

Marcadores genéticos associados à resistência aos parasitas – o Projeto MERINOpasite

O projeto MERINOpasite pretende identificar marcadores genéticos associados à resistência aos parasitas internos na raça Merina Branca, constituindo também uma oportunidade para estudar as parasitoses dos ovinos em diferentes áreas e a avaliar a resistência dos parasitas aos anti-helmínticos.

Helga Waap, Jacinto Gomes, Ana Cristina Ferreira
INIAV, I.P.



Luís Telo da Gama, Telmo Nunes,
Andreia J. Amaral . FMV-UL e CIISA



Tiago Perloiro . ANCORME



1. A importância dos parasitas internos na produção ovina

Os problemas associados aos parasitas internos, particularmente aos parasitas gastrointestinais, podem causar danos irreversíveis ou mesmo a morte do animal, perdas de produção e outros prejuízos económicos. Os animais com infeções massivas podem apresentar diminuição do desempenho reprodutivo, taxas de crescimento reduzidas e tornarem-se menos produtivos em geral, tanto em termos de produção de carne, como de leite e de lã. Os ovinos são mais suscetíveis aos parasitas internos do que os outros animais, por diversas razões: as fezes, de pequenas dimensões, desintegram-se facilmente, promovendo a libertação das formas parasitárias nas pastagens. Os animais alimentam-se rente à superfície do solo, resultando numa maior oportunidade de ingestão das larvas e ovos de parasitas. Além disso, os ovinos demoram a adquirir imunidade, sendo necessário cerca de 10 a 12 meses para que os borregos desenvolvam uma resposta imunitária aos parasitas. As ovelhas sofrem uma perda temporária de imunidade durante a gestação, que só se restabelece cerca de quatro semanas após o parto. A densidade elevada dos animais e o repouso insuficiente dos pastos contribuem para o aumento da incidência das parasito-

ses. Entre os vários parasitas que afetam os ovinos, os nemátodes (também conhecidos como vermes redondos), são os mais relevantes. Estes vivem maioritariamente no tubo digestivo (algumas espécies no sistema respiratório), onde produzem ovos, que são eliminados com as fezes nas pastagens. Nos dias ou semanas seguintes, dependendo das condições de humidade e temperatura, os ovos eclodem e libertam as larvas. Estas sobem para o topo das ervas e são ingeridas pelos animais. Nos climas temperados, os nemátodes mais importantes são *Haemonchus contortus* (Figura 1) e *Teladorsagia circumcincta* (Figura 2). *H. contortus* vive no abomaso, onde se alimenta do sangue do hospedeiro. Para tal, perfura a parede do abomaso, causando perda de plasma e proteínas. Os sinais clínicos mais comuns são anemia, particularmente visível na pálpebra inferior e papada inchada (edema submandibular). A diarreia é rara. A hemoncosse é difícil de controlar, devido ao ciclo de vida curto do parasita, aliado a uma elevada prolificidade das fêmeas, que podem produzir até 10 000 ovos por dia. A patologia de *T. circumcincta* (teladorsagiose) deve-se à resposta imunitária desencadeada pela presença e desenvolvimento das larvas nas glândulas do abomaso. Os sinais clínicos incluem perda de peso, desidratação e diarreia intermitente. O sucesso deste parasita está relacionado com a capacidade de as suas fases de vida livre se desenvolverem a baixas temperaturas e o facto de as larvas poderem passar o inverno no hospedeiro num estado de dormência (hipobiose). O diagnóstico dos parasitas internos baseia-se em diferentes métodos coprológicos, que detetam fases específicas do ciclo de vida destes parasitas. A contagem de ovos nas fezes (FEC – *Fecal Egg count*) é o método mais utilizado para medir a resistência/suscetibilidade aos parasitas internos em ovinos. Animais com FEC mais

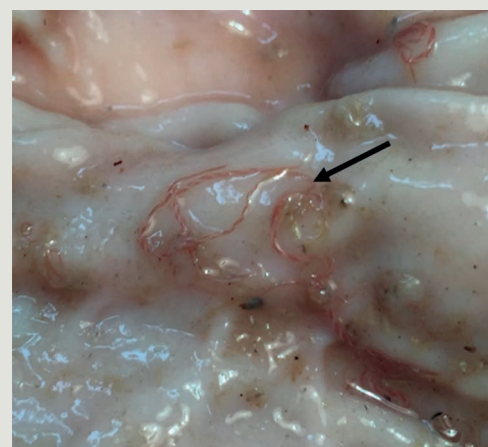


Figura 1 – *Haemonchus contortus* na parede do abomaso

baixos são considerados mais resistentes e há evidências que comprovam que esta característica é hereditária.

