas entre os marcadores nos mapas. Um dos exemplos é o loco DIK4966, que apresenta 16 meioses informativas no mapa referência MARC, e 269 no mapa EMBRAPA. Essa e outras variações refletiram diretamente no tamanho final do mapa. Broman (2001)

recomenda a utilização de marcadores com distâncias entre 10 cM e 15 cM em estudos de identificação de QTL, e, caso adicione mais marcadores na região do QTL, a adição terá resultado caso o efeito do QTL for grande ou se o número de animais avaliados aumentarem. Com o aperfeiçoamento das técnicas de seqüenciamento obtidas nos últimos anos, inúmeros mapas com alta densidade de marcadores foram construídos, possibilitando diferentes abordagens de identificação de QTLs no genoma dos indivíduos.

Inúmeros estudos relatam problemas relacionados a erros de genotipagem. Esses erros podem afetar a frequência de haplótipos (KIRK & CARDON, 2002), além de induzir ao aumento no tamanho total de mapas de ligação (GOLTSTEIN *et al*, 1997; HACKETT & BROADFOTT, 2003). Uma taxa de erro de 3% pode afetar análises de desequilíbrio de ligação (AKEY *et al*, 2001) e estimativas de erros de 1% podem gerar perdas de 53-58% da informação da ligação entre locos (TERWILLIGER *et al*, 1990). Como medida de segurança para evitar possíveis erros de genotipagem, as análises dos genótipos foram realizadas dentro das famílias, ou seja, sempre que os eletroferogramas das amplificações dos microssatélites dos indivíduos F2 eram analisados, os pais F1 eram observados conjuntamente, diminuindo a possibilidade de erro, já que as identificações dos alelos eram realizadas na mesma eletroforese capilar.

Tabela 4: Número de meioses informativas e posição dos marcadores nos cromossomos 24 e 29 obtidos no mapa EMBRAPA e no mapa referência (MARC).

	EMBRAPA		MARC	
	Meioses informativas	Posição (cM)	Meioses informativas	Posição (cM)
MNB60	477	0.0	285	3.7
DIK5395	355	31.7	208	15.9
DIK4426	432	55.5	306	32.2
MNB90	374	109.4	349	62.5
DIK4971	496	139.1	274	78.1
INRA143	512	0.0	337	0.0
DIK4188	361	17.6	172	15.5
BMS1600	582	46.3	1147	29.2
DIK4966	269	83.3	16	32.0
RM040	570	87.8	741	40.1
DIK5057	508	121.2	96	69.7

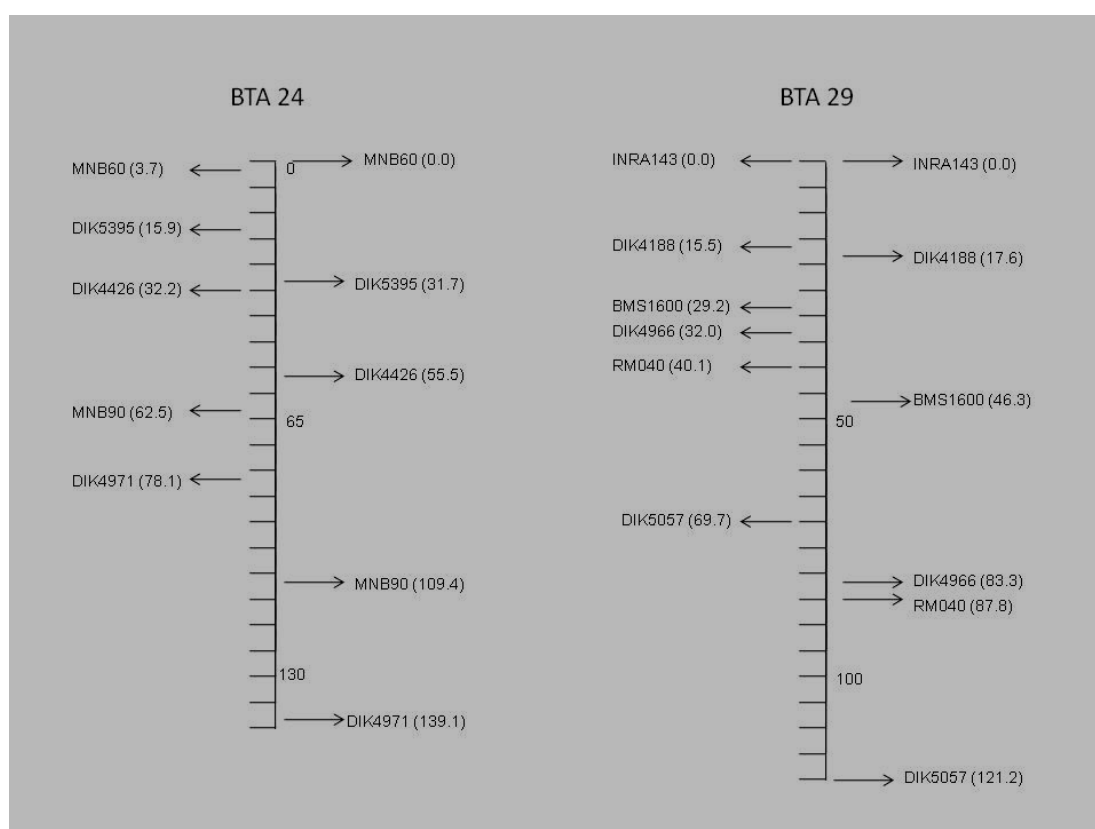


Figura 10: Localização e distância (cM) dos locos de microssatélites nos cromossomos 24 e 29. Os valores à esquerda de cada cromossomo são do mapa referência (MARC) e os valores à direita, do mapa EMBRAPA.

5.3 Medidas de Crescimento

Nos sistemas de produção de bovinos, uma das principais características de interesse no melhoramento genético são as medidas de peso do animal em diferentes épocas, desde o peso ao nascimento, que poderá refletir no peso do animal em diferentes idades futuras e tem implicações importantes na reprodução das matrizes, até o peso final de abate, em bovinos de corte. Portanto, o conhecimento dos genes e das interações entre eles (epistasia) são de fundamental importância para o correto manejo dos animais.

Após a análise de variância (ANOVA), pode-se verificar que os efeitos fixos que influenciaram significativamente as características analisadas são diferentes entre as idades (Tabela 5). Apenas sexo do animal influencia a característica PN. Já PPD foi influenciado pelas características sexo, anoest (ano-estação) e pai. Para as medidas de PP₁₈₀ e PP₃₆₅ apenas o efeito de anoest do nascimento foi significativo. As fontes de variação significativas foram incluídas no modelo de análise do QTL Express. Todas as estimativas apresentaram distribuição normal segundo a estatística de Shapiro-Wilk (W).

Tabela 5. Análise de variância (valores de F) dos efeitos sexo e ano/estação sobre as medidas de peso, utilizando o programa SAS (2002).

Fenótipo	SEXO	ANOEST	PAI
PN	16.57**	1.08	1.83
PPD	23.95**	2.13**	4.12**
PP ₁₈₀	0.02	5.43**	0.55
PP ₃₆₅	0.77	7.41*	1.36

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05

As médias de peso dos animais avaliados variaram tanto entre os sexos quanto no ano/estação em que os animais nasceram. As médias dos quadrados mínimos podem ser visualizadas na Tabela 6.

Para todas as medidas de peso nas diferentes idades, os animais do sexo masculino são maiores que do sexo feminino, característica essa comum na grande maioria dos estudos envolvendo bovinos. Essa variação também pode ser verificada quando são comparadas as médias de todas as medidas de peso em relação ao ano/estação em que esses animais nasceram. Essa diferença chega a 4,38 Kg ao peso ao nascimento (2000_03 e 2005_03), 12,49 Kg no peso à desmama (2000_04 e 2003_01), 51,8 Kg no peso à 180 dias(2000_01 a 2004_02) e 199,79 Kg no peso à um ano (2000_04 e 2002_03). Essas grandes diferenças podem ser explicadas tanto pela grande variabilidade que é gerada em delineamentos de populações F2 quanto pelo efeito materno, que estaria influenciando em todas as épocas (ano/estação).

Definido os parâmetros utilizados no modelo, utilizamos o programa *QTL Express* para a identificação de possíveis QTLs. Foram incluídos, no modelo de análise, efeito aditivo e de dominância do QTL.

Para todas as idades avaliadas, não foi identificado QTL significativo em nenhuma das idades avaliadas no cromossomo 29. Apenas um indicativo de QTL ($P < 0,10$) foi identificado para PN no cromossomo 24 (Figura 11). A distribuição da estatística F e os valores de significância de cada característica pode ser visualizada na Tabela 7.

Tabela 6. Média dos quadrados mínimos das medidas de peso avaliadas. Anoest: ano/estação (01-setembro, outubro, novembro; 02-dezembro, janeiro, fevereiro; 03-março, abril, maio; 04- junho, julho, agosto). EP: Erro Padrão.

	PN		PPD		PP ₁₈₀		PP ₃₆₅	
	Sexo							
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
Macho	31.183	0.416	57.277	0.639	95.66	1.794	152.67	3.497
Fêmea	28.935	0.400	53.698	0.614	95.53	1.549	150,49	3.109
	Ano/estação							
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
2000_01	32.024	2.241	59.957	3.437	127.79	7.657	198,41	12.767
2000_02	30.064	0.930	57.834	1.426	98.82	3.599	175.37	7.442
2000_03	28.886	1.095	57.283	1.679	103.94	4.253	182.97	8.295
2000_04	31.250	2.505	61.750	3.841	114.75	9.647	211.25	13.860
2001_01	30.858	1.303	57.326	1.999	117.67	5.004	164.61	10.335
2001_02	29.451	1.389	55.323	2.131	101.15	5.317	160.30	10.381
2001_03	29.672	1.093	59.942	1.676	109.71	4.291	186.38	7.988
2001_04	28.465	1.002	54.425	1.537	110.20	3.788	167.94	7.903
2002_01	28.500	1.348	51.906	2.067	64.65	3.030	93.94	8.992
2002_02	28.285	1.346	52.522	2.061	92.06	5.002	139.62	9.647
2002_03	29.887	1.153	52.343	1.769	97.94	4.416	117.61	8.564
2002_04	31.719	0.930	55.696	1.426	101.44	3.599	126.51	7.549
2003_01	29.759	1.389	49.939	2.131	83.23	5.317	139.76	8.921
2003_02	27.581	1.045	51.363	1.602	83.51	4.033	145.66	8.032
2003_03	28.947	0.900	55.205	1.380	92.64	3.447	141.71	7.996
2003_04	30.154	0.986	52.141	1.512	94.27	3.840	138.43	8.323
2004_01	31.979	1.447	52.951	2.219	89.50	5.538	138.73	8.981
2004_02	29.589	1.894	55.684	2.904	75.99	7.073	155.29	9.076
2004_03	28.182	1.391	49.259	2.133	77.84	5.636	143.25	9.054
2004_04	31.468	1.772	56.177	2.718	88.62	6.684	143.97	8.336
2005_01	30.652	1.670	60.467	2.561	93.11	6.547	141.98	8.035
2005_02	31.375	1.771	54.000	2.716	91.00	4.454	142.00	9.702
2005_03	33.274	2.246	57.673	3.445	94.99	6,766	147.85	7.979
2005_04	29.399	1.599	60.531	2.452	90.68	6.116	134.37	8.760

Tabela 7: Maior valor observado na estatística F para as medidas: peso ao nascimento (PN), peso padronizado a desmama (PPD), peso padronizado a 180 dias (PP₁₈₀) e peso padronizado a um ano (PP₃₆₅) e seus respectivos valores críticos de significância (P<0,10*, P<0,05** e P<0,01***) para as avaliações no cromossomo 24 e 29.

Fenótipo	Cromossomo 24			Cromossomo 29		
	F	P<0.05	P<0.01	F	P<0.05	P<0.01
PN	5.56*	6.74	10.33	3.61	6.88	10.83
PPD	2,39	6.90	10.74	0,92	7.00	10.48
PP₁₈₀	2.3	6,68	9,65	0.61	6,98	10,12
PP₃₆₅	3.71	6,67	9,86	4.64	7.04	10.38

O primeiro QTL relatado no cromossomo 29 para medidas de crescimento foi descrito por Casas *et al* (2003) em uma população Brahman x Hereford. Foram relatados um QTL sugestivo (P<0,05) para PD, com intervalo de confiança entre 42-57cM. Animais que herdaram o alelo de origem Brahman eram 2,64 Kg mais pesados que os que herdaram o alelo Hereford.

Alexander *et al* (2007) identificaram o segundo QTL para medidas de peso no cromossomo 29. Esse QTL significativo para PN (P<0,01) foi identificado em uma população F2 Wagyu-Limousin, com efeito aditivo de 1,56 ± 0,47 Kg. Também foram reportados QTLs no cromossomo 12 (PN), e no cromossomo 12 e 16 (P₁₈₀).

Apesar de inúmeros QTLs terem sido identificados em diferentes cromossomos para características de crescimento em bovinos, pode-se notar que, em alguns casos, não houve repetibilidade de identificação dessas regiões em diferentes populações. Alguns fatores podem explicar essa situação, como o

número de marcadores utilizados, o tamanho amostral e a diferença entre os delineamentos e estrutura das populações avaliadas.

Entretanto, estudos com a mesma população F_2 (Gir x Holandês) utilizada nesse trabalho, Gasparin *et al* (2005) identificaram um QTL significativo ($P < 0,01$) no cromossomo 5 a 60cM do marcador mais centromérico, com efeito aditivo de -1,6 Kg. O sinal negativo indica que o alelo que contribuiu mais para o PN tem origem na raça Gir. Miyata *et al* (2007) identificaram um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para PN a 1cM do marcador mais centromérico no cromossomo 14, com efeito aditivo de $1,21 \pm 0,438$ Kg, correspondendo a 4% do valor médio da característica. Portanto, podemos admitir que o tamanho amostral e o delineamento utilizado nesse experimento de mapeamento são suficientes para detectar QTLs para PN.

Segundo Casas *et al* (2003), a possibilidade de detectar QTL para PN no cromossomo 5 foi maior em populações cruzadas *Bos p. taurus* e *Bos p. indicus* (KIM *et al*, 2003; CASAS *et al*, 2003; MACHADO *et al*, 2003) do que entre raças *Bos p. taurus* (GROZ & MACNEIL, 2001; Casas *et al*, 1998; Casas *et al*, 2000). Além do desequilíbrio de ligação e aumento da informatividade dos locos marcadores resultantes do processo de cruzamentos, a maior dificuldade em mapear QTLs pode ocorrer caso a frequência do(s) alelos de gene(s) que possam causar variação nos QTLs estejam em baixa frequência nas raças *Bos p. taurus*, aumentando suas frequências quando são cruzados com animais de raças *Bos p. indicus*, já que essas sub-espécies passaram por processos evolutivos distintos, diferindo nas frequências desses alelos.

Dessa forma, devemos ser cautelosos para uma possível utilização dessas informações em programas de melhoramento, sendo necessário determinar quais são os QTLs mais informativos para cada grupo genético. Apesar das

características de crescimento apresentarem altos índices de herdabilidade (GROSZ & MACNEIL, 2001), o efeito do ambiente apresenta uma grande importância no fenótipo final dos indivíduos.

Foram identificadas algumas diferenças nos valores da estatística F quando a análise do QTL para as medidas de peso já mencionadas foram realizadas dentro de cada família. Apesar da população F_2 ter sido formada a partir de cinco machos F_1 acasalados com inúmeras fêmeas F_1 , um desses machos apresentou apenas 10 descendentes. Dessa forma, optamos pela análise apenas dentro das quatro grandes famílias que formaram essa população. Os valores obtidos podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8. Estatística F para as características de crescimento dentro das famílias que compõe a população estudada. *($P < 0,10$); **($P < 0,05$);

	Fenótipo	Família 1	Família 2	Família 3	Família 4
Cromossomo 24	PN	1,2	3,71	7,06*	0,74
	PPD	0,79	6,18	3,04	0,44
	PP ₁₈₀	2,69	0,8	3,0	4,15
	PP ₃₆₅	2,32	3,38	1,16	0,93
Cromossomo29	PN	1,45	0,66	0,98	3,83
	PPD	2,86	0,54	2,02	7,72**
	PP ₁₈₀	0,52	3,32	1,91	0,56
	PP ₃₆₅	2,44	3,81	3,71	1,13

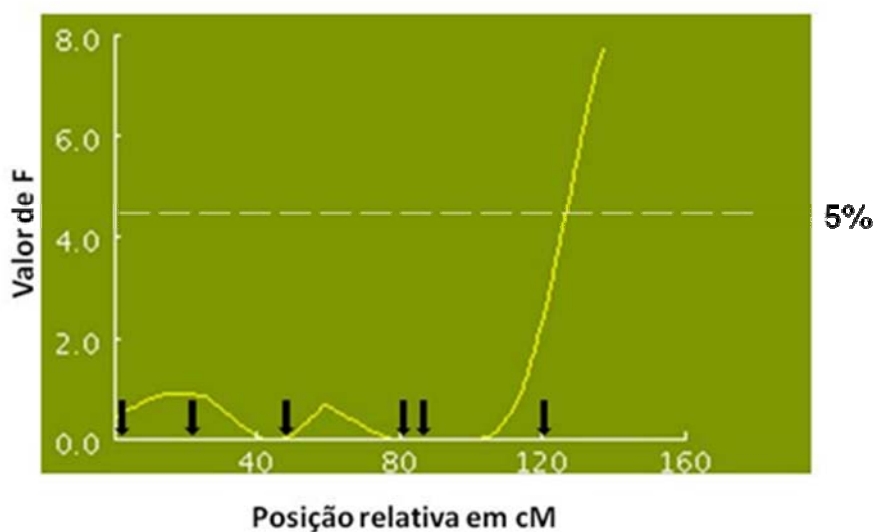


Figura 11: Distribuição da estatística F na localização do QTL para PPD (131 cM) na família 4 encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$.