2. A resistência aos anti-helmínticos

Os anti-helmínticos, utilizados na profilaxia e tratamento das parasitoses, são um dos grupos de medicamentos veterinários mais utilizados a nível mundial. No entanto, o fácil acesso e a falta de orientação adequada levaram ao uso indiscriminado destes fármacos, desfasado em relação às necessidades reais. Os resultados das desparasitações são frequentemente parciais ou insuficientes, obrigando a mais e novos tratamentos, o que, a uma escala mundial, contribuiu para o desenvolvimento de resistências. Nos pequenos ruminantes, a resistência anti-helmíntica nos nemátodes já é considerada um problema sério, estando documentada em todas as classes de anti-helmínticos disponíveis no mercado (benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas). A utilização massiva dos anti-helmínticos aumenta também o risco de exposição dos consumidores aos resíduos potencialmente nocivos destes medicamentos nos alimentos de origem animal (carne, leite

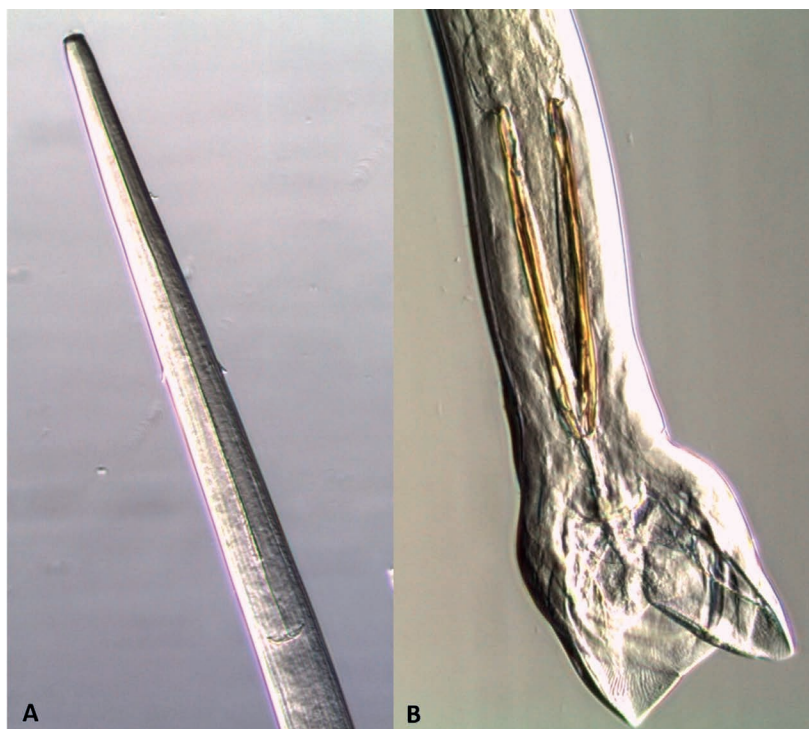


Figura 2 – *Teladorsagia circumcincta*. A – extremidade anterior, B – extremidade posterior (macho)

e derivados). As implicações deste problema para a saúde são pouco conhecidas.

3. Mudança no paradigma no controlo das parasitoses – a seleção genética como estratégia a longo prazo

A preocupação com a resistência aos anti-helmínticos, os resíduos nos produtos animais e no solo e as restrições ao uso de fármacos nas explorações orgânicas criaram a necessidade de opções de controlo mais sustentáveis e estimularam a procura de alternativas. Presentemente, o controlo integrado dos parasitas baseado na combinação estratégica de métodos químicos e não químicos é considerado a forma mais eficiente de controlar os parasitas nos rebanhos. A seleção genética dos ovinos para uma maior resistência aos parasitas é uma peça inovadora e fundamental neste controlo e, provavelmente, a melhor estratégia a longo prazo. Sabe-se hoje que algumas raças de ovinos são naturalmente mais resistentes e resilientes aos parasitas internos do que outras e que, mesmo dentro da mesma raça, esta característica é mais evidente nuns animais do que noutros. Sendo a resistência aos parasitas hereditária, é expectável que os efeitos da seleção genética sejam permanentes. A seleção genética pode ser realizada de forma clássica, através do refugo dos animais persistentemente mais parasitados e utilização dos machos e fêmeas mais resistentes para