Nas análises realizadas dentro das famílias, foi possível identificar um QTL indicativo ($P < 0,10$) para peso ao nascimento na família 3, no cromossomo 24. Também foi observado um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para PPD na família 4, no cromossomo 29 (Figura 11). Esses resultados indicam que a variação dentro das famílias pode “mascarar” efeitos de pequenos QTLs dentro de populações, uma vez que a geração F_2 foi obtida pelo cruzamento de raças que não obrigatoriamente são fixadas para alelos alternativos do QTL.

5.4 Resistência ao Carrapato

O entendimento dos fatores genéticos e ambientais que influenciam a resistência dos bovinos ao carrapato é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes no combate desses parasitas. Essa complexidade de fatores ligados à resistência (diferenças fenotípicas, estado fisiológico, diferenças imunológicas entre e dentro de raças, predação do carrapato, ciclo de vida do carrapato, etc) é difícil de ser mensurada, restringindo o cálculo de uma estimativa real da resistência pela ação dos genes relacionados a esse processo. Teodoro (2006) estimou a herdabilidade para o logarítmo da contagem de carrapato +1 dessa população F_2 (Gir x Holandês) em estudo, obtendo um valor de $0,21 \pm 0,12$. Apesar da complexidade do fenótipo, é de grande importância o delineamento experimental para estudos de identificação de regiões do DNA ligados a resistência.

De 2001 a 2007 foram avaliados 340 animais da geração F_2 (Gir x Holandês), com variações na contagem de carrapatos de zero a 792 por animal. Observando os dados da Tabela 9 podemos verificar que a grande maioria dos animais apresentaram padrão de coloração de pelagem 3 (predominantemente escura) e tipo de pêlo 1 (curto e liso), sendo que um maior número de carrapatos foi identificado em animais com essa cor de pelagem, e com o tipo 4 (comprido e lanado).

Tabela 9. Freqüência observada da cor e tipo de pelo da população F2 estudada. **Cor do pêlo** (1 = totalmente clara; 2 = predominância clara; 3 = predominância escura; 4 = totalmente escura); **Tipo do pêlo** (1= curto e liso; 2=curto e lanado; 3= comprido e liso; 4= comprido e lanado).

Característica	1	2	3	4
Cor pêlo	4,2%	14,6%	69,5%	11,4%
Tipo pêlo	84,11%	0,64%	11,52	3,73

Para as análises de QTL das contagens de carrapatos na estação seca e chuvosa, foram realizadas análises de variância para a identificação das características que seriam utilizadas como efeitos fixos e co-variáveis no modelo de análise. Pode-se verificar na Tabela 10 que as contagens de carrapato são influenciadas por diferentes efeitos, dependendo da estação em que as avaliações foram realizadas.

Na estação seca, lote_ano em que ocorreu a infestação, cor da pelagem e espessura da capa foram os efeitos significativos estimados para a contagem de carrapatos. Já na estação chuvosa, apenas lote_ano em que ocorreu a infestação e espessura da capa foram significativos

Após análises dos valores fenotípicos de contagem de carrapato e das informações dos alelos dos microssatélites e genealogia dos animais avaliados, utilizamos o programa *QTL Express* para a identificação de QTLs nos cromossomos 24 e 29. Tanto efeito aditivo como efeito de dominância foram inseridos no modelo.

Tabela 10. Análise de variância dos efeitos ambientais sobre a característica contagem de carrapatos, utilizando o programa SAS (2002). As fontes de variação significativas foram incluídas no modelo de análise do QTL.

Fenótipos	SECA	CHUVA
Sexo	0.02	0.10
Infestação	3.25	1.89
Lote_ano (infestação)	6.40**	14.60**
Idade	1.13	0.29
Cor (pêlo)	5.04**	1.35
Espessura (capa)	5.09**	6.18**
Densidade (pêlo)	0.64	0.39
Comprimento (pêlo)	0.86	2.39

**P<0,01; *P<0,05

Não foi identificado nenhum QTL significativo para resistência a carrapato nos cromossomos 24 e 29 estudados, em nenhuma das estações avaliadas. Os valores da distribuição F e seus respectivos valores de significância podem ser visualizados na Tabela 11. Até o presente momento, não foi relatado nenhum QTL para resistência ao carrapato nesses cromossomos.

Em estudos de resistência ao carrapato utilizando a mesma população experimental F2 (Gir x Holandês), Miyata (2006) identificou um QTL significativo (P<0,01) a 22 cM do centrômero no cromossomo 14, com efeito aditivo de $4,08 \pm 1,20$ carrapatos, valor que corresponde a 19,2% da média da contagem de carrapatos ($21,27 \pm 3,40$). Segundo o autor, esse QTL pode estar relacionado com o gene IL7 (interleucina 7), o qual está presente no cromossomo 9 dos ovinos, correspondente ao cromossomo 14 dos bovinos (BROAD *et al*, 1995).

Azevedo (2006) identificou um QTL para resistência a carrapato no cromossomo 18, com efeito aditivo e dominante, localizado no final do cromossomo. O componente aditivo explicou 1,8% da variação fenotípica e o componente dominante explicam 3,16%. Também identificou um QTL no cromossomo 27, sendo que o efeito fenótipo explicado pelo QTL foi de 1,74% da variação total. Esses QTLs também foram identificados na população F2 (Gir x Holandês).

Gasparin (2007) também identificou QTLs significativos e sugestivos para resistência ao carrapato na população F2 (Gir x Holandês). Quando utilizou apenas o efeito aditivo no modelo de mapeamento do QTL, Gasparin (2007) identificou um QTL significativo no cromossomo 5 ($P < 0,01$) e um indicativo de QTL ($P < 0,10$) no cromossomo 7, ambos para a estação chuvosa. Na estação seca, identificou um QTL sugestivo ($P < 0,05$) no cromossomo sete. Para o QTL identificado no cromossomo cinco, o efeito do QTL explicou 1,7% da variação fenotípica observada, e, para o cromossomo sete, o efeito aditivo do QTL explicou 1,88% dessa variação.

Tabela 11. Maior valor observado na estatística F para as características: \log_{10} _chuva e \log_{10} _seca. A: Efeito aditivo; A+D: efeito aditivo + dominante e valores críticos para $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$.

Efeito	Fenótipo	Cromossomo 24			Cromossomo 29		
		F	P<0,05	P<0,01	F	P<0,05	P<0,01
A	\log_{10} _chuva	3,08	7,10	10,19	3,08	7,10	10,19
	\log_{10} _seca	2,92	6,84	10,18	3,72	7,11	10,10
A+D	\log_{10} _chuva	2,12	5,00	6,69	2,72	5,23	7,15
	\log_{10} _seca	2,99	5,02	6,88	4,07	5,22	7,09

A análise de todos os cromossomos autossômicos da população F2 (Gir x Holandês) por varredura cromossômica, utilizando 181 locos de microssatélites, revelou a presença de diferentes QTLs nas duas épocas em que ocorreram as infestações (dados ainda não publicados). Na estação seca, foram identificados quatro QTLs (cromossomos 5, 11, 21 e 27). Na estação chuvosa, foram identificados 2 QTLs (cromossomo 2 e 10), além de um QTL no cromossomo 6 que foi identificado nas duas estações.

A identificação de regiões no DNA com associação a resistência a carrapato é de grande importância para a determinação de possíveis genes candidatos envolvidos no processo de resistência. A identificação de marcadores moleculares muito próximos as mutações causais (QTNs) ou dos QTNs em si, levaria ao desenvolvimento de indicadores para diagnóstico de animais mais resistentes, o que seria o primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de seleção assistida por marcadores. Abatepaulo *et al* (2008) identificaram 11 SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) específico de *Bos p. indicus* em genes envolvidos no recrutamento e ativação de basófilos e linfócitos Th1, células envolvidas na resistência a patógenos, os quais poderão ser testados em estudos de associação entre os marcadores e valores fenotípicos de resistência.

Outra importante área de pesquisa no entendimento da resistência é a identificação de genes expressos diferencialmente envolvidos na resposta imune dos bovinos ao carrapato, ou em outros processos fisiológicos relacionados (PIPER *et al*, 2007). Nakata (2006), em um estudo de quantificação de mRNA de algumas citocinas em dois grupos de bezerros da raça Nelore (grupo desafiado por infestações de carrapatos e um grupo controle), verificou redução dos níveis de

mRNA de IL-2 (Interleucina-2), tanto na pele como no linfonodo, nos animais desafiados. Carvalho *et al* (2008) quantificaram uma diferença nos níveis circulantes de algumas proteínas de fase aguda de infestação em diferentes grupos genéticos (resistentes e suscetíveis) logo após a infestação. Pode-se verificar que os níveis de haptoglobulina aumentaram significativamente em animais suscetíveis, enquanto a expressão da transferrina diminuiu. Em animais resistentes, a quantidade da proteína amilóide sérica A aumenta, diminuindo a expressão da alfa1-glicoproteína ácida. A quantificação dessas proteínas poderia indicar o grau de infestação a que esses animais estão sendo submetidos, caso esse padrão de expressão for similar nas diferentes raças de bovinos. Bagnall *et al* (2009), em estudos de expressão utilizando a pele de animais infectados e não infectados, verificaram o aumento da expressão de vários genes responsáveis pelo controle de cálcio intracelular em resposta a infestação por carrapato. A expressão desses genes foi maior em animais resistentes do que em suscetíveis, sugerindo que a concentração intracelular de cálcio pode estar envolvida na proteção da pele à infestação do carrapato. Segundo Bagnall *et al* (2009), vários SNPs foram identificados em genes relacionados a sinalização do cálcio nos bovinos, como os genes *CALR*, *CALM3* e *CASQ1*. Entretanto, a associação desses marcadores à resistência explica apenas uma pequena proporção da variação na resistência, necessitando de outros estudos com diferentes grupos genéticos para a validação desses possíveis marcadores. A identificação de genes expressos diferencialmente na relação bovino-carrapato, em diferentes grupos genéticos, possibilitará o manejo mais eficiente no controle do carrapato nos bovinos em geral.

Trabalhos com objetivos de avaliar a expressão diferencial de genes do carrapato em resposta ao sistema imune do hospedeiro, silenciamento de genes

(utilizando a metodologia do RNA de interferência) e identificação de proteínas importantes no processo parasitário do carrapato e identificação de imunossupressores, também estão sendo realizados (VALENZUELA, 2004; NUTTALL & LABUDA, 2004; BROSSARD & WIKEL, 2004; GUERRERO *et al*, 2007; NIJHOF *et al*, 2007; RICCI *et al*, 2007). O entendimento da biologia e genômica do carrapato é crítica para o desenvolvimento de novos métodos de controle.

As informações obtidas em todas essas linhas de pesquisa serão de fundamental importância no combate ao carrapato, já que o principal método de controle utilizado hoje em dia é o tratamento com carrapaticidas, existindo poucas metodologias alternativas a esse tipo de tratamento (SAMISH *et al*, 2004; RAJPUT *et al*, 2006, RIBEIRO *et al*, 2008). A combinação do manejo tradicional, do melhoramento assistido por marcadores e o desenvolvimento de vacinas recombinantes (WILLADSEN, 2004; CANALLES *et al*, 2008) que atuam diretamente em alguma fase do ciclo de vida do carrapato, é a perspectiva futura para a diminuição das perdas na produção pela ação do carrapato.

5.5 Estresse térmico

O clima mundial vem sofrendo consideráveis modificações em todas as regiões do planeta. O IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change* - <http://www.ipcc.ch>) em seu último relatório sobre os impactos sobre o clima mundial, relatou que a temperatura global poderá aumentar entre 1,1°C a 6,4°C nesse século. Dessa forma, com a elevação das temperaturas, será de grande importância o desenvolvimento de práticas de manejo que evitem maiores perdas na produção devido a elevação da temperatura, fator esse que influencia diretamente os níveis de produção dos bovinos.

Dentro desse contexto, o conhecimento dos genes que atuam na regulação da temperatura corpórea dos bovinos, dos processos fisiológicos relacionados e das variações ambientais que interferem no desempenho dos bovinos (temperatura e umidade) é de grande importância, podendo auxiliar na seleção de animais mais adaptados para condições climáticas mais extremas.

Na Tabela 12 podem ser observadas as médias e os desvios padrões de algumas características relacionadas ao estresse térmico nos bovinos. Espessura, densidade e comprimento do pelo são importantes na dissipação do calor pela pele nos bovinos. Finch *et al* (1984) relataram que a espessura e densidade dos pêlos típicos das raças européias reduzem o fluxo de calor via condução e convecção, aumentando os efeitos do estresse térmico. Silva (2000 b), em experimentos de tosa do pelame em bovinos, observou a importância do pelame nas trocas de calor dos bovinos com o ambiente. Segundo a Tabela 9, pode-se observar que cerca de 84% dos animais apresentaram pelo curto e liso e coloração predominantemente escuro. Estudos descrevem que cores de pelagem mais claras são melhores que escuras na dissipação de calor (FINCH *et al*, 1984; FINCH *et al*, 1985). A cor e o tipo de pelo, além de influenciarem nas trocas de calor dos bovinos com o ambiente, também apresentam associação com diferentes níveis de infestação por ectoparasitas (GASPARIN, 2007).

Tabela 12: Média e desvio-padrão (DP) das características do pêlo (mm) nos animais avaliados na estação das chuvas e da seca.

Característica	Média - DP	
	Chuva	Seca
Espessura (pêlo)	3,63 ± 0,47	4,63 ± 1,70
Densidade (pêlo)	185,17 ± 7,9	177,85 ± 33,23
Comprimento (pêlo)	1,04 ± 0,03	1,81 ± 0,42

Na Tabela 13 são indicados os valores obtidos dos parâmetros fisiológicos relacionados ao estresse. Pode-se notar que as médias das três características foram maiores após os desafios na câmara bioclimática, sob estresse térmico. As variações observadas entre as medidas manhã-tarde na estação das chuvas e na estação seca foram similares na temperatura retal e temperatura da pele. Uma maior diferença foi observada nos movimentos respiratórios, sendo os valores maiores no período da tarde na estação seca do que na estação chuvosa. Aguiar *et al* (1996) relataram que a temperatura retal e os movimentos respiratórios foram mais elevadas a tarde do que pela manhã em bovinos da raça Holandesa, já que as temperaturas nesse período foram maiores em animais ao ar livre.

Os valores de movimento respiratórios variaram de 8 a 44 movimentos/minuto pela manhã e de 36 a 180 movimentos/minuto pela tarde. As observações da taxa de sudação variaram de 45,82 a 640,78 g/m²/h na estação chuvosa e entre 66,52 e 725,41 g/m²/h na estação seca. Essa grande variação é refletida nos respectivos desvios-padrões das médias dessas características (Tabela 13).

Tabela 13: Média e desvio padrão (DP) dos parâmetros fisiológicos avaliados na população. Os valores de taxa de sudação são referentes apenas as estações chuva/seca. Temperatura retal e Temperatura da pele ($^{\circ}\text{C}$); Movimentos respiratórios (n° de movimentos/minutos); Taxa de sudação ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$).

Fenótipo	Chuva				Seca			
	Manhã		Tarde		Manhã		Tarde	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Temperatura Retal	38,08 \pm 0,64		40,75 \pm 0,18		38.17 \pm 0,42		40.19 \pm 0.35	
Mov. Respiratórios	17.3 \pm 4,68		122 \pm 5,67		16.4 \pm 9,90		104,9 \pm 22,63	
Temperatura pele	27,59 \pm 0,79		42,82 \pm 0,08		28,73 \pm 1,77		42,54 \pm 5,16	
Taxa sudação	-		270,96 \pm 128,87		-		265,94 \pm 138,06	

De acordo com as análises de variância realizadas com o auxílio do programa SAS, diferentes características influenciaram os parâmetros analisados, dependendo da época das observações. Para Temperatura retal, o efeito da combinação mês_ano em que ocorreu a avaliação foi significativo na estação seca; Tipo (pêlo), cor (pêlo) e mês_ano foram significativos na estação chuvosa. Ano_est foi significativo para movimento respiratório e taxa de sudção em ambas as estações da análise. Os valores obtidos na ANOVA podem ser observados na Tabela 14.

Após as análises realizadas pelo programa QTL Express utilizando como modelo de análises, efeito fixo e co-variáveis já mencionados, além do efeito aditivo e de dominância, foi identificado um QTL significativo ($P < 0,01$) para taxa de sudção na estação seca no cromossomo 29, e um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para a característica movimentos respiratórios na estação chuva, também no cromossomo 29. Para temperatura retal, foi identificado um indicativo de QTL ($P < 0,10$) no cromossomo 24, na estação chuva. Os valores da estatística F obtidos em todas as situações de análises podem ser vistos na Tabela 15 e a distribuição da estatística F dos QTL relatados nas Figuras 11 e 12.

Tabela 14. Análise de variância das medidas de Estresse térmico. Δ Temperatura Retal, Δ Movimento Respiratório e taxa de sudação.