a reprodução. A resistência pode ser medida com ajuda de algumas características observáveis nos animais, que se traduzem nos chamados marcadores fenotípicos. O marcador mais utilizado é a contagem de ovos nas fezes (FEC), esperando-se que a reprodução seletiva de animais com FEC mais baixos aumente a resistência do hospedeiro nas gerações subsequentes (Saddiqi *et al.*, 2012). No entanto, a seleção clássica para esta característica é demorada e são necessários níveis significativos de infeção para detetar diferenças. Acresce que a FEC não deve ser utilizada como única medida, uma vez que não representa todas as vias envolvidas na resistência. A falta de dados fiáveis de *pedigree* dificulta os métodos clássicos de seleção nos sistemas de produção de ovinos, especialmente em explorações de baixos recursos, com cobrição natural utilizando vários machos e partos durante todo o ano. Por outro lado, existem outras variáveis, incluindo as diferentes espécies de parasitas, fatores individuais e ambientais, que podem influenciar a resistência em condições de campo e que, idealmente, deveriam ser considerados na análise dos dados. A informação epidemiológica sobre as espécies de parasitas em ovinos em Portugal é, no entanto, limitada. Considerando estas dificuldades, a seleção de animais resistentes seria muito mais fácil de realizar se baseada em estimativas indiretas, tais como marcadores genéticos associados com a resistência ao parasitismo.

4. A importância da raça Merina Branca

Com a tomada de consciência dos vários problemas que podem influenciar a qualidade e segurança dos produtos alimentares, os consumidores passaram a ser mais exigentes, valorizando hoje produtos cuja origem e modo de produção são conhecidos. Cada vez mais, os modos de produção tradicionais, com alimentação natural, livre de químicos e respeitando o bem-estar animal, são sinónimos de qualidade e os produtos obtidos desta forma são considerados mais saudáveis. Neste contexto, as raças autóctones ganharam relevo e passaram a ser promovidas no quadro das políticas de desenvolvimento rural. A raça Merina Branca (Figura 3) é a raça ovina autóctone mais representativa em Portugal. Estes animais são conhecidos pelo seu notável potencial de produção de carne, excelente adaptação, longevidade e resistência natural às doenças. O seu modo de produção sustentável, com uma utilização eficiente das forragens, proporciona uma melhor nutrição aos borregos, fortalecendo o seu sistema imunitário e contribuindo para a resistência natural aos parasitas e outros agentes patogénicos. O projeto MERINOpasite pretende tirar partido das características da raça, pesquisando a presença de marcadores genéticos com potencial uso na reprodução seletiva dos animais mais resistentes aos parasitas. A identificação destes marcadores permitirá criar animais mais resistentes e saudáveis, reduzindo a necessidade de anti-helmínticos e outros *inputs* externos, contribuindo assim para uma produção mais sustentável e competitiva.

5. O projeto MERINOpasite



O projeto MERINOpasite, constitui uma parceria entre o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e a Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina (ANCORME). O projeto recebeu a aprovação da Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/CVT-CVT/28798/2017) e iniciou-se em outubro de 2018.

5.1. Âmbito e objetivos do projeto

Identificação de marcadores genéticos associados à resistência aos parasitas internos

O principal objetivo do projeto é identificar marcadores genéticos associados à resistência aos parasitas internos na raça Merina Branca com potencial aplicação no melhoramento genético. Pretende-se comparar os genótipos de animais resistentes e suscetíveis