Características	Δ Temperatura Retal		Δ Mov. Respiratório		Taxa de sudação	
	SECA	CHUVA	SECA	CHUVA	SECA	CHUVA
Sexo	0,95	0,07	3,17	0,28	0,20	1,45
Tipo (pêlo)	1,05	7,53**	0,76	1,00	0,26	1,12
Cor (pêlo)	2,65	5,98**	1,24	0,14	1,33	0,50
Comprimento (pêlo)	0,71	0,79	0,70	1,09	0,36	0,95
Mês_ano	19,97**	9,95**	23,81**	9,15**	4,77**	6,92**

**P<0,01; *P<0,05

Tabela 15. Valores da estatística F e seus respectivos valores de P obtidos para as características Δ Movimento respiratório, Δ Temperatura retal e taxa de sudação nos cromossomos 24 e 29. Os valores críticos do teste F para os níveis de significância de 10 %, 5% e 1% são indicados nas colunas P<0,05 e P<0,01, respectivamente.

Fenótipo	Estação	Cromossomo 24			Cromossomo 29		
		F	P<0.05	P<0.01	F	P<0.05	P<0.01
Δ Movimento respiratório		0,53	6,95	10,39	3,49	7,22	10,64
Δ Temperatura retal	SECA	3,38	6,92	10,43	1,74	7,11	10,55
Taxa sudação		0,66	6,93	10,32	1,14	6,99	10,07
Δ Movimento respiratório		0,94	6,94	9,92	9,29**	7,20	10,31
Δ Temperatura retal	CHUVA	6,64*	6,68	10,06	2,07	6,91	10,27
Taxa sudação		1,08	6,85	9,99	10,47***	6,95	10,24

* (P<0,10); ** (P<0,05); *** (P<0,01)

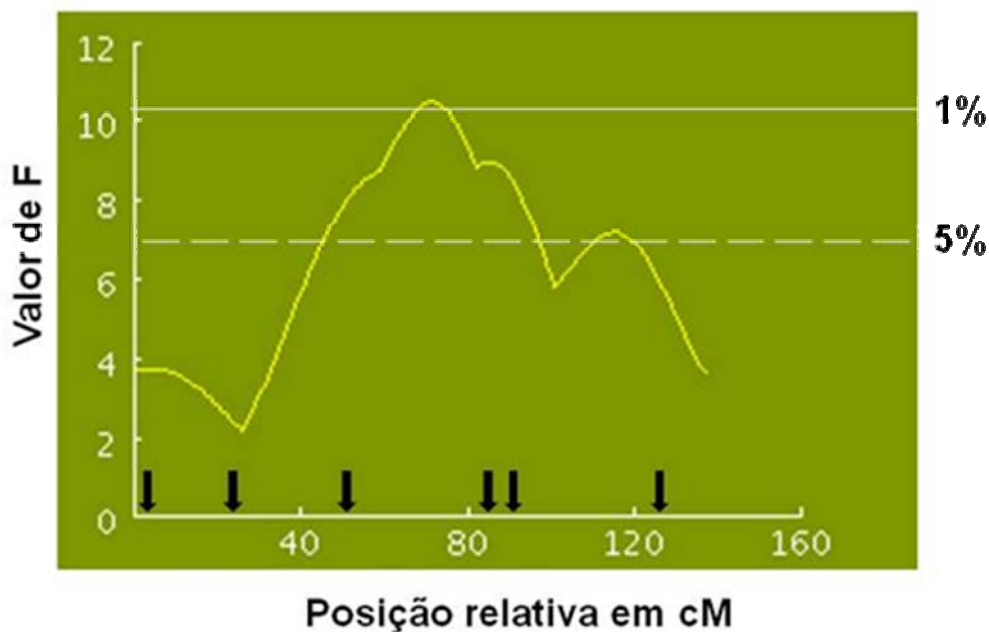


Figura 12: Distribuição da estatística F na localização do QTL para taxa de sudorese (72 cM) encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$ e a linha superior $P < 0,01$.

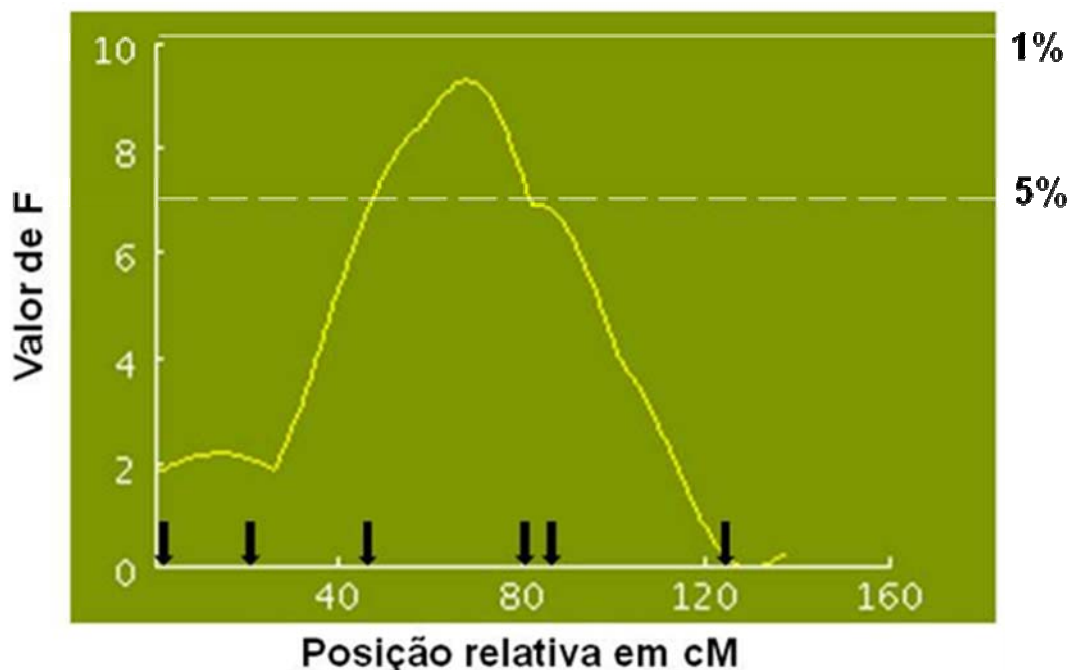


Figura 13: Distribuição da estatística F na localização do QTL para movimento respiratório (68 cM) encontrado no cromossomo 29. As setas indicam as posições dos marcadores ao longo do cromossomo. A linha tracejada indica $P < 0,05$ e a linha superior $P < 0,01$.

Até o presente momento, não foram descritos QTLs para frequência respiratória nos cromossomos de bovinos. Uma busca na região do QTL não revelou nenhum gene considerado candidato a influenciar essa característica no cromossomo 29 dos bovinos. Além disso, a frequência respiratória é influenciada direta ou indiretamente por inúmeros fatores, como níveis de oxigênio no sangue, ação de hormônios e peptídeos, etc.

Para taxa de sudação, Columbian (2007) identificou um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para taxa de sudação no cromossomo 11 para as avaliações realizadas no inverno, na mesma população experimental avaliada nesse trabalho. Dados da literatura não indicam nenhum gene que possa influenciar a sudação em bovinos no cromossomo 29.

Segundo Amarante *et al* (1998), o gene da queratina (*KRN1*) está localizado no cromossomo 29 bovino. A queratina é uma proteína fibrosa abundante na pele e nos pêlos dos mamíferos. Sua conformação tridimensional possibilita, aos microfilamentos da queratina, uma maior resistência, elasticidade e impermeabilidade a água. A impermeabilidade da pele está diretamente relacionada a proteção dos organismos na perda de água para o meio ambiente. Entretanto, não existe nenhum estudo que associe taxa de sudação com níveis de queratina na pele dos bovinos.

Nos humanos, a interrupção parcial dos canais das glândulas sudoríparas pela queratina leva a produção de pequenas erupções na pele, também conhecidas como brotoejas. Dessa forma, a queratina dificulta a passagem do suor para o exterior do organismo em resposta ao aumento da temperatura interna. Portanto, de forma indireta, a produção de queratina pode influenciar a sudação, podendo interferir na regulação da temperatura.

Apesar dessa possível interação, outros estudos devem ser realizados para a identificação de QTLs associados a taxa de sudação no cromossomo 29 em diferentes grupos genéticos, para que alguma conclusão concreta possa ser inferida.

Para outras características relacionadas ao estresse térmico, Columbiano (2007) identificou a existência de um QTL significativo ($P < 0,01$) para comprimento do pêlo localizado a 72 cM do cromossomo 10, na estação verão na mesma população F_2 (Gir x Holandês) desse estudo. No cromossomo 12, identificou um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para comprimento de pêlo com os dados coletados no inverno. Os efeitos do QTL foram de 7,82%, 10,21% e 9,27%, respectivamente.

A análise de todos os cromossomos para a identificação de QTL associados ao estresse térmico na população experimental F_2 (Gir x Holandês) resultou no mapeamento de 16 QTL, tanto com efeito aditivo quanto com efeito aditivo + dominante (dados não publicados). Para a característica temperatura retal, foram identificados QTLs nos cromossomos 3, 6, 7, 8, 21 e 26. Para a característica frequência respiratória, foram identificados QTLs nos cromossomos 4, 6, 26 e 29, sendo o QTL no cromossomo 29 apresentado acima. Para a taxa de sudação, foram identificados QTL nos cromossomos 3, 13, 23 e 29, esse último descrito no presente trabalho.

Identificados os QTLs, é possível calcular o valor aditivo do alelo QTL na média da característica avaliada na população F_2 (Tabela 16). Valores positivos estão relacionados com uma maior contribuição da característica oriunda dos alelos de origem holandesa, e, valores negativos, de origem Gir.

Os resultados indicam que, tanto para movimento respiratório quanto para temperatura retal, os alelos de origem holandesa foram os que influenciaram no

Tabela 16: Valores de efeito aditivo e efeito dos QTLs observados.

Característica	Cromossomo	F	Efeito Aditivo	Efeito do QTL
Δ Mov. Respiratório	29 (chuva)	9,29	6,21±2,04	2,59%
Δ Temperatura retal	24 (chuva)	6,64	0,17±0,06	2,35%
Taxa sudação	29 (chuva)	10,47	-35,05±10,83	3,00%

aumento dos respectivos fenótipos. Já para taxa de sudação, que apresenta um valor de efeito aditivo negativo (-35,05), indica que os alelos de origem Gir foram os que contribuíram para o aumento da característica. Essa contribuição dos alelos Gir para uma maior taxa de sudação pode estar relacionada com a diferença na estrutura das glândulas sudoríparas que as sub-espécies de bovinos possuem (PAN, 1964)

Os valores citados acima estão de acordo com os artigos já mencionados sobre as diferenças genéticas e fenotípicas entre os *Bos p. taurus* e *Bos p. Indicus* em relação à diferença na resposta as variações da temperatura.

As percentagens da variação fenotípica que podem ser explicadas pelos QTL são de: 2,59% (Δ Movimento respiratório), 2,35% (Δ Temperatura retal) e 3%(Taxa sudação). Esses valores são menores do que os observados por Columbian (2007), para outros QTL descritos na mesma população.

Os dados gerados nesse estudo de identificação de QTL para características relacionadas ao estresse térmico são de grande importância, possibilitando o delineamento mais detalhado para novas pesquisas nessa área. Além disso, faz-se necessário o refinamento do intervalo de confiança dos QTLs já identificados, o que permitiria uma redução no número de genes dentro desse intervalo, os quais

poderão ser avaliados como possíveis genes candidatos relacionados ao estresse térmico em bovinos.

As informações obtidas nesse estudo devem ser investigadas em diferentes raças de bovinos, e, caso esses QTLs também sejam identificados em outros grupos de animais, essas regiões poderão ser avaliadas como potenciais em estudos de melhoramento assistido por marcadores.

6. Conclusões

A varredura dos cromossomos 24 e 29 utilizando marcadores microsatélites na população F_2 (Gir x Holandês) com a finalidade de identificar QTLs relacionados a medidas de peso, resistência a carrapato e tolerância ao estresse térmico mostrou-se adequada. Foi identificado um QTL significativo ($P < 0,01$) para taxa de sudação na estação das chuvas, no cromossomo 29, assim como um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para frequência respiratória na estação das chuvas no cromossomo 29.

Análises dentro das famílias que compuseram a população F_2 também revelaram um indicativo de QTL ($P < 0,10$) para PN e um QTL sugestivo ($P < 0,05$) para PPD nas famílias 3 e 4, respectivamente, indicando que QTLs com efeitos menores podem ser “mascarados” quando analisados na população total.

O mapeamento fino dessas duas regiões de QTL, associado à recente conclusão da anotação do genoma bovino, deverão revelar genes candidatos para a investigação das mutações responsáveis por essas variações.

7. Referências Bibliográficas

ABATEPAULO, A.R.; CAETANO, A.R.; MENDES, C.T. JR.; CARVALHO, W.A.; FERREIRA, B.R.; de MIRANDA SANTOS, I.K. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Animal Genetics**, Jun;39(3):328-9, 2008.

Associação Brasileira de Bovinos da Raça Holandesa (ABCBRH). Disponível em: <http://www.gadoholandes.com.br/> Acesso: 19/10/2008.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). Disponível em: www.abiec.com.br Acesso: 20/02/2009.

AGUIAR, I.S.; BACCARI JR., GOTTPPEHALK. Produção de leite de vacas holandesas em função da temperatura do ar e do índice de temperatura e umidade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996. Fortaleza, **Anais...**p.617-619.

AKEY, J. M., ZHANG, K., XIONG, M. M., DORIS, P. & JIN, L. The effect that genotyping errors have on the robustness of common linkage-disequilibrium measures. **Am. J. Hum. Genet.** 68, 1447–1456, 2001.

AL-HAIDARY, A., SPIERS, D.E., ROTTINGHAUS, G.E., GARNER, G.B., ELLERSIECK, M.R. Thermoregulatory ability of beef heifers following intake of endophyte-infected tall fescue during controlled heat challenge. **J. Anim. Sci.** 79, 1780–1788, 2001.

ALEXANDER, L.J.; GEARY, T.W.; SNELLING, W.M.; MACNEIL, M.D. Quantitative trait loci with additive effects on growth and carcass traits in a Wagyu-Limousin F₂ population. **Animal Genetics**, 38, 413-416, 2007.

ALLAN, M.F., KUEHN, L.A., CUSHMAN, R.A., SNELLING, W.M., ECHTERNKAMP, S.E., THALLMAN, R.M. Confirmation of quantitative trait loci using a low-density single nucleotide polymorphism map for twinning and ovulation rate on bovine chromosome 5. **J Anim Sci.** 87(1):46-56, 2009.

AMARANTE, M.R.; LOPES, C.R.; WOMACK, J.E. KRN1 maps to bovine chromosome 29. **Anim Genet.**, 29:323, 1998.

ANDRADE, A.B.F. **Aspectos genéticos e ambientais da resistência a *Boophilus microplus* de bovinos da raça Gir, da Estação Experimental da EPAMIG.** Dissertação de Mestrado. 79p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP Jaboticabal, 1998.

ASHTON, G.C., SEIFERT, G.W., & FRANCIS, J. An association between serum amylase phenotype and tick infestation in cattle. **Australian Journal of Biological Science**, 21, 303-308, 1968.

- ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; WELLER, J.I.; RON, M.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; LEWIN, H.A. Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and calving ease in Holstein-Friesian cattle. **J. Dairy Science**, 88(11):4111-9, 2005.
- AZEVEDO, A.L.S. **Varredura Genômica para QTL associados a resistência a *Boophilus microplus* em bovinos**. Dissertação de mestrado. 53p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- BAGNALL, N.; GOUGH, J.; CADOGAN, L.; BURNS, B.; KONGSUWAN, K. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation. **Parasite Immunol.**,31(4):177-87, 2009.
- BARENDSE, W. *et al.* A preliminary map of the bovine genome. **Nature Genetics**, 6, 227-235, 1994.
- BARENDSE, W., *et al.* A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, (8) 29-36, 1997.
- BARSH, G.S. Coat colour mutation, Animals. New York: **Academic Press**, 2001.
- BISHOP, M.D. *et al.* A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136, 619-639, 1994.
- BOLLONGINO, R.; EDWARDS, C.J., ALT, K.W.; BURGER, J.; BRADLEY, D.G. Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA. **Biology letters**, 2(1): 155–159, 2005.
- BOTSTEIN, D., *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, 32:314-331, 1980.
- BRADLEY, D.G.; MACHUGH, D.E.; CUNNINGHAM, P.; LOFTUS, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93, 5131–5135, 1996.
- BRADLEY, D.G.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; MACHUGH, D.E. Genetics and domestic cattle origins. **Evolutionary Anthropology**, 6, 79-86, 1998.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: www.agricultura.gov.br/ Acesso em: 12/01/2009.
- BRITO, L.F., SILVA, A.E., BARBOSA, R.T., KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, 61, 511–528, 2004.
- BROAD, T.E. *et al.* Assignment of five loci from human chromosome 8q onto sheep chromosome 9. **Cytogenet. Cell Genet.**, 68:102-106, 1995.