Figura 3 – Ovinos da raça Merina Branca

veis, para identificar variantes genéticas que estão associadas à resistência e que poderão ser utilizadas em futuros programas de seleção genômica, aplicados numa ótica de melhoramento animal de precisão. Dado que múltiplos genes poderão estar envolvidos no mecanismo de resistência, os estudos de associação genética requerem a análise de um grande número de marcadores genéticos e a avaliação de várias características fenotípicas. Contudo, é aqui que muitos dos estudos prévios apresentam falhas, ao considerarem apenas um número reduzido de marcadores genéticos e a sua possível associação com características de resistência. Para ultrapassar estas limitações, propomos uma metodologia inovadora, baseada na tecnologia *Illumina* *OvineHD BeadChip* recentemente disponível, que permite analisar a variação genética em mais de 600 000 marcadores SNP (variações na sequência de DNA que afetam uma única base, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) no genoma ovino. A associação entre o fenótipo e genótipo será determinada através de estudos de associação do genoma inteiro, conhecidos como estudos GWAS (do inglês *Genome-Wide Association Studies*) e utilizará um amplo conjunto de marcadores fenotípicos, nomeadamente a FEC, índices de anemia medidos com a escala de cor FAMA-CHA®, peso corporal e parâmetros hematológicos e bioquímicos (hemograma, proteínas totais, albumina, AST, ALT).

Estudo epidemiológico das parasitoses na raça Merina Branca

Este projeto constitui uma excelente oportunidade para estudar as espécies parasitárias

que afetam os ovinos em diferentes áreas agroclimáticas. O conhecimento da epidemiologia das diferentes parasitoses, em particular a sua prevalência, distribuição geográfica, fatores de risco associados à exploração e a condições edafoclimáticas, permitirá modelar espacialmente as zonas de risco para a ocorrência de determinados parasitas. Esta informação é essencial no controlo integrado das parasitoses, ajudando a prever o melhor momento para a administração dos fármacos antiparasitários e/ou adoção de medidas de manejo, permitindo assim uma gestão mais racional dos tratamentos antiparasitários.

Avaliação da resistência dos parasitas aos anti-helmínticos

Apesar da resistência aos benzimidazóis (BZ) ser um problema em ruminantes reconhecido mundialmente, sobretudo em ovinos, não existem dados em Portugal. A resistência ao BZ em certas espécies de nemátodes está correlacionada com três SNP no gene da beta-tubulina (Ramünke *et al.*, 2016). Este projeto permitirá pesquisar a resistência aos BZ em dois dos parasitas mais patogénicos em ovinos, *H. contortus* e *T. circumcincta*. A determinação da resistência aos BZ será feita por pirosequenciação do genoma parasitário, em colaboração com o Instituto de Parasitologia e Medicina Veterinária Tropical da Universidade de Berlim.

Equipa do projeto

Para alcançar os objetivos propostos, o projeto conta com uma equipa multidisciplinar. No INIAV, a equipa é composta por parasitologistas e investigadores especializados em

filogenética e genética comparativa. A equipa da FMV-UL inclui investigadores com experiência na identificação de marcadores genéticos associados a características de produção e qualidade e em estratégias de melhoramento genético em ruminantes, assim como epidemiologistas com experiência em análise de risco, análise espacial e modelagem de doenças dos animais. A ANCORME, dedicada ao registo e melhoramento das raças Merina Branca e Merina Preta, irá estabelecer a ligação crucial entre o laboratório e o campo, assegurando a comunicação dos objetivos e atividades do projeto aos criadores e acompanhando a recolha de amostras.

Alinhamento com os domínios prioritários nacionais e regionais da estratégia de investigação e inovação para uma especialização inteligente

A identificação de marcadores genéticos de resistência na raça Merino Branca e o conhecimento das interações parasita-hospedeiro-ambiente contribuirão para uma utilização mais sustentável dos recursos naturais no melhoramento da saúde animal. Espera-se, assim, reduzir os custos e diminuir a resistência aos medicamentos e os resíduos nos produtos derivados dos animais, proporcionando alimentos mais seguros e mais atrativos para os consumidores. O projeto está em linha com os domínios prioritários da estratégia de investigação e inovação para uma especialização inteligente nacionais e regionais, nomeadamente no que respeita à utilização mais eficiente dos recursos naturais, a promoção de sistemas de produção tradicionais relevantes para o meio ambiente, a proteção da biodiversidade e a produção de alimentos mais saudáveis, seguros e sustentáveis, criando condições para uma maior competitividade no mercado e na cadeia de valor. 📌

Bibliografia

- Saddiqi, H.A.; Sarwar, M.; Iqbal, Z.; Nisa, M.; Shahzad, M.A. (2012). Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. *Animal*, **6**:994-1004.
- Ramünke, S.; Melville, L.; Rinaldi, L.; Hertzberg, H.; de Waal, T.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Cringoli, G.; Mavrot, F.; Skuce, P.; Krücken, J.; Demeler, J. (2016). Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **6**:230-240.