- BROMAN, K. W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. Reprinted by: **Lab Animal**, 30(7):44-52, 2001.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical Veterinary Entomology**, Oxford, (11), 270-276, 1997.
- BROSSARD, M; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, 129 Suppl:161-176, 2004.
- CANALLES, M., de la LASTRA, J.M.P., NARANJO, V., NIJHOF, A.M., HOPE, M., JONGEJAN, F., DE LA FUENTE, J. Expression of recombinante *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*, **BMC Biotechnology**, 8-14, 2008.
- CARDOSO, V., ALBUQUERQUE, L.G. DE, FRIES, L.A. Estimativas de herdabilidade a resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte. Porto Alegre, 1999. **Anais... XXXVI Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Resumo dos Trabalhos Apresentados**, 1999. p. 139.
- CARVALHO, W.A.; BECHARA, G.H.; MORÉ, D.D.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S.; de MIRANDA SANTOS, I.K.F. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Experimental Parasitology**, 118(4):587-91, 2008.
- CASAS, E., *et al.* Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **J. Animal Science**, (81) 2976-2983, 2003.
- CASAS E.; SHACKELFORD, S.D.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; and KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J. Anim. Sci.**, 78:560–569, 2000.
- CASAS, E.; KEELE, J.W.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; KAPPES, S.M.; STONE, R.T. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, 76, 468–73, 1998.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait loci mapping. **Genetics**, 138, 963-971, 1994.
- COLLIER, R.J.; DAHL, G.E; VANBAALE, M.J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, (89) 1244-1253, 2006.
- COLUMBIANO, V. S. **Identificação de QTL nos cromossomos 10, 11 e 12 associados ao estresse calórico em bovinos**. Dissertação de mestrado. 49f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

Daetwyler, H.D.; Schenkel, F.S.; Sargolzaei, M.; Robinson, J.A. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. **J. Dairy Sci.** 91(8):3225-36, 2008.

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

DRUET, T.; FRITZ, S.; BOUSSAHA, M.; BEN-JEMAA, S.; GUILLAUME, F.; DERBALA, D.; ZELENKA, D.; LECHNER, D.; CHARON, C.; BOICHARD, D.; GUT, I.G.; EGGEN, A.; GAUTIER, M. Fine mapping of quantitative trait loci affecting female fertility in dairy cattle on BTA 3 using a dense single nucleotide polymorphism map. **Genetics**, 178 (4) : 2227-2235, 2008.

EDWARDS, C.J.; BAIRD, J.F.; MACHUGH, 2007. Taurine and zebu admixture in Near Eastern cattle: a comparison of mitochondrial, autosomal and Y-chromosomal data. **Animal Genetics**, 38, 520-524, 2007.

EPSTEIN, H.; MASON, I.L. Cattle. In: Evolution of domesticated animals. Mason, I.L. (ed). Logman (London), p.6-27. 1984

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. Introduction of quantitative genetics. Edinburg Gate, Harlow: Longman Group, 365p, 1996.

FARIA, F.J.; FILHO, A.E.; MADALENA, F.E.; JOSAHKIAN, L.A. Pedigree analysis in the Brazilian Zebu breeds. **J Anim Breed Genet.**, 126(2):148-53, 2009.

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

FINCH, V.A.; BENNETT, I.L.; HOLMES, C.R. Coat colour in cattle: effect on thermal balance, behaviour and growth, and relationship with coat type. **J. Agric. Sci.**, (Camb.) 102, 141-147, 1984.

FINCH, V.A. Comparison of non-evaporative heat transfer in different cattle breeds. **Aust. J. Agric. Res.**, 36, 497-508, 1985.

FRIES, R.; RUVINSKY, A. Genetics of cattle. Wallingford, Oxon: CAB International, 1999.

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

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. **Caderno técnico 36**, Juiz de Fora, MG, 2003.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L.L.; MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; REGITANO, L.C.A. Quantitative trait locus affecting birth weight on bovine chromosome 5 in a F2 Gyr xHolstein population. **Genetics and Molecular Biology**, 28, 670–676, 2005.

GASPARIN, G.; MYATA, M.; COUTINHO, L.L.; MARTINEZ, M.L.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; SONSTERGARD, 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**, 38, 453-459, 2007.

GASPARIN, G. **Mapeamento de QTL para resistência a parasitas e características de crescimento nos cromossomos cinco e sete de uma população experimental F2 (Gir x Holandês)**. Tese de Doutorado, 2007, Universidade Federal de São Carlos, SP. 81p.

GEBREMEHDIN, K. G.; WU, B. A model of evaporative cooling of wet skin surface and fur layer. **J. Thermal Biol.**, 26:537–545, 2001.

GIROLANDO (Associação Brasileira dos Criadores de Girolando) – Disponível em: www.girolando.com.br. Acesso em: 14/11/2008.

GOLDAMMER, T.; BRUNNER, R.; SCHWERIN, M. Comparative analysis of chromosome structure in *Bos taurus* and *B. indicus* by FISH using region-specific, microdissected, and locus-specific DNA probes. **Cytogenet. Cell Genet.** 77: 238-241, 1997.

GOLDSTEIN, D. R.; ZHAO, H. Y.; SPEED, T. P. The effects of genotyping errors and interference on estimation of genetic distance. **Hum. Hered.**, 47, 86–100, 1997.

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

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato**. Porto Alegre, edição do autor, 1975, 79p.

GÖTHERSTRÖM, A.; ANDERUNG, C.; HELLBORG, L.; ELBURG, R. *et al.* Cattle domestication in the Near East was followed by Hybridization with aurochs bulls in Europe. **Proc R Soc B.**, 272: 2345–2350, 2005.

GREEN, P., FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRIMAP, Version 2.4**. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA, 1990.

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

GUERRERO, F.D.; BENDELE, K.G.; CHEN, A.C.; LI, A.Y.; MILLER, R.J.; PLEASANCE, E.; VARHOL, R.; ROUSSEAU, M.E.; NENE, V.M. Serial analysis of

gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. **Insect Mol Biol.**, 16(1):49-60, 2007.

HACKETT, C. A.; BROADFOTT, L. B. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. **Heredity**, 90, 33–38, 2003.

HALLERMAN, E.M. *et al.* Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphism using homologous and heterologous deoxyribonucleic acid probes. **Journal of Dairy Science**, 71, 3378-3389, 1988.

HANOTTE, O.; TAWAH, C.; BRADLEY, D.G.; OKOMO, M.; VERJEE, Y.; OCHIENG, J.; REGE, J.E. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. **Mol Ecol.**, Apr;9(4):387-96, 2000.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **J. Anim. Sci.** 77(Suppl. 2):36–50, 1999.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, 82–83:349–360, 2004.

HIENDLEDER, S.; LEWALSKI, H.; JANKE, A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. **Cytogenet Genome Res.**, 120(1-2):150-6, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em: 20/02/2009.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M.; MIZOGUCHI, Y.; HIRANO, T.; ITOH, T.; WATANABE, T.; REED, K.M.; SNELLING, W.M.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W.; BENNETT, G.L.; SUGIMOTO, Y. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. **Genome Res.**, 14:1987-98, 2004.

IPCC (Intergovernmental Panel of Climate Change) – Disponível em: <http://www.ipcc.ch>. Acesso em: 08/05/2009.

JUSZCZUK-KUBIAK, E.; SAKOWSKI, T.; FLISIKOWSKI, K.; WICINSKA, K.; OPRZADEK, J.; ROSOCHACKI, S.J. Bovine μ -calpain (*CAPN1*) gene: new SNP within intron 14. **J. Appl. Genet.**, 45(4),457-460, 2004.

KANTANEN, J.; OLSAKER, I.; HOLM, L.E.; LIEN, S.; VILKKI, J.; BRUSGAARD, K.; EYTHORSODOTTIR, E.; DANELL, B.; ADALSTEINSSON, S. Genetic diversity and

population structure of 20 North European cattle breeds. **J Hered.**, 91(6):446-57, 2000.

KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J.; de MIRANDA SANTOS, I.K. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, 110:12–21, 2005.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v. 5, p. 47-56, 1989.

KIKKAWA, Y.; TAKADA, T.; SUTOPO,W.; NOMURA, K.; NAMIKAWA, T.; YONEKAWA, H.; AMANO, T. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. **Anim Genet.**, 34(2):96-101, 2003.

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

KIRK, K. M.; CARDON, L. R. The impact of genotyping error on haplotype reconstruction and frequency estimation. **Eur. J. Hum. Genet.**, 10, 616–622, 2002.

LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, 121, 185-199, 1989.

LINDQUIST S. The heat-shock response. **Annu Rev Biochem.**, 55: 1151–1191, 1986.

LIU, B.H. Statistical Genomics: linkage, mapping and QTL analysis. **CRC Press**, USA, 611p, 1998.

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

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 980p, 1998.

MACHADO, M.B.B.; ALENCAR, M.M.; PEREIRA, A.P.; OLIVEIRA, H.N.; CASAS, E.; COUTINHO L.L.; REGITANO, L.C.A. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genet Mol Biol.**, 26:259-265, 2003.

MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, 146, 1071–1086, 1997.

MACKAY, T.F.C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Reviews in Genetics**, 35:303-339, 2001.

MAIA, A. S. C.; SILVA, R. G.; BERTIPAGLIA, E. C. A. Características do pelame de vacas Holandesas em um ambiente tropical: Um estudo genético e adaptativo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32:843–853, 2003.

MALTECCA, C.; WEIGEL, K. A.; KHATIB, H.; COWAN, M.; BAGNATO, A. Whole-genome scan for quantitative trait loci associated with birth weight, gestation length and passive immune transfer in a Holstein x Jersey crossbred population. **Animal Genetics**, 40(1):27-34, 2008.

MARIASEGARAM, M.; CHASE, C.C.; CHAPARRO, J.X.; OLSON, T.A.; BRENNEMAN, R.A.; NIEDZ, R.P. The slick hair locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. **Animal Genetics**, 38, 54-59, 2007.

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

MARTINEZ, O. Delineamentos experimentais para a detecção de locos de características quantitativas In____: **Biologia Molecular Aplicada ao melhoramento animal**, 2001.

MARTINS LF, MILAZZOTTO MP, FEITOSA WB, COUTINHO AR, SIMOES R, MARQUES MG, ASSUMPCAO ME, VISINTIN JA.(2008) Sequence variation of the alpha-lactalbumin gene in Holstein and Nellore cows. **Anim Biotechnol.**,19(3):194-8, 2008.

MEE, J.F. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. **The Veterinary Journal** 176: 93–101, 2008.

MIYATA, M. **Mapeamento de QTLs para características de crescimento e de resistência no cromossomo 14 de bovinos F2 provenientes de um cruzamento Gir x Holandês**. Dissertação de mestrado, 2006, Universidade Federal de São Carlos, SP. 61p.

MIYATA, M.; GASPARIN, G.; COUTINHO, L.L.; MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M.A.; SILVA M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; SONSTEGARD, T.S.; ROSARIO, M.F.; REGITANO, L.C.A. QTL mapping for growth traits on bovine chromosome 14. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 2, 364-369, 2007.

MORRIS, C.A. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. **Vet J.**, 174(3):481-91, 2007.

NAKATA, L. C. **Níveis de citocinas em bovinos (*Bos indicus*) desafiados com o carrapato *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887)**. Dissertação de mestrado, 2006, Universidade Federal de São Carlos, SP. 77p.

NIJHOF, A.M.; TAOUIK, A.; de la FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; VRIES, E.; JONGEJAN, F. Gene silencing of the tick protective antigens, *Bm86*, *Bm91* and *subolesin*, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. **International Journal of Parasitology**, 37(6):653-662, 2007.

NUTTALL, P.A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, 129 Suppl:177-89, 2004.

OLSON, T.A.; AVILA-CHYTIL, M.; CHASE, C.C.; JR, P.J.H.; COLLEMAN, S.W. **Impact of hair coat differences on rectal temperature, skin temperature and respiration rate of Holstein x Senepol crosses in Florida**. Senepol Symposium, St. Croix, USVI, November, 2002.

OLSON, T. A.; LUCENA, C; C. C. CHASE, JR., AND A. C. HAMMOND. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 81:80–90, 2003.

PAGE, B.T.; CASAS, E.; HEATON, M.P.; CULLEN, N.G.; HYNDMAN, D.L.; MORRIS, C.A.; CRAWFORD, A.M.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J.W.; SMITH, T.P.L. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Anim. Sci.**, 80:3077-3085, 2002.

PAYNE, W. J. A., 1991 Domestication: a forward step in civilization, pp. 51-72. In _____. **Cattle Gen. Res.**, edited by C. G. HICKMAN. Elsevier, Amsterdam.

PAN, Y. S. Variation in hair characters over the body in Sahiwal, Zebu and Jersey cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, 15:346–356, 1964.

PANEPUCCI, L.L.L.; ALENCAR, M.M.; OLIVEIRA, G.P. Estudo preliminar da relação entre marcadores genéticos-bioquímicos e resistência a carrapato em gado de corte, **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1989.

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BAGNALL, N.H.; KONGSUWAN, K.K.; LEW, A.E.; JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle infested with cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 126: 110-119, 2007.

RAJPUT, Z.I.; HU, S.; CHEN, W.; ARIJO, A.G.; XIAO, C. Importance of tick and their chemical and immunological control in livestock. **Journal of Zhejiang University**, (11):912-921, 2006.

REED, K.M.; IHARA, N.; MARIANI, P.; MENDOZA, K.M.; JENSEN, L.E.; BELLAVIA, R.; PONCE, de LEÓN, F.A.; BENNETT, G.L.; SUGIMOTO, Y.; BEATTIE, C.W. High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker

development. **Cytogenetic and Genome Research**, (96):1-4, 2002.

REINSCH, N.; THOMSEN, H.; XU, N.; BRINK, M.; LOOFT, C.; KALM, E.; BROCKMANN, G.A.; GRUPE, S.; KÜHN, C.; SCHWERIN, M.; LEYHE, B.; HIENDLEDER, S.; ERHARDT, G.; MEDJUGORAC, I.; RUSS, I.; FÖRSTER, M.; REENTS, R.; AVERDUNK, G. A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. **J Hered.**,90(6):629-34, 1999.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in tick/host interactions. **Expl Appl Acarol.**, 7:15–20, 1989.

RIBEIRO, V.L.S.; ROLIM, V.; BORDIGNON, ., HENRIQUES, A.T.; DORNELES, G.G.; LIMBERGER, R.P.; VON POSER, G. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol. Res.**, 102:531-535, 2008.

RICCI, C.G.; PINTO, A.F.M.; BERGER, M.; Termignoni, C. A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. **Exp. Appl. Acarol.**, 42:291-300, 2007.

RINCÓN, G.; ISLAS-TREJO, A.; CASELLAS, J.; RONIN, Y.; SOLLER, M.; LIPKIN, E.; MEDRANO, J.F. Fine mapping and association analysis of a quantitative trait locus for milk production traits on *Bos taurus* autosome 4. **J Dairy Sci.**, 92(2):758-64, 2009.

RITZ, L.R.; GLOWATZKI-MULLIS, M.L.; MACHUGH, D.E.; GAILLARD, C. Phylogenetic Analysis of the tribe Bovini using microsatellites. **Animal Genetics**, (31)178-185, 2000.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, 129:389-403, 2004.

SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 744p., 1986.

SAS INSTITUTE (2002) SAS/STAT User's Guide, Version 8.0, 5th edn. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F. Fase de vida livre e flutuação sazonal do *Boophilus microplus* em Botucatu, São Paulo, Brasil. Ciências Agrárias, Londrina, v. 24, n. 1, p. 11-20, 2003.

SCHLEGER, A.V.; TURNER, H.G. Sweating rates of cattle in field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Aust. J. Agric. Res.**, 16:92-106, 1965.

SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; KEARSEY, M.; VISSCHER, P.M. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, 18: 339–40, 2002.

SEO, K.; MOHANTY, T.R.; CHOI, T.; HWANG, I. Biology of epidermal hair pigmentation in cattle: a mini-review. **Vet. Dermatol.**, 18:392-400, 2007.

SILVA, R.G. **Introdução à Bioclimatologia Animal** – São Paulo, Nobel, 2000, 286p.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S.; JR, W.B. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 4, 1150-1155, 2007.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Saúde Animal. Disponível em: www.sindan.com.br/ – Acesso em: 15/03/09

SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S.L.; LILLY, C.M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **J. Appl. Physiol.**, 92:1725–1742, 2002.

STONE, R.T.; KEELE, J.W.; SHACKELFORD, S.D.; KAPPES, S.M.; KOOHMARAIE, M. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **J. Anim. Sci.**, 77:1379–1384, 1999.

TEODORO, R.L.; PIRES, M.F.A.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; CÉLIO FREITAS, C.; JUNQUEIRA, M.M.; VERNEQUE, R.S.; PEIXOTO, M.G. C.D.; MARTINEZ, M.L. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para resistência a carrapatos e bernes em uma população experimental F2 Holandês x Gir. In: 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Proceeding**... João Pessoa, PB, 2006.

TERWILLIGER, J. D.; WEEKS, D. E.; OTT, J. Laboratory errors in the reading of marker alleles cause massive reductions in LOD score and lead to gross overestimation of therecombination fraction. **Am. J. Hum. Genet.**, 47, A201, 1990.

VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. **Parasitology**, 129:83-94, 2004.

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

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

WEST J.W. Effects of heat stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 86, 2131–44,2003.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, 129:367-87, 2004.

YOUSEF, M. K. Stress physiology: definition and terminology. **In**_____: Yousef, M.K. (Ed.) Stress Physiology in Livestock. pp 3–7. 1984,CRC Press, Boca Raton, FL.

